

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE II  
PROF. DR. FRANK SCHWEDA  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Interstitialie reninbildende Zellen der murinen Niere**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER MEDIZIN  
  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON JULIUS BAIER

JAHR 2022



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE II  
PROF. DR. FRANK SCHWEDA  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Interstitialle reninbildende Zellen der murinen Niere**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER MEDIZIN  
  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON JULIUS BAIER

JAHR 2022

Dekan:

Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Frank Schweda

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Stefan Wagner

Tag der mündlichen Prüfung:

08. Mai 2023

# Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	6
2.	Einleitung .....	7
2.1.	Überblick über die Anatomie und Funktion der Niere.....	7
2.1.1.	Makroskopische Betrachtung der humanen Niere.....	7
2.1.2.	Mikroskopischer Aufbau des Nierenparenchyms .....	8
2.1.3.	Das renale Interstitium.....	10
2.1.3.1.	Zellulärer Aufbau des renalen Interstitiums .....	10
2.1.3.2.	Ontogenese des renalen Interstitiums .....	13
2.2.	Endokrine Funktionen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems .....	15
2.3.	Zellbiologische Aspekte der Reninsynthese und -freisetzung .....	16
2.3.1.	Aufbau des Reninmoleküls.....	16
2.3.2.	Freisetzungsmechanismus von Renin.....	17
2.3.3.	Aufbau des (Pro-)Reninrezeptors.....	19
2.3.4.	Ontogenese der reninbildenden Zellen.....	20
2.4.	Renin in der Nephrogenese .....	21
2.5.	Regulation der systemischen und lokalen Reninfreisetzung .....	22
2.6.	Lokal-renale RAAS-Systeme: gewebsspezifische Reninfreisetzung.....	25
2.7.	Alternatives Renin-Angiotensin-System.....	26
2.8.	Klinische Bezüge der untersuchten Schädigungsmodelle.....	28
2.8.1.	Diabetes mellitus .....	28
2.8.2.	Renale interstitielle Fibrose .....	29
2.8.3.	Bartter-Syndrom .....	31
2.8.4.	Medikamentöse Therapie mit Schleifendiuretika .....	32
2.8.5.	Nierenarterienstenose .....	33
3.	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	35

4.	Methoden .....	36
4.1.	Versuchstiere und verwendete Schädigungsmodelle.....	36
4.1.1.	Diabetische Nephropathie .....	36
4.1.2.	Ureterligatur.....	37
4.1.3.	ClCnk2-Knockout .....	38
4.1.4.	Furosemidgabe .....	38
4.1.5.	Nierenarterienstenose .....	38
4.2.	Fixierung der verwendeten Nieren .....	39
4.3.	Immunologische Nachweismethoden.....	41
4.3.1.	Meerrettichperoxidase (HRP)-Färbung.....	41
4.3.2.	In situ-Hybridisierung.....	43
4.4.	Übersicht über die Zusammenstellung der verwendeten Tiere .....	46
5.	Ergebnisse .....	47
5.1.	Aktivität des systemischen RAAS bei Nierenschädigung: Beurteilung der Reninexpression.....	47
5.1.1.	Vergleich der Reninexpression am Einzelglomerulum .....	47
5.1.2.	semiquantitativer Überblick über die gesamtrenale Stimulation der glomerulären Reninexpression zwischen den Schädigungsmodellen .	51
5.2.	Expression von Renin und Renin-mRNA durch interstitielle Zellen bei Nierenschädigung.....	58
5.2.1.	Fehlender Nachweis von Renin auf Proteinebene im Interstitium .....	58
5.2.2.	Nachweis von Renin-mRNA in interstitiellen Zellen.....	58
5.2.3.	Topographische Verteilung interstitieller Renin-mRNA innerhalb der Mausniere.....	64
6.	Diskussion.....	71
6.1.	Vergleich der Ergebnisse mit der Ursprungsarbeit von Federlein .....	71
6.2.	Auswahl der Mausmodelle .....	73

6.3. Nachweis der Renin-mRNA im Interstitium bei fehlendem Nachweis des Renin-Proteins .....	75
6.3.1. Methodenbasierte Überlegungen zur weiteren Erforschung interstitieller reninproduzierender Zellen.....	75
6.3.2. Vergleich mit anderen Nierenmodellen zur Stimulation der Reninproduktion .....	78
6.3.3. Ursprung der reninbildenden Zellen .....	79
6.3.4. Vergleich mit den erythropoietinproduzierenden interstitiellen Zellen..	80
6.3.5. Synthese interstitieller Renin-mRNA durch PDGFR $\beta$ -negative Zellen	81
6.3.6. Hypothesen zur Funktion interstitiell gebildeten (Pro-)Renins .....	82
6.3.6.1. Konstitutionelle Proreninsynthese im Interstitium .....	82
6.3.6.2. Embryonale und postnatale perizytäre Reninsynthese.....	84
6.3.6.3. Interstitielles (Pro-)Renin zur Erhaltung der renalen Zellintegrität ...	85
6.3.7. Stellenwert interstitiell produzierten (Pro-)Renins bei der Progression der Nierenfibrose .....	87
6.3.8. Abschließende Überlegungen zur pharmakologischen Beeinflussung des RAAS.....	89
6.4. Ausblick.....	90
7. Anhang .....	91
7.1. Literatur.....	91
7.2. Abbildungsverzeichnis .....	105
7.3. Abkürzungsverzeichnis .....	107
7.4. Verwendete Materialien .....	109
7.4.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	109
7.4.2. Chemikalien.....	111
7.4.3. Software .....	113
8. Eidesstattliche Erklärung.....	114
9. Danksagung .....	115

## 1. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAAS) ist an der Regulation des Salz-Wasser-Haushalts des Körpers beteiligt. Darüber hinaus spielt dieses System eine entscheidende Rolle bei der Nephrogenese. Das Schlüsselenzym dieser Kaskade ist die Protease Renin, welche unter Anderem von den Zellen des renalen juxtaglomerulären Apparats synthetisiert und ausgeschüttet wird.

Eine Produktion von Renin wurde auch für andere renale Zelltypen bereits nachgewiesen, beispielsweise für Tubuluszellen. In dieser Arbeit wurde die Synthese von Renin durch interstitielle Zellen der Niere im physiologischen Zustand sowie in mehreren Schädigungsmodellen, welche zu einer Stimulation des RAAS führen (diabetische Nephropathie, Nierenarterienstenose, CICnk2-Knockout, Gabe von Schleifendiuretika, obstruktive Nephropathie), untersucht.

Es konnte dabei kein interstitiell synthetisiertes Renin nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich sowohl im physiologischen Nierengewebe als auch in allen untersuchten Schädigungsmodellen im Interstitium die mRNA, welche zur Produktion von Renin benötigt wird. Insofern ist von einer konstitutiven Synthese von Renin oder seinem Vorläufermolekül Prorenin auszugehen; eine Stimulation der juxtaglomerulären Reninproduktion scheint ein On-Top-Regulationsmechanismus zu sein.

In dieser Arbeit werden davon ausgehend die möglichen Auswirkungen einer interstitiellen Reninproduktion diskutiert. Beispielsweise steht der Proreninrezeptor (PRR) als Wirkungsmechanismus des interstitiell produzierten Renins zur Diskussion, insbesondere als Ausgangspunkt interstitieller Fibrosevorgänge.

Die Arbeit leistet damit einen Beitrag zum Verständnis des RAAS und damit auch zur Pathophysiologie nephropathischer Vorgänge.

## 2. Einleitung

### 2.1. Überblick über die Anatomie und Funktion der Niere

#### 2.1.1. Makroskopische Betrachtung der humanen Niere

Die beiden paarig angelegten Nieren des Menschen sind im Durchschnitt je 11 cm x 6 cm x 4 cm groß und wiegen etwa je 160 g (1).

Abb. 1 zeigt eine Schemazeichnung einer rechten Niere von dorsal.

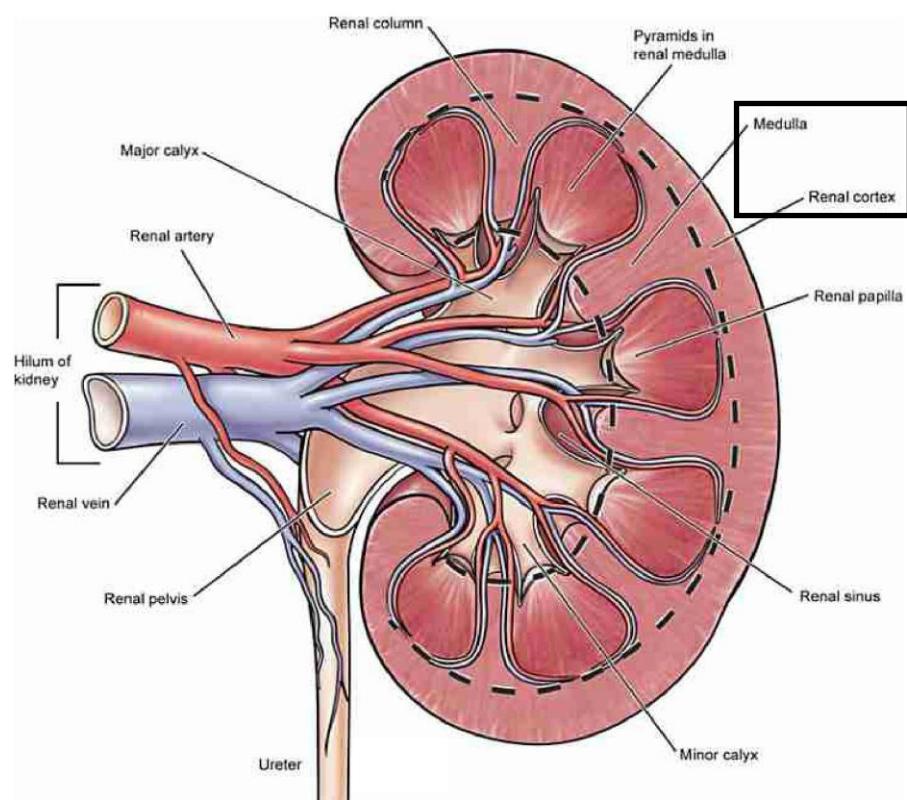


Abbildung 1: Schemazeichnung einer rechten menschlichen Niere

Makroskopisch kann das Parenchym des Organs in Nierenrinde (Cortex) und Nierenmark (Medulla) unterteilt werden (siehe Markierung).

[aus: Jennifer M. McBride. Embryology, Anatomy, and Histology of the Kidney. In: Hansel DE, Kane CJ, Paner GP, Chang SS, Hrsg. The Kidney. New York, NY: Springer New York; 2016. S. 1–18.]

Die Nieren reichen vom 12. Brust- bis zum 3. Lendenwirbelkörper. Die linke Niere steht gewöhnlicherweise etwas höher als ihr rechtes Pendant, da sich rechts auch der große

Leberlappen befindet. Die Achsen der beiden Nieren sind zueinander schräg; so sind die oberen Pole der beiden Nieren etwa 7 cm, die unteren 11 cm voneinander entfernt. Das Hilum liegt auf Höhe des 1.–2. Lendenwirbelkörpers (1).

### 2.1.2. Mikroskopischer Aufbau des Nierenparenchyms

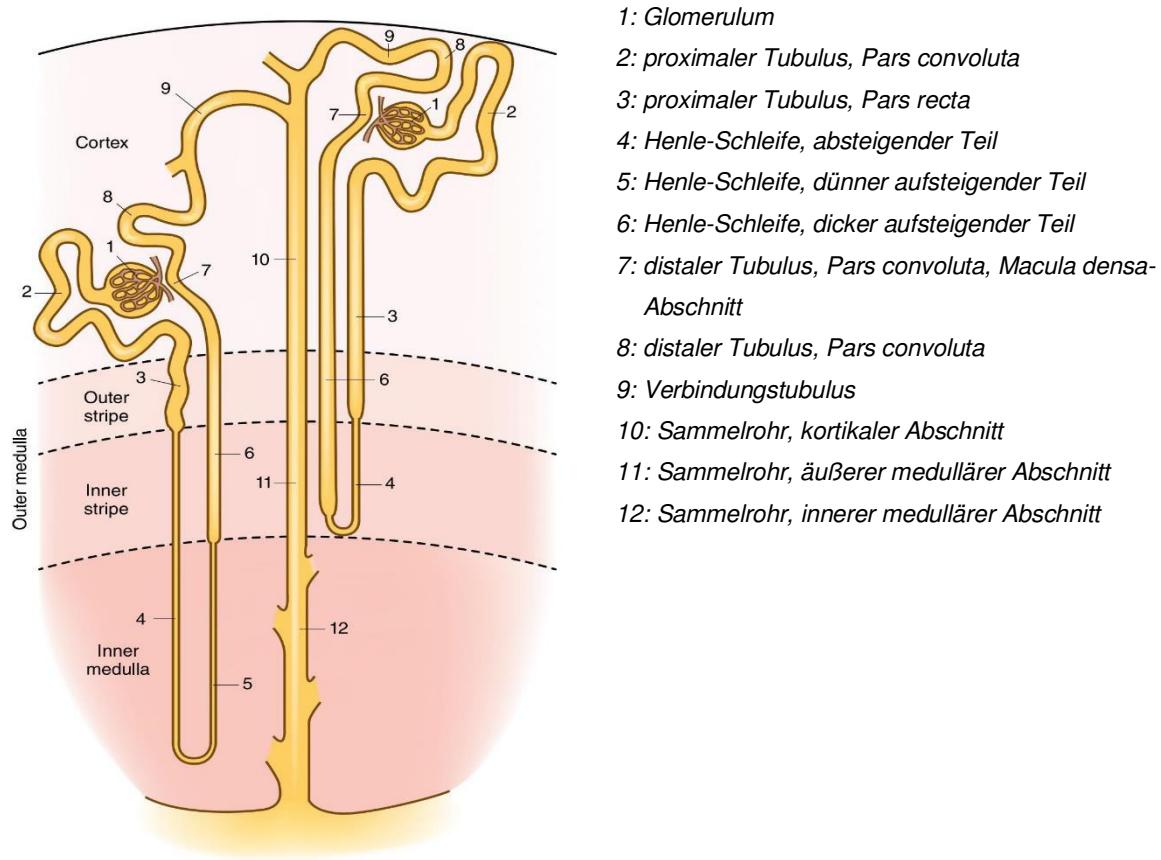


Abbildung 2: Abschnitte des Nephrons sowie Schichtaufbau der Niere

[aus: Mount DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. Clin J Am Soc Nephrol 2014; 9(11):1974–86. doi: 10.2215/CJN.04480413.]

Die funktionelle Einheit der menschlichen Niere ist das Nephron (siehe Abb. 2). Dieses besteht aus einem Nierenkörperchen (Glomerulum) sowie dem damit in Verbindung stehenden Tubulussystem, welches sich grob aus proximalem Tubulus, Henle-Schleife, distalem Tubulus sowie Verbindungstubulus zusammensetzt. Daran angeschlossen ist das Sammelrohr (2).

Die anatomische Anordnung bestimmter Abschnitte des Tubulussystems erlaubt eine weitere Unterteilung der in Kap. 2.1.1 vorgestellten Einteilung des Nierenparenchyms

in Rinde und Mark. Abb. 2 stellt die Einbettung der Nephronabschnitte in die verschiedenen Unterzonen des Nierengewebes dar. Unterschieden wird zwischen langschleifigen (linke Hälfte der Abbildung) und kurzsleifigen (rechte Hälfte der Abbildung) Nephronen. Eine Niere eines erwachsenen Menschen enthält im Durchschnitt etwa eine Million Nephrene (3).

Die Einbettung der Nephrene im Nierengewebe steht in Zusammenhang mit ihren funktionellen Aufgaben: Im Glomerulum, welches sich im Bereich der Nierenrinde befindet, erfolgt eine Filtration des durch afferente Arteriolen zugeführten Blutes nach Größe und Ladung. Dabei können kleinere und negativ geladene Moleküle den glomerulären Filter tendenziell besser passieren, während größere und positiv geladene Moleküle tendenziell eher abgepresst werden. Der glomeruläre Filter setzt sich zusammen aus dem fenestrierten Kapillarendothel, den Fußfortsätze der Podozyten sowie der dazwischen liegenden kapillären Basalmembran (4). Insgesamt werden ca. 20 % des durchfließenden Plasmavolumens durch die Glomeruli der menschlichen Nieren als Primärharn abgepresst, sodass die tägliche Primärharmenge etwa 180 Liter beträgt (5).

Der Primärharn durchfließt dann das Tubulussystem, wo eine Rückresorption von ca. 99 % des Primärharnvolumens stattfindet (6). Für jeden Abschnitt des Tubulussystems sind ein bestimmtes Tubulusepithel sowie bestimmte Rückresorptionsmechanismen charakteristisch. Außerdem bildet das Tubulussystem im Bereich des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife eine Kontaktstelle mit der afferenten Arteriole des Glomerulums, aus dem es entspringt. Die Tubulusepithelzellen werden an diesem Ort als Macula densa-Zellen bezeichnet. Sie sind Teil des juxtaglomerulären Apparats, welcher darüber hinaus auch aus den juxtaglomerulären (JG-) Zellen besteht. Diese spezialisierten glatten Gefäßmuskelzellen der Gefäßwand der afferenten Arteriole produzieren das Enzym Renin und sind so Grundlage eines endokrinen Regulationssystems, des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (7) (8).

Die für das Verständnis dieser Arbeit relevanten zellphysiologischen Transportprozesse werden in den Kapiteln 2.3 und 2.5 genauer ausgeführt.

### 2.1.3. Das renale Interstitium

#### 2.1.3.1. Zellulärer Aufbau des renalen Interstitiums

Als renales Interstitium wird der intertubuläre, extraglomeruläre, extravasale Raum der Niere bezeichnet (9). Es wird von allen Seiten durch eine Basalmembran eingefasst (10) und setzt sich aus interstitiellen Zellen, extrazellulärer Matrix und interstitieller Flüssigkeit zusammen (9). Ob das renale Interstitium auch Gefäße beinhaltet oder diese vom renalen Interstitium umgeben sind, wird von Zeisberg et al. nicht eindeutig definiert (9).

Analog zum Schichtaufbau der Niere existiert nach Lemley und Kriz ein für die jeweilige Schicht (Cortex, Innen-/ Außenstreifen der äußeren Medulla, innere Medulla) charakteristischer Aufbau des Interstitiums (10): Mehrere Typen von Zellen existieren im renalen Interstitium. Einer davon sind Fibroblast-like cells (FLCs) (10); von Zeisberg et al. werden sie als renale Fibroblasten bezeichnet (9). Takahashi-Iwanaga hingegen spricht von renalen Stützzellen, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden und damit eine Stütz- und Haltefunktion für das Nierenparenchym innehaben (11). Die Aufgabe der renalen Fibroblasten ist außerdem die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (9). Fibroblasten, die in enger Beziehung zu den interstitiellen Gefäßen stehen, werden als Perizyten bezeichnet (9). Die Fibroblasten erfüllen neben ihrer Stütz- und Synthesefunktion auch endokrine Aufgaben: Die Produktion von Erythropoietin (Epo) im renalen Interstitium wird ebenfalls von den Fibroblasten bewerkstelligt (12). Unter physiologischen Bedingungen sind die Fibroblasten jedoch meist inaktiv (9). Insgesamt ist die zelluläre Zusammensetzung im kortikalen und medullären Interstitium nach Kaissling et al. ähnlich. Große Unterschiede zeigen sich histomorphologisch (13) (11): Beispielsweise unterscheiden sich die Fibroblasten im Cortex von denen im inneren oder äußeren Markbereich der Niere: Kortikale Fibroblasten bilden durch ihre zahlreicher Zytoskelettfortsätze engere Netzwerke mit ihren Nachbarzellen. Medulläre Fibroblasten hingegen weisen häufig zytoplasmatische Fetteinlagerungen auf und werden daher auch als „lipid-laden interstitial cells“ bezeichnet (13).

Durch ihre große Heterogenität gestaltet sich die mikroskopische Markierung interstitieller Zellen schwierig. Zeisberg et al. gibt einen Überblick über mögliche Marker für diesen Zelltyp (9). In diesem Projekt wurde auf den Platelet derived growth

factor-Rezeptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) zurückgegriffen (14) (15). Er gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (16); an ihn können PDGF-Liganden binden, die als Homo- oder Heterodimere der vier verschiedenen Liganden PDGF-A, -B, -C und -D vorliegen (17). Die spezifische Bindung verschiedener PDGF-Liganden an die PDGF-Rezeptoren ist in Abb. 3 dargestellt.

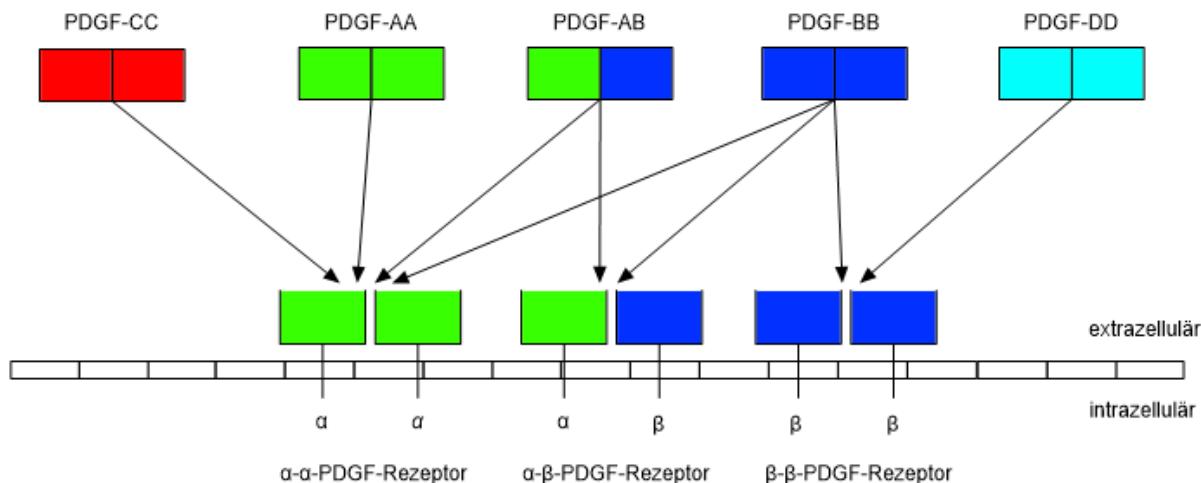


Abbildung 3: Bindungsspezifität der PDGF-Liganden an die PDGF-Rezeptoren

Der PDGF-Rezeptor besteht als Rezeptortyrosinkinase aus zwei Dimeren, die entweder dem  $\alpha$ - oder dem  $\beta$ -Typ zugeordnet werden können. Der PDGF $\beta$ -Rezeptor besteht aus zwei  $\beta$ -Untereinheiten. An ihn können PDGF-Homodimere binden, wenn sie aus zwei B-Liganden oder zwei D-Liganden bestehen.

[eigene Darstellung, Informationen aus: Sadiq MA, Hanout M, Sarwar S, Hassan M, Do DV, Nguyen QD et al. Platelet derived growth factor inhibitors: A potential therapeutic approach for ocular neovascularization. Saudi J Ophthalmol 2015; 29(4):287–91. doi: 10.1016/j.sjopt.2015.05.005.]

Die Aktivierung von PDGF-Rezeptoren führt zur Stimulierung der Zellteilung, der Zellwanderung und zur Bildung von Gewebsmatrix (18). Die Aktivierung des PDGF- $\beta$ -Rezeptor durch PDGF-BB im Speziellen scheint darüber hinaus eine große Rolle bei der Regeneration der Tubuli zu spielen (19). PDGFR- $\beta$  ist als Unterart dieser Rezeptorgruppe als Marker für interstitielle Zellen geeignet, da er von Fibroblasten und Mesangiumzellen, jedoch nicht von Epithelzellen wie Podozyten oder Tubuluszellen exprimiert wird und somit eine klare Abgrenzung der Fibroblasten von den Zellen des Nephrons erlaubt (15) (12). Zusammenfassend wird der PDGFR- $\beta$  in allen Teilen der Niere exprimiert (vgl. Abb. 4).

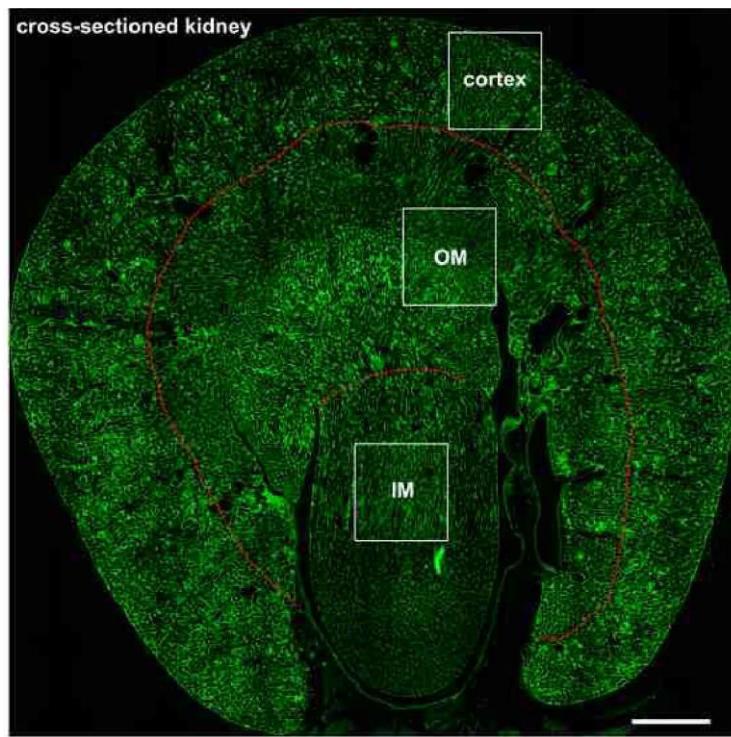


Abbildung 4: Intrarenale Verteilung des PDGFR $\beta$

Intrarenal zeigt sich der PDGFR $\beta$  (grüne Färbung) in allen Teilen der Niere; exemplarisch sind hier die Rinde, das äußere Nierenmark (OM) sowie das innere Nierenmark (IM) herausgehoben. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m

[aus: Gerl K, Nolan KA, Karger C, Fuchs M, Wenger RH, Stolt CC et al. Erythropoietin production by PDGFR- $\beta$ (+) cells. Pflugers Arch. 2016; 468(8):1479–87. doi: 10.1007/s00424-016-1829-2.]

Wie oben bereits angeführt sind neben den Fibroblasten weitere Zelltypen im renalen Interstitium vorhanden: Die Perizyten als Unterart der Fibroblasten umgeben die Kapillaren des renalen Interstitiums (10) und sind an der Regulation der Epo-Produktion beteiligt. Sie messen den arteriellen Sauerstoffgehalt in der Niere und erfüllen damit eine Sensorfunktion im Hinblick auf benötigtes Erythropoietin (12). Berg et al. haben gezeigt, dass in der embryonalen und fetalen Mäuseniere auch Perizyten Renin freisetzen können. Dieser Prozess ist mutmaßlich fast ausschließlich auf die Perizyten des kortikalen Interstitiums begrenzt und findet im medullären Interstitium nicht statt. Diese perizytäre Reninfreisetzung scheint darüber hinaus bei Angiotensin-Knockout-Mäusen deutlich erhöht zu sein, am deutlichsten bei 10 Tage alten Versuchstieren (20). Insofern scheint eine Einbindung in ein (lokales) Renin-Angiotensin-System gegeben zu sein (siehe Kap 2.6). Außerdem scheint die perizytäre Freisetzung von Renin grundsätzlich stark abhängig vom Alter der

Versuchstiere zu sein: Im Verlauf des Alterungsprozesses der Maus nahm die perizytäre Reninexpression stark ab (20).

Laut Lemley und Kriz ist auch das glomeruläre und extraglomeruläre Mesangium Teil des renalen kortikalen Interstitiums. Außerdem finden sich im renalen Interstitium Zellen der Immunabwehr, beispielsweise dendritische Zellen und Makrophagen (10).

#### *2.1.3.2. Ontogenese des renalen Interstitiums*

Die menschliche Nephrogenese beginnt etwa in der 5. Gestationswoche und endet in der 36. Gestationswoche. Bei der Maus, deren Niere als Modell der Säugerniere im Rahmen der Arbeit betrachtet wurde, beginnt die Nierenentwicklung am 10. embryonischen Tag und endet ein bis zwei Wochen postnatal (21). Ontogenetisch entwickelt sich die Säugerniere aus der embryologischen Nachniere, dem Metanephros. Der Ursprung der Nierenentwicklung ist die Ureterknospe: Sie entsteht aus dem Metanephros als epitheliales Rohr, das dann ins umgebende Gewebe, das metanephrogene Mesenchym, einwächst (22). Im weiteren Verlauf entwickeln sich aus der Ureterknospe unter anderem die Sammelrohre und Verbindungsstücke des Nephrons (23). Von den Zellen des metanephrogenen Mesenchyms stammen verschiedene Tubulusepithelzellen, vaskuläres Epithel, JG-Zellen und renale Stromazellen ab (22). Anhand der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren können die Zellen des metanephrogenen Mesenchyms in FoxD1 (Forkhead Box D1)- und Six2 (SIX Homeobox 2)-positive Zellen eingeteilt werden (siehe Abb. 5) (24).

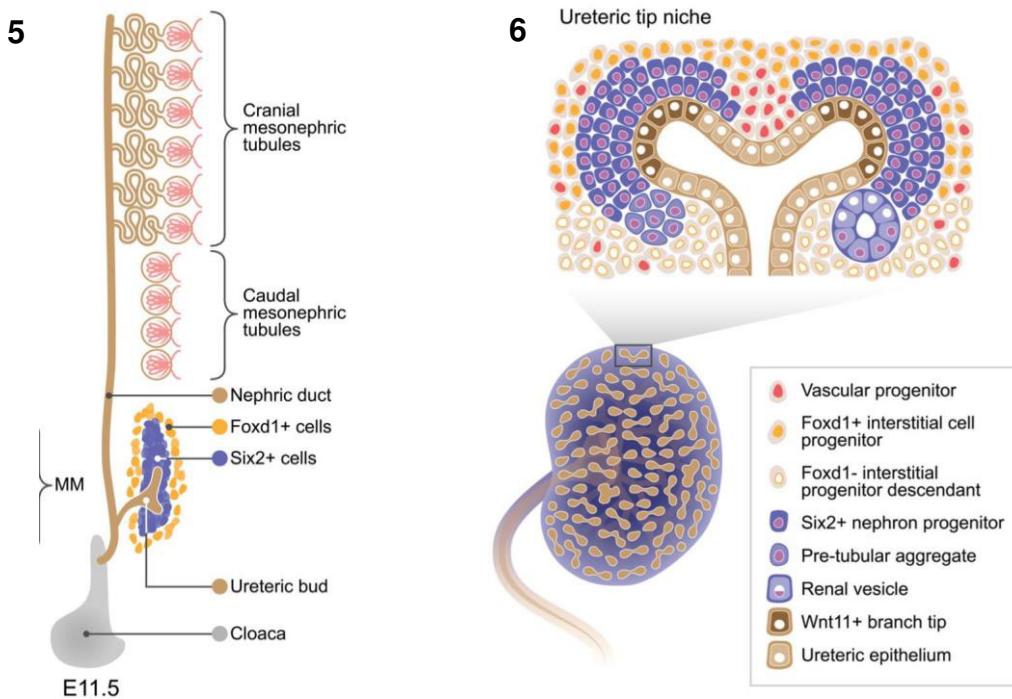


Abbildung 5: Zelluläre und molekulare Organisation von *Coxd1*- und *Six2*-positiven Zellen während der Nephrogenese

Abbildung 6: Überblick über *FoxD1*- und *Six2*-positive Zellen während der Entwicklung des Nephrons

[beide Abbildungen aus: McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol* 2016; 117:31–64. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.10.010.]

Aus der Population der FoxD1-positiven Zellen entstehen das kortikale und medulläre Interstitium, das glomeruläre Mesangium und die Perizyten, aber auch die glatten Gefäßmuskelzellen sowie die reninproduzierenden JG-Zellen (24) (23). Die Population der Six2-positiven Zellen entwickelt sich zu einem Vesikel, der sich verformt und so zunächst eine Kommaform, später eine S-Form einnimmt. Dieser ist der Vorläufer von Teilen des Tubulussystems (proximaler Tubulus, Henle-Schleife und distaler Tubulus) und fusioniert später mit den Ausläufern der Ureterknospe zum Tubulussystem (siehe Abb. 6) (7).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die reninproduzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparats und die Zellen des renalen Interstitiums von derselben Zellpopulation, den FoxD1-positiven Zellen abstammen.

## 2.2. Endokrine Funktionen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Niere ist Synthese- und Wirkungsort von Hormonen des menschlichen Körpers. Sie beeinflusst in großem Maße den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Körpers. Ein bedeutender Regelkreis dieser Nierenfunktion ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Sein Ursprung ist die Protease Renin, entdeckt 1898 durch den Physiologen Robert Tigerstedt und seinen Studenten Per Bergman (25). Sie wird hauptsächlich von den JG-Zellen der Niere synthetisiert und freigesetzt. Die JG-Zellen sind in der zuführenden Arteriole eines Glomerulums lokalisiert und setzen das produzierte Renin in den Blutkreislauf frei. Dort fördert es die Umsetzung des aus der Leber stammenden, aus einer Kette von 485 Aminosäuren bestehenden Proteins Angiotensinogen: Am N-terminalen Ende von Angiotensinogen werden durch Renin 10 Aminosäuren abgetrennt. Dieses Dekapeptid wird als Angiotensin I bezeichnet (26)(27).

Durch ein weiteres Enzym, das in der Lunge gebildete Angiotensin Converting Enzyme (ACE), wird Angiotensin I um weitere zwei Aminosäuren zum Oktapeptid Angiotensin II verkürzt (27). Angiotensin II führt zum einen zur Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen, damit zur Vasokonstriktion und zur Blutdrucksteigerung. Zum anderen fördert Angiotensin II das Durstgefühl und den Salzappetit. Darüber hinaus wird die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde stimuliert. Dieses Hormon führt ebenfalls zur vermehrten Retention von Salz und Wasser in der Niere (28). Angiotensin II wirkt außerdem durch die Stimulation der Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Hypophyse. ADH führt zur vermehrten Rückresorption von Wasser aus der Tubulusflüssigkeit durch den Einbau des Wasserkanals Aquaporin 2 in die luminale Zellmembran und außerdem geringfügig zur vermehrten Retention von Natrium (29). Dadurch wird ebenfalls vermehrt Wasser rückresorbiert und die Wasserausscheidung verringert.

## 2.3. Zellbiologische Aspekte der Reninsynthese und -freisetzung

### 2.3.1. Aufbau des Reninmoleküls

Tang et al. sowie Sielicki et al. haben erstmals den molekularen Aufbau von Renin genauer beschrieben: Das Reninmolekül (s. Abb. 7) besteht aus zwei zueinander ähnlichen Lappen, die über eine schmale molekulare Brücke miteinander verbunden sind (30). Baxter et al. bezeichnen diese Struktur auch als „Croissant-förmig“ (31). Im Bereich der Brücke befindet sich die Substratbindungsstelle des Enzyms (30). Dort wirken zwei Aspartylreste katalytisch, weshalb Renin der Enzymklasse der Aspartatproteasen angehört (32).

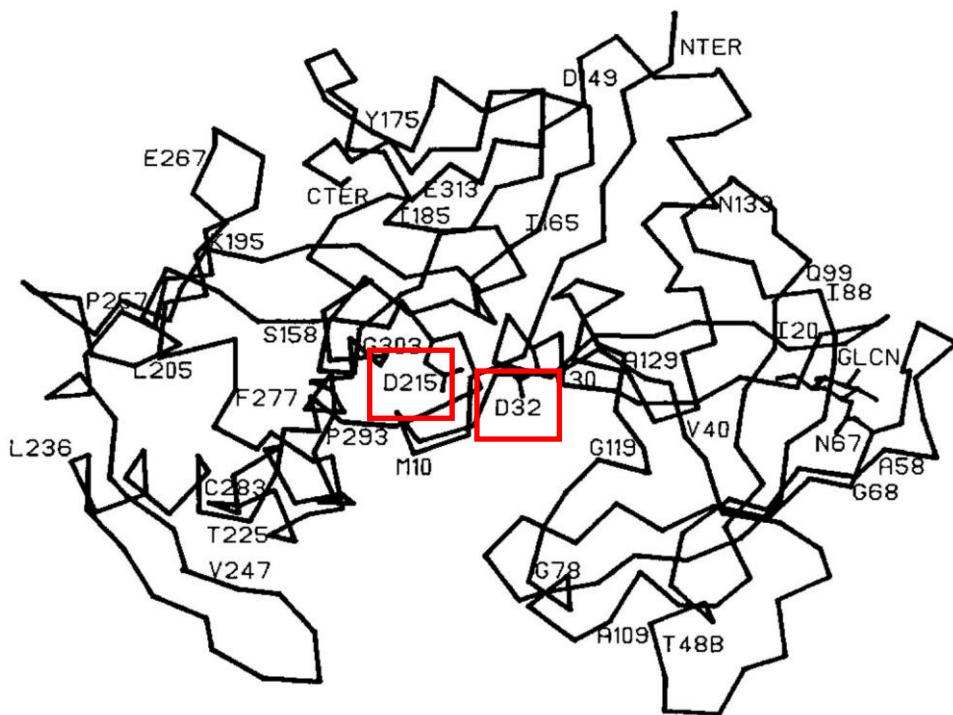


Abbildung 7: Struktur von Renin

Die beiden ähnlichen Schenkel der Aspartylprotease sind eindeutig sichtbar. Mit D32 und D215 (rote Umrandungen) sind die beiden Aspartylreste bezeichnet, die katalytisch wirken.

[aus: Baxter JD, James MN, Chu WN, Duncan K, Haidar MA, Carilli CT et al. The molecular biology of human renin and its gene. Yale J Biol Med 1989; 62(5):493–501.]

### 2.3.2. Freisetzungsmechanismus von Renin

Renin wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) bei der Translation als Präprorenin synthetisiert. Beim Transport ins rER wird die Prä-Sequenz abgespalten und das dadurch entstehende Prorenin in den Golgi-Apparat der Zelle weitergeleitet (33). Ausgehend von diesem Zellorganell kann Renin in JG-Zellen auf zwei unterschiedliche Arten aus der Zelle freigesetzt werden; sie sind in Abbildung 8 dargestellt:

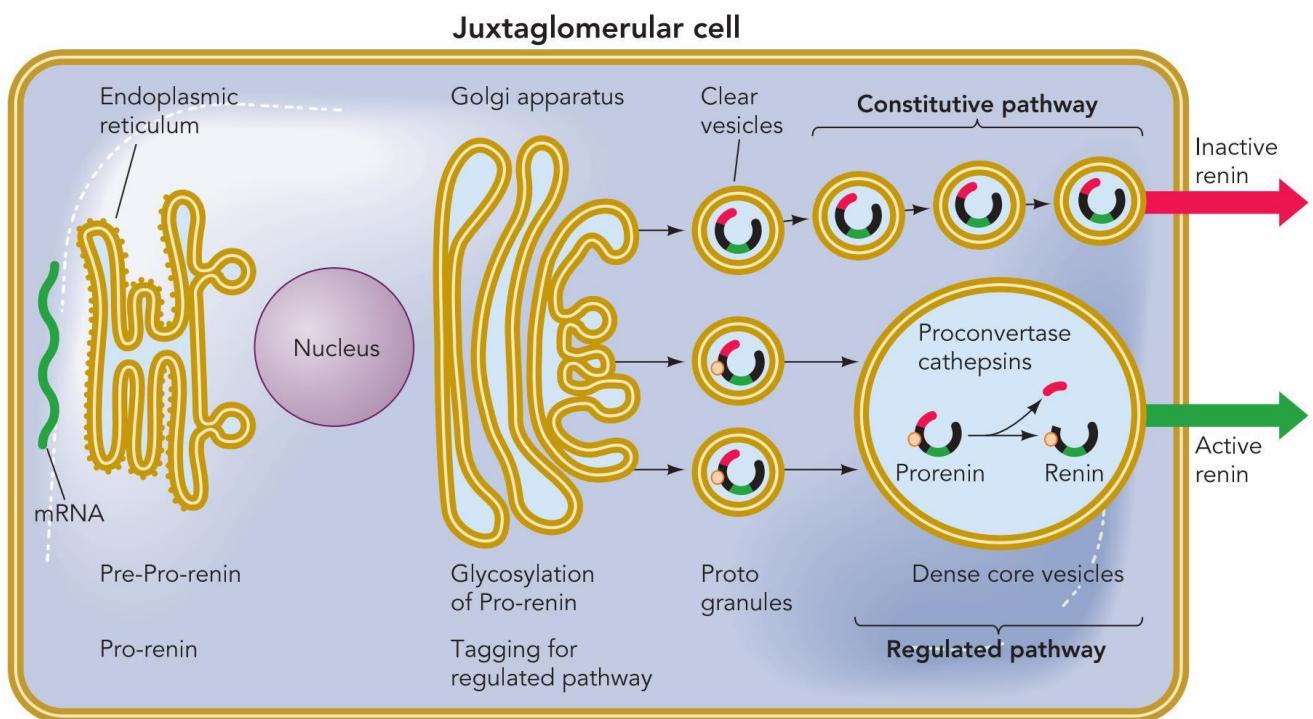


Abbildung 8: molekulärbiologische Mechanismen der Reninfreisetzung

Die Freisetzung von Renin kann zum einen über den konstitutiven Weg der Reninfreisetzung (dargestellt in der oberen Hälfte der Abbildung) erfolgen. In diesem Fall wird im Golgi-Apparat das Prorenin in Membranvesikel abgepackt und durch Fusion der Vesikel mit der Zellmembran in das die Zelle umgebende Gewebe ausgeschüttet. Es kommt also zur Freisetzung des inaktiven Vorläufermoleküls Prorenin in die Zellumgebung.

Zum anderen kann Renin nicht nur konstitutiv, sondern auch reguliert ausgeschüttet werden (dargestellt in der unteren Hälfte der Abbildung). Prorenin, das dem regulierten Weg zugeführt werden soll, wird in Progranula eingelagert. Diese verschmelzen zu dense core-Vesikeln, in denen Proconvertasen und Kathepsine das Prosegment des Vorläufermoleküls abspalten, sodass Renin in reifer Form in die Zellumgebung ausgeschüttet werden kann.

[aus: Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22:310–9. doi: 10.1152/physiol.00024.2007.]

Die regulierte Ausschüttung von Renin über dense core-Vesikel scheint Alleinstellungsmerkmal der JG-Zellen *in situ* hinsichtlich der Reninfreisetzung zu sein; bereits bei einer Isolation der JG-Zellen geht die Fähigkeit zur regulierten Reninfreisetzung verloren (33).

Untersuchungen im Mausmodell deuten darauf hin, dass die Zuordnung von synthetisierten Proreninmolekülen zu einem der beiden Freisetzungswege genetisch reguliert ist: Während der Mensch nur ein Reningen besitzt, sind bei manchen Mausstämmen zwei Reningene (Renin-1 und Renin-2) üblich. Renin dieser Mäuse, das vom Renin-1-Gen abstammt, hat drei mögliche Bindungsstellen für Glykosylierungsprozesse; Renin, das vom Renin-2-Gen abstammt, besitzt diese hingegen nicht. Da das Renin-1-Gen bei diesen Mäusen für die Freisetzung von Renin über den regulierten Weg essentiell ist, scheint die Glykosylierung ein Zuordnungsmechanismus zu ebendiesem Freisetzungsweg zu sein (34). Insgesamt werden beim Menschen von JG-Zellen nur etwa 25% des Prorenins über den regulierten Weg als reifes Renin freigesetzt, wohingegen die restlichen 75% als Prorenin über den konstitutiven Weg ausgeschüttet werden (35).

Eine Aktivierung von Prorenin kann allerdings nicht nur enzymatisch, sondern auch non-proteolytisch durch Kryo- oder und Säureaktivierung erfolgen. Die Säureaktivierung bei einem pH-Optimum von 3,3 führt zu einer kompletten Aktivierung des Prorenins, Kryoaktivierung nur zu einer teilweisen Aktivierung (ca. 15 %) (36).

Eine akute Stimulation der Reninsynthese führt zur vermehrten Freisetzung von bereits reifem Renin, während chronische Stimulation sowohl die Renin- als auch die Proreninfreisetzung erhöht (37). Interessanterweise wird eine langfristige Änderung der produzierten Menge an Renin nicht durch die Änderung der Reninsynthese einzelner Zellen gesteuert, sondern hauptsächlich über eine Änderung der Anzahl an JG-Zellen pro afferenter Arteriole (33). Über den regulierten Syntheseweg scheint also Renin in JG-Zellen für den kurzfristigen Bedarf gespeichert werden. In bestimmten Fällen kann es zur Nachrekrutierung von JG-Zellen aus dem Pool der Zellen, die von ontogenetisch reninbildenden Zellen abstammen, zusätzlich zum bestehenden Kontingent kommen. Dieser Vorgang wird als Recruitment bezeichnet; Lopez und Gomes schlagen den Terminus "Dedifferenzierung" vor (38).

In der Niere wird Renin jedoch nicht nur in den JG-Zellen, sondern zumindest zeitweise auch in den Zellen des proximalen Tubulus, des Verbindungstubulus, des Sammelrohrs und den Perizyten synthetisiert (39) (20).

### 2.3.3. Aufbau des (Pro-)Reninrezeptors

Sowohl Renin als auch Prorenin können zur Wirkungsverstärkung an einen Rezeptor binden, welcher als PRR ((Pro-)Reninrezeptor) oder auch als ATP 6-associated protein 2 (Atp6ap2) bezeichnet wird (40). Seine Existenz wurde 2002 durch Nguyen et al. erstmals postuliert (41). Er kann die Aktivität von Renin oder Prorenin durch nicht-proteolytische Konformationsänderung deutlich erhöhen. Die Aktivierung des PRR führt darüber hinaus zur Phosphorylierung von durch extrazelluläre Signale regulierte mitogen-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 (MAP-Kinasen ERK 1/2). Dadurch werden profibrotische Gene wie beispielsweise TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), Kollagene und Fibronectine aufreguliert (42). Weitere Aufgaben des Rezeptors stehen im Zusammenhang mit den verschiedenen Formen, in denen der Rezeptor vorliegen kann (siehe Abb. 9):

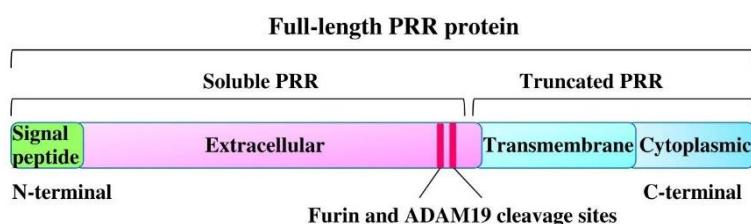


Abbildung 9: Formen und Unterteilung des PRR

Das PRR-Protein kann in einen Teil, der als löslicher PRR bezeichnet wird, sowie einen Teil, der als gestielt bezeichnet wird, unterteilt werden.

[aus: Yosypiv IV. Prorenin receptor in kidney development. *Pediatr Nephrol* 2017; 32(3):383–92. doi: 10.1007/s00467-016-3365-x. (43)]

In löslicher Form (als sPRR (soluble PRR)) liegt er beispielsweise im Blutplasma und im Urin vor. Wie ebenfalls aus Abbildung 9 hervorgeht, entsteht der lösliche Proreninrezeptor durch intrazelluläre Abspaltung vom Gesamt-PRR; dieser Vorgang wird von Enzymen wie Furin oder ADAM19 katalysiert (43).

Darüber hinaus kann er in gestielter Form V-ATPase-assoziiert vorliegen, beispielsweise in den Schaltzellen des Sammelrohrs der Niere. V-ATPasen sind ATP-abhängige Protonenpumpen, die intrazelluläre Kompartimente acidifizieren können und somit eine wichtige Rolle im zellulären pH-Haushalt spielen (42).

Außerdem kann der PRR als Teil des Wnt-Signalwegs vorliegen. Diese Signalkaskade reguliert unter anderem die Expression von bestimmten Wachstumsgenen: Durch Bindung des Wachstumsfaktors Wnt an den dem Signalweg vorgeschalteten Frizzled-Rezeptor bleibt der Abbau des Signalproteins  $\beta$ -Catenin aus; dieses transloziert dann in den Zellkern (44). Dort führt es zur Überexpression von Genen, die für das Zellwachstum und die Organentwicklung von Bedeutung sind, wie beispielsweise c-Myc oder Cyclin D1 (45).

In diesem Zusammenhang scheint laut Yosypiv der PRR essentiell für die zelluläre Kommunikation im Rahmen der Nephrogenese zu sein (43). Dementsprechend konnte der Rezeptor in der murinen Ureterknospe und dem sich entwickelnden Nephros, später auch in den Sammelrohren und dem glomerulären Mesangium nachgewiesen werden. Die Expression des PRR scheint bei der Maus pränatal deutlich höher zu sein als postnatal (46); sie scheint dann auch weiter rückläufig zu sein (47). Die Funktion des PRR im Rahmen des Wnt-Signalwegs ist unabhängig von Renin (42).

In der adulten Nagerniere konnte der PRR laut Yosypiv in den Macula densa-Zellen, den Mesangiumzellen, Podozyten, den Zellen des proximalen sowie des distalen gewundenen Tubulus sowie den Schalt- und möglicherweise auch den Hauptzellen des Sammelrohrs lokalisiert werden (43). Wie die Reninexpression selbst kann auch die Expression des PRR reguliert werden; diese scheint bei Progredienz eines Diabetes mellitus im Rahmen der diabetischen Nephropathie besonders in den Podozyten und den Mesangiumzellen aufzutreten. Bei Wassermangel bzw. im Durstversuch konnte ebenfalls eine Stimulation der Expression des PRR nachgewiesen werden, ebenso wie im Tierversuch bei Clipping der Nierenarterienstenose nach Goldblatt (48).

#### **2.3.4. Ontogenese der reninbildenden Zellen**

Jones et al. postulierten, dass die Entwicklung der murinen reninproduzierenden renalen Zellen um den 14. Tag p.c. (post conceptionem) beginnt (49). Die frühe Renin-Expression (15,5 Tage post conceptionem) gruppiert sich dabei rund um die sich

parallel entwickelnden Blutgefäße (49): Während der renalen Angiogenese teilt sich die Nierenarterie in mehrere Interlobärarterien, welche sich an ihrem Ende in jeweils vier Bogenarterien verzweigen (50). Die Reninexpression zeigt sich zunächst (an Embryonaltag 14 der Nierenentwicklung) in den distalen Teilen der Bogenarterien. Parallel zur weiteren Ausbildung des renalen Gefäßbaumes wandert der Ort der Reninexpression zunehmend in Richtung distal in Richtung der juxtamedullären afferenten Arteriolen der Glomeruli (50).

## 2.4. Renin in der Nephrogenese

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System nimmt nicht nur im Hormonhaushalt des Körpers, sondern auch in der Nierenentwicklung einen wichtigen Stellenwert ein: Bei genetischen Mutationen, die eine Synthese von RAAS-Komponenten stören oder verhindern, kann es zur Ausprägung der autosomal-rezessiven Form der renaltubulären Dysgenesie (RTD) kommen. Klinisch äußert sich die RTD in utero beispielsweise durch ein Oligohydramnion, da die Urinproduktion der Niere vermindert ist. Außerdem treten postnatale Anurie und respiratorisches Versagen sowie Ossifikationsstörungen auf (51). Mikroskopisch-pathologisch kommt es zur Atrophie von Henle-Schleife und Sammelrohr, intrarenalen Gefäßveränderungen wie Gefäßwandverdickungen und morphologischen Veränderungen der Tubuluszellen (beispielsweise fehlendem Bürstensaum im proximalen Tubulus) (21). Insofern scheint Renin essentiell für eine physiologische Nephrogenese zu sein. Dafür spricht auch ein erhöhtes Plasmareninlevel während der Nephrogenese.

Beim Menschen verläuft die Nephrogenese rein pränatal. Die Reninlevel sind fetal höher als postnatal. Bei der Maus hingegen wird die Nephrogenese erst postnatal beendet. Analog dazu sind die Reninlevel 2-6 Wochen postnatal am höchsten (51).

## 2.5. Regulation der systemischen und lokalen Reninfreisetzung

Die Menge an synthetisiertem und freigesetztem Renin ist abhängig von intra- und extrarenalen Faktoren; sie werden im Folgenden erläutert, sofern sie für die Experimente dieser Arbeit von Bedeutung sind.

In Abb. 10 ist der Hauptregulationsweg der systemischen Reninfreisetzung dargestellt.

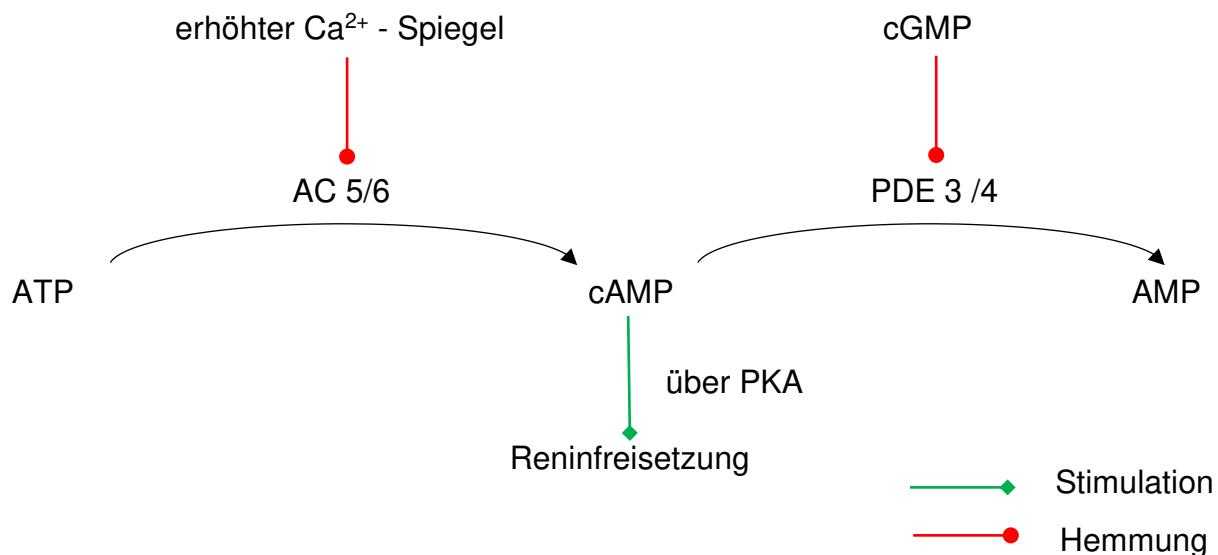


Abbildung 10: Hauptregulationsweg der Reninfreisetzung

Die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird von der Adenylatzyklase (AC) 5 bzw. 6 katalysiert. Der Abbau von cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) erfolgt mithilfe der Katalyse durch die cAMP-Phosphodiesterase (PDE) 3 bzw. 4. Der cAMP-Spiegel ist über die Proteinkinase A (PKA) mit der Freisetzung von Renin verknüpft; es liegt dabei eine positive Korrelation vor (ein erhöhter cAMP-Spiegel führt zu erhöhter Reninfreisetzung).

[eigene Darstellung, Informationen aus Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:377–99. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142238. (52)]

Viele Steuerungselemente der Reninfreisetzung greifen über die Veränderung des cAMP-Spiegels in die Reninausschüttung ein: Die Stimulation der Reninausschüttung kann grundsätzlich über die Aktivierung der am cAMP-Aufbau beteiligten Adenylatzyklen oder eine Hemmung der Phosphodiesterasen erfolgen. Eine Hemmung der Reninausschüttung kann durch eine Hemmung der Adenylatzyklen oder eine Aktivierung des cAMP-Abbaus durch die Phosphodiesterasen zustande

kommen. Über diesen Weg wird die Reninfreisetzung auf zellulärer Ebene durch einen erhöhten extra- oder intrazellulären Calciumspiegel inhibiert (siehe Abb. 10) (52).

Ein wichtiger lokal-renaler Regulationsmechanismus der Reninfreisetzung ist der Macula densa-Mechanismus. Anatomische Voraussetzung dafür ist die Annäherung des distalen Tubulus an das zum selben Nephron gehörige Glomerulum. Ein erhöhter Elektrolytgehalt, insbesondere von Chloridionen, hemmt die Reninfreisetzung (39). Durch den in Abb. 11 beschriebenen Mechanismus wird die Reninfreisetzung je nach Elektrolytzusammensetzung des Primärharns variiert.

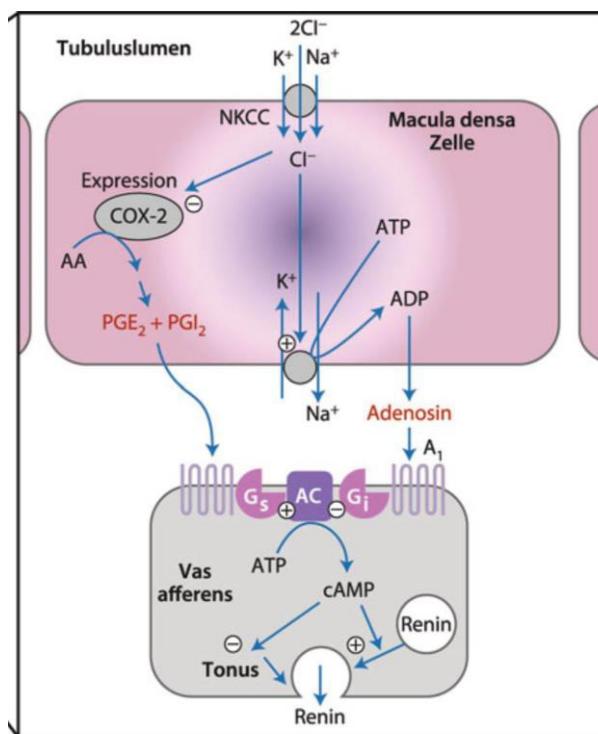


Abbildung 11: Steuerung der Reninexpression in der Macula densa-Zelle

Über einen NKCC-Transporter werden Natrium-, Kalium- und Chloridionen aus dem Primärharn im Tubuluslumen in die Macula densa-Zelle aufgenommen. Dort hemmen die aufgenommenen Ionen die Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2). Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Arachidonsäure (AA) in Prostaglandin E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub>. Da Prostaglandine über stimulierende G-Proteine fördernd auf die cAMP-Produktion und damit auf die Reninsynthese wirken, führt eine Erhöhung der tubulären NaCl-Konzentration über eine Verminderung der Prostaglandinsynthese zur Hemmung der Reninproduktion. Außerdem führt eine Erhöhung des NaCl-Einstroms in die Macula densa-Zelle dazu, dass vermehrt Adenosin anfällt. Dieses wirkt über ein inhibierendes G-Protein hemmend auf die cAMP- und damit auch auf die Reninsynthese

[aus: Offermanns S. Diuretika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, Hrsg. Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. S. 391–406 (53)]

Auch im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife kann indirekt eine Regulation der Reninsekretion erfolgen. Die Transportprozesse in diesem Nephronabschnitt werden in Abb. 12 dargestellt:

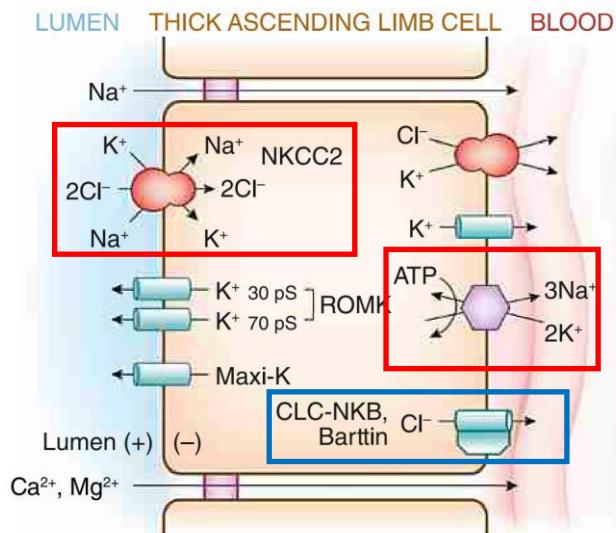


Abbildung 12: Transportprozesse im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife

Die Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife basiert auf der Aktivität der basolateralen  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase und dem NKCC2-Kotransporter (jeweils rot markiert). Er transportiert Natrium-, Kalium- und Chloridionen über die apikale Membran der Tubuluszellen. Der Transport über die basolaterale Membran der Tubuluszellen erfolgt über CIC-Kanäle (blau markiert) (54).

[Abbildung aus: Mount DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. Clin J Am Soc Nephrol 2014; 9(11):1974–86. doi: 10.2215/CJN.04480413. (2)]

Nager besitzen die CIC-K2-Unterart des basolateralen Chloridkanals, beim Menschen ist die CIC-Kb-Unterart vorhanden (54). Untersuchungen von Grill, Schießl et al. haben gezeigt, dass bei Mäusen, bei denen das für diesen Kanal codierende Gen CICnk2 funktionslos ist, eine deutlich höhere Anzahl an Renin-ausschüttenden Zellen im Sinne einer Nachrekrutierung im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden ist (54). Der genaue Mechanismus der erhöhten Reninfreisetzung wird in Kap 2.8.3 genauer beschrieben.

Auch der Perfusionsdruck der Niere hat eine regulierende Wirkung auf die Reninfreisetzung: Eine Erniedrigung des Perfusionsdrucks der Niere führt zu einer Erhöhung der Reninfreisetzung (55). Dies geschieht über einen renalen Barorezeptormechanismus, der den Perfusionsdruck der Niere misst (56). Ein Absinken des Blutdrucks in der Nierenarterie führt zu einer verminderten Dehnung der

Gefäßwand und damit zu einer Verminderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dies führt zu einer erhöhten Freisetzung von Renin (57). Davon ausgehend lässt sich folgern, dass eine Minderdurchblutung der Niere, wie sie beispielsweise bei einer Stenose einer Nierenarterie vorliegt, zu einer erhöhten Reninfreisetzung führt.

Eine Stimulation des systemischen RAAS kann außerdem über die Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch eine erhöhte Sympathikusaktivität erfolgen (52).

Des Weiteren zeigt sich eine Erhöhung der lokalen Renin-mRNA und auch des Proteins Renin im proximalen Tubulus im Rahmen einer diabetischen Nephropathie bei Ratten; dies ist unabhängig davon, ob die Nephropathie spontan oder Streptozotocin (STZ)-induziert auftritt (58). Zur genaueren Darstellung der Methode des STZ-induzierten Diabetes mellitus wird auf Kapitel 4.1.1 der Arbeit verwiesen.

## **2.6. Lokal-renale RAAS-Systeme: gewebsspezifische Reninfreisetzung**

Neben dem systemischen RAAS gibt es in vielen Organen lokale Renin-Angiotensin-Systeme, beispielsweise im Gehirn, im Herz oder in der Niere (59) .

Im Vergleich zu anderen Organen, die ein lokales Renin-Angiotensin-System besitzen, sind in den Niere alle Ursprungssubstanzen für ein solches System bereits vorhanden und müssen nicht beispielsweise mit dem Blutkreislauf dorthin transportiert werden: In den Zellen des proximalen Tubulus konnte das Protein Angiotensinogen sowie seine zugehörige mRNA nachgewiesen werden (59). Die Freisetzung in die Tubulusflüssigkeit konnte durch den Nachweis von Angiotensinogen im Urin verifiziert werden (60).

Der zweite Ausgangsstoff eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems, Renin, konnte in den Zellen des Verbindungstubulus und des Sammelrohrs detektiert werden. Rohrwasser et al. folgern daraus, dass im proximalen Tubulus freigesetztes Angiotensinogen mit der Tubulusflüssigkeit in den Verbindungstubulus und das Sammelrohr transportiert wird, wo es auf dort synthetisiertes Renin trifft und durch eine RAAS-ähnliche Kaskade die Koordination der einzelnen Nephronsegmente ermöglicht (60).

Auch eine intrarenale ACE-Produktion scheint zu existieren: In menschlichem Gewebe konnte ACE im Bürstensaum von proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden; in Ratten hingegen konnte im vaskulären Endothel ACE nachgewiesen werden (59).

Zur Wirkung des lokalen RAAS-Systems sind außerdem Angiotensin-Rezeptoren notwendig. Auch sie sind in den Epithelzellen verschiedener Nephronabschnitte sowie im Gefäßendothel vorhanden (59). Die Aktivierung von AT1 (Angiotensin 1)-Rezeptoren führt unter anderem zu einer vaskulären und kardialen Hypertrophie, zur Hemmung der Reninfreisetzung über eine negative Feedbackschleife und zur Vasokonstriktion und damit zur Erhöhung des Blutdrucks (27). Zudem führt die Aktivierung der Rezeptoren zur Beeinflussung der renalen Natrium- und Wasserreabsorption im proximalen Tubulus sowie im distalen Teil des Nephrons (27) und damit zur Erhöhung des Blutdrucks. Letztendlich wird im intrarenalen Renin-Angiotensin-System ein Verstärker vieler internistischer Erkrankungen, beispielsweise der diabetischen Nephropathie oder der arteriellen Hypertonie, vermutet. Dementsprechend wirkt sich eine Hemmung des Systems positiv auf den Verlauf dieser Erkrankungen aus: Die ACE-Hemmung oder die Blockade von AT1-Rezeptoren ist ein etablierter Therapieansatz bei arterieller Hypertonie (27).

Auch extrarenal existieren lokale RAAS-Systeme, beispielsweise im menschlichen Hoden, im Auge, in der Nebenniere und den Ovarien (36).

Im Blutplasma nephrektomierter Patienten findet sich kein Renin, aber dennoch Prorenin (61). Aus diesem Grund scheinen lokal-extrarenale RAAS-Systeme zwar Prorenin zu synthetisieren, jedoch kein aktives Renin. Sealey et al. untermauerten diese Vermutung für den menschlichen Hoden (62).

## 2.7. Alternatives Renin-Angiotensin-System

Parallel zur klassischen, bisher beschriebenen RAAS-Kaskade existiert ein weiteres, auf Renin basierendes System. Dieses wird als „alternatives RAAS“ bezeichnet und ist eng verknüpft mit seinem klassischen Pendant. Es führt besonders in pathologischen Situationen zu gegenteiligen Effekten im Vergleich zu denen, die durch

das klassische RAAS ausgelöst werden (63). Abb. 13 gibt einen Überblick über das alternative RAAS:

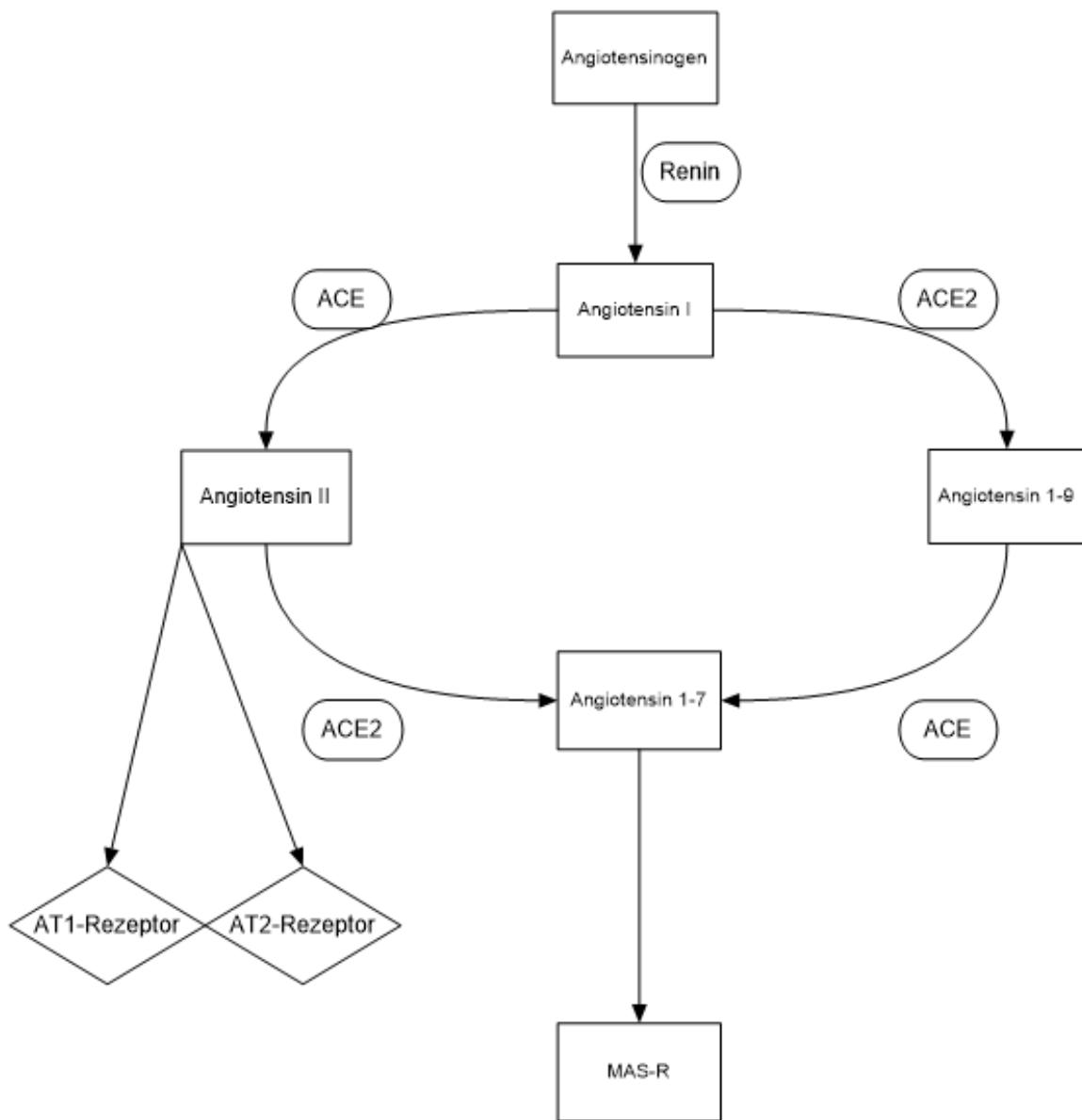


Abbildung 13: alternatives RAAS

Angiotensinogen wird unter Katalyse von Renin zu Angiotensin I (Ang I) umgewandelt. Im klassischen RAAS erfolgt die Synthese von Angiotensin II durch ACE (linke Seite der Abbildung). Im alternativen RAAS fungiert ACE2 als Katalysator bei der Umwandlung zum inaktiven Molekül Angiotensin 1-9. In einem weiteren Schritt wird dieses zum aktiven Molekül Angiotensin 1-7 umgewandelt. Letzteres bindet an den Mas-Rezeptor (MAS) und führt unter pathologischen Bedingungen zu einer Reduktion der Nierenschädigung durch antiproliferative Vorgänge.

[eigene Darstellung, Informationen aus und modifiziert nach: Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. World journal of nephrology 2015; 4(1):74–82. doi: 10.5527/wjn.v4.i1.74.]

Insgesamt scheint die Aktivität des RAAS und insbesondere seine Auswirkungen auf die Zellintegrität der Niere von dem Verhältnis zwischen ACE und ACE 2, also dem Verhältnis der Aktivität des „klassischen“ RAAS zum „alternativen“ RAAS abzuhängen. Dies soll anhand des Beispiels des Diabetes mellitus verdeutlicht werden: In frühen Stadien des Erkrankung (noch ohne Begleitnephropathie) war im Mausmodell das Verhältnis von ACE2 zu ACE erhöht, was zu renoprotektiven Effekten führte (63). Bei länger vorliegendem Diabetes war im Vergleich zu Kontrollmäusen ACE noch deutlicher erhöht als ACE2 (64). Auch beim Menschen ließ sich bei diabetischer Nephropathie ein deutliches Überwiegen von ACE gegenüber ACE2 feststellen (63). Auch bei einer durch Goldblatt-Clipping (vgl. Kap. 4.1.5) erzeugte Nierenarterienstenose führt nach 25 Tagen zu einer erniedrigten ACE2-Konzentration (65); insofern scheint zumindest eine längerfristige Nierenschädigung die Aktivität des ACE2 zu supprimieren.

## 2.8. Klinische Bezüge der untersuchten Schädigungsmodelle

### 2.8.1. *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die sich pathophysiologisch durch einen Insulinmangel auszeichnet. Da das von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas produzierte Hormon Insulin unter anderem zu einer Senkung des Blutglucosespiegels führt, liegt bei einem Mangel dieses Hormons eine Erhöhung des Blutglucosespiegels vor. Eine Folge des deutlichen erhöhten Glucosespiegels ist das Überschreiten der Nierenschwelle von etwa 180 mg/dl; oberhalb dieses Spiegels sind die renal-tubulären Rückresorptionsmechanismen überlastet, sodass Glucose im Endharn erscheint und osmotisch Wasser vermehrt in den Endharn nachdiffundiert, sodass sich das Urinvolumen erhöht. Dieser Symptomkomplex war letztendlich namensgebend für die Erkrankung (griech. diabetes = Durchfluss; lat. mellitus = honigsüß) (66).

Bezüglich der Ätiologie können mehrere Typen der Erkrankung unterschieden werden; im Folgenden werden die beiden häufigsten erläutert.

Diabetes mellitus, Typ I wird durch einen absoluten Insulinmangel verursacht. Aufgrund von Autoimmunprozessen erfolgt eine Destruktion der Langerhans'schen Inseln des Pankreas, welche die  $\beta$ -Zellen enthalten. Infolgedessen kommt es zu einer Erhöhung des Blutglucosespiegels (67). In der vorliegenden Arbeit wird ein Mausmodell dieses Diabetes mellitus-Typs verwendet.

Für den Diabetes mellitus, Typ II ist ein relativer Insulinmangel verantwortlich. Hauptsächlich durch verminderte Insulinsensitivität, die vor allem im muskulären Gewebe auftritt, kommt es zu einer Überstimulation des Pankreas, welche nicht dauerhaft aufrechterhalten werden kann. Somit ist nach einiger Zeit ein im Verhältnis zum Blutglucosespiegel erniedrigter Insulinspiegel vorhanden, sodass der Blutglucosespiegel steigt (67).

Bezogen auf die Aktivität des RAAS ist laut Ergebnissen von Anderson et al. aus dem Jahr 1993 bei Diabetes mellitus der Plasmareninspiegel erniedrigt, während hingegen die intrarenalen Reninspiegel deutlich erhöht sind (68). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität des systemischen RAAS inhibiert wird, während ein intrarenales Renin-Angiotensin-System in seiner Aktivität gesteigert ist (69). Zimpelmann et al konnten diese erhöhte Renin-Aktivität genauer lokalisieren: In STZ-Ratten zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Expression von Renin-mRNA im proximalen Tubulus, besonders im frühen Stadium des Diabetes mellitus (58). Andere Autoren wiederum berichten, dass die Hauptzellen des Sammelrohres die hauptsächliche intrarenale (Pro-)Reninquelle außerhalb des juxtaglomerulären Apparates sind (70) (71).

Die Ergebnisse von Federlein differenzieren hinsichtlich des Substrats noch genauer: Sie weisen darauf hin, dass die erhöhte RAAS-Aktivität nicht auf einen erhöhten Reninspiegel im Nierengewebe zurückzuführen ist, sondern lediglich ein erhöhter Proreninspiegel vorliegt (72).

### **2.8.2. Renale interstitielle Fibrose**

Die renale interstitielle Fibrose ist die histologische Hauptpathologie der chronischen Nierenerkrankung (CKD) (73). Diese liegt definitionsgemäß dann vor, wenn die geschätzte GFR (eGFR) bei unter 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> KOF (Körperoberfläche) liegt (74).

Die Prävalenz der eGFR-Einschränkung auf unter 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> Körpergewicht lag um das Jahr 2010 in Deutschland bei etwa 2,3 %; es sind konservativ gerechnet also etwa 2 Mio. Personen betroffen. Die Prävalenz ist besonders in der älteren Bevölkerungsgruppe höher (siehe Abb. 15) (74).

Das histopathologische Bild der renalen interstitiellen Fibrose kann durch eine Vielzahl von Grunderkrankungen ausgelöst werden (siehe Abb. 15).

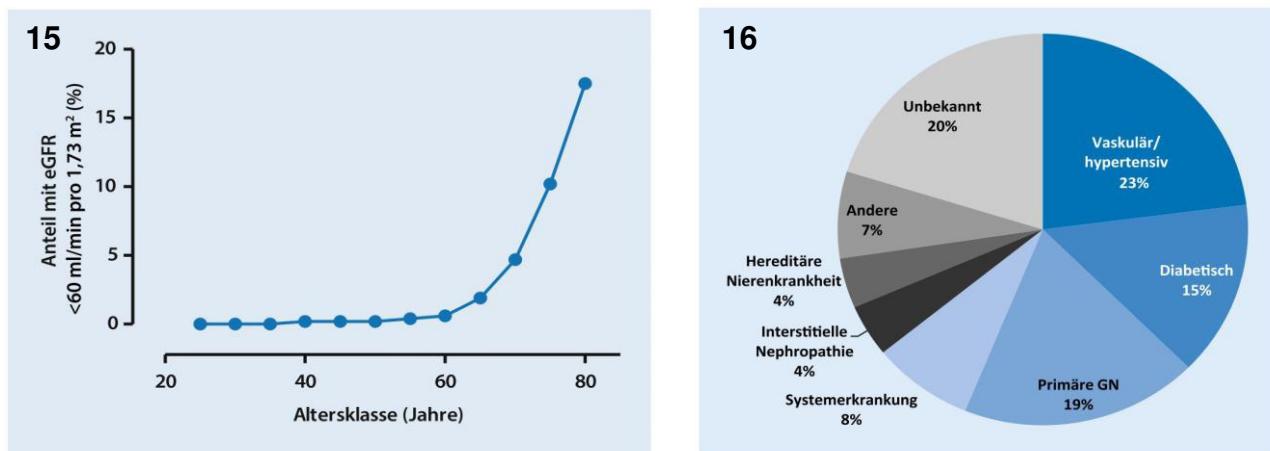


Abbildung 14: Häufigkeit der eGFR <60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> KOF abhängig vom Lebensalter

Es zeigt sich ein starker Anstieg der altersabhängigen Häufigkeit der eGFR-Verminderung ab einem Lebensalter von über 60 Jahren.

Abbildung 15: Ursachenverteilung der renalen Fibrose

Die häufigsten Ursachen der renalen Fibrose sind hypertensiv/vaskulär oder diabetisch bedingt.

[beide Abbildungen aus: Girndt M. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. Internist (Berl) 2017; 58(3):243–56. doi: 10.1007/s00108-017-0195-2.(74)]

Histopathologisch zeichnet sich die renale interstitielle Fibrose durch eine Expansion des interstitiellen Raums zwischen den Basalmembranen der Tubuli und peritubulär durch Ablagerung von Proteinen der Extrazellulärmatrix wie Kollagenen oder Fibronektin aus (75).

In Tierversuchen konnte anhand von Fibrosemodellen (beispielsweise der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), siehe Kap. 4.1.2) gezeigt werden, dass besonders bei neugeborenen Säugetieren der Reningehalt im Zustand der Nierenfibrose deutlich erhöht ist (76). So kommt es zur Stimulation lokaler Renin-Angiotensin-Systeme, welche letztendlich zur vermehrten Produktion von Angiotensin II führt. Infolgedessen

kommt es darüber hinaus zur Expression von TGF $\beta$ -Genen, welche gemeinsam mit PDGF als Wegweiser für Fibroblasten, deren Proliferation und die Transformation von Myofibroblasten wirken (76) (77). Diese Zelltypen sind hauptverantwortlich für die vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix (75).

In der Pathogenese der fibrotischen Umbauprozesse scheint auch Prorenin sowie der PRR eine entscheidende Rolle zu spielen (78). Wie in Kapitel 2.3.3 ausgeführt, ist der PRR Teil des Wnt-Signalwegs. Der PRR und der Wnt-Signalweg wirken bei der Entwicklung der Nierenfibrose zusammen (79). Im Tierversuch hat sich gezeigt, dass in Fibrosemodellen der Wnt-Signalweg in den Tubuli sowie dem renalen Interstitium aktiviert ist (44). Li et al. postulieren, dass in der menschlichen Niere auch die PRR-Expression im Zustand der chronischen Nierenschädigung erhöht ist (79). So kommt es im Zustand der chronischen Nierenschädigung durch den mangelnden Abbau von  $\beta$ -Catenin zu einer Überexpression profibrotischer Gene und zur Ausprägung der (tubulo-)interstitiellen Fibrose.

Im Tierversuch führt eine chronische UUO als Modell der Nierenfibrose (siehe auch Kap. 4.1.2) darüber hinaus zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies; diese sind assoziiert mit progressiver interstitieller Entzündung und Fibrose (76).

### **2.8.3. Bartter-Syndrom**

Diese syndromale Erkrankung wurde 1962 von Bartter et al. erstmals beschrieben. Als kennzeichnende Merkmale wurden eine Hypertrophie und Hyperplasie des juxtaglomerulären Apparats sowie Hyperaldosteronismus bei normalem Blutdruck angesehen (80). Pathophysiologisch kommt die Gruppe der Bartter-Syndrome durch Mutationen in Genen zustande, die für Transporter codieren, welche im Bereich der dicken aufsteigenden Henle-Schleife für die Salzreabsorption essentiell sind. Insgesamt beträgt die Häufigkeit des Bartter-Syndroms etwa 1:1.000.000 Geburten (81).

Im Besonderen soll hier auf Typ IVb des Bartter-Syndroms eingegangen werden: Bei dieser Erkrankung liegt ein Defekt auf dem CLCnK $\alpha$ - oder CLCnK $\beta$ -Gen, welches für den humanen ClC-K $\alpha$ - bzw. ClC-K $\beta$ -Kanal codiert, vor (81). Dadurch kommt es aufgrund der verminderten Rückresorption von Chloridionen und einer erhöhten Konzentration im Primärharn an der Macula densa wie bereits von Bartter et al.

beschrieben zu einer deutlichen Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparats sowie zu einer dementsprechenden Stimulation der Reninfreisetzung über den juxtaglomerulären Apparat. Klinisch zeigen sich bei Patienten mit Bartter-Syndrom, Typ IVb darüber hinaus Wachstumsstörungen, eine Resistenz gegenüber nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und ein erhöhtes Risiko für Nierenversagen in jungem Alter (81).

#### **2.8.4. Medikamentöse Therapie mit Schleifendiuretika**

Seit der Entdeckung von Furosemid als erstem Schleifendiuretikum 1958 durch Muschawreck, Hajdu, Sturm et al. (82) hat sich diese Medikamentenklasse als wichtige Säule der medikamentösen Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen etabliert. Exemplarisch soll hierzu die aktuelle Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) zur Behandlung der chronischen und akuten Herzinsuffizienz herangezogen werden: Hier werden Schleifendiuretika bei Patienten mit eingeschränkter Ejektionsfraktion des Herzens (HFrEF) zur Linderung der Symptome wie Kurzatmigkeit, Belastungsdyspnoe oder Orthopnoe empfohlen. Bei akuter Exazerbation der Symptomatik werden intravenöse Schleifendiuretika als Teil einer dualen Nephronblockade zusammen mit Thiaziddiuretika empfohlen. Die Schleifendiuretika Furosemid, Torasemid und Bumetanid sind laut aktueller ESC-Leitlinien bei symptomatischen Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion zur Symptomkontrolle empfohlen (83). Darüber hinaus werden Schleifendiuretika laut der Leitlinie der European Association for Study of the Liver (EASL) bei Patienten mit Aszites angewandt, wenn diese sich refraktär gegenüber der Therapie mit Mineralkortikoidantagonisten wie Spironolacton zeigen; in diesem Fall sind Schleifendiuretika also Teil der medikamentösen Zweitlinientherapie (84). Insgesamt ist diese Medikamentenklasse eine häufig verwendete Akut- oder Dauermedikation im Management kardiovaskulärer Erkrankungen.

Schleifendiuretika wirken pharmakologisch durch Blockade des NKCC2-Kotransporters, der Natrium-, Kalium- und Chloridionen über die apikale Membran des Tubulusepithels vom tubulären Lumen in die Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife transportiert (siehe Kap. 2.5) (85). Durch Inhibition des Transporters in den Macula densa-Zellen sinkt die intrazelluläre Natrium- und Chloridionenkonzentration, was zur Stimulation der Reninausschüttung führt (86).

Bereits 1965 wurde dieser pathophysiologische Zusammenhang von Fraser et al. erstmals untersucht (87). Unter Furosemid-Stimulation ist die Expression von Renin-mRNA ebenfalls erhöht (88) (89).

Darüber hinaus kommt es aufgrund der Reduktion des Extrazellulärvolumens bei vermehrter Diurese zur Stimulation der Reninproduktion aufgrund des renalen Barorezeptormechanismus (86).

Da eine Dosissteigerung über einen breiten Dosisbereich auch zu einer Wirkungssteigerung führt, werden Schleifendiuretika auch als "High ceiling-Diuretika" bezeichnet (85).

### **2.8.5. Nierenarterienstenose**

Die Nierenarterienstenose zeichnet sich durch eine teilweise Obstruktion der A. renalis aus. Die häufigste Ursache der Nierenarterienstenose ist die Atherosklerose (90). Die Prävalenz einer mindestens 60%-igen Stenose mindestens einer Nierenarterie liegt bei über 65-Jährigen bei 6,8% (8,1% bei Männern, 5,0% bei Frauen) (91). Die Prävalenz einer bilateralen mindestens 60%-igen Nierenarterienstenose liegt bei 12% der Gesamterkrankten, insgesamt also bei 0,8% (91).

Pathophysiologisch führt der verminderte renale Blutfluss aufgrund des Barorezeptormechanismus der Niere zu einer Stimulation der Reninfreisetzung. Dadurch kommt es zur Salzretention und peripheren Vasokonstriktion, was zu einer Hypertension führt (90). Die ein- oder beidseitige Nierenarterienstenose ist eine der häufigsten bekannten Ursachen einer sekundären Hypertonie. Die RAAS-Aktivierung führt darüber hinaus zu einer Aktivierung weiterer homöostatischer Steuerungssysteme, beispielsweise zur Vasokonstriktion durch eine vermehrte Aktivität des Endothelin-Systems (92).

Diese Aktivierung des RAAS bei Nierenarterienstenose liegt nicht nur auf Protein-Ebene, sondern auch auf mRNA-Ebene vor: Eine einseitige Nierenarterienstenose führt im Tiermodell zu einem Anstieg der Renin-mRNA in der stenosierten Niere und einer Suppression der Renin-mRNA in der nicht stenosierten Niere (93).

Die medikamentöse Therapie der einseitigen Nierenarterienstenose besteht laut aktueller ESC-Guidelines aus ACE-Hemmern, Angiotensin-Rezeptorblockern, Calciumkanalantagonisten und Diuretika. Diese Präparate wirken hauptsächlich

## Einleitung

antihypertensiv und vermindern somit die Progression einer chronischen Nierenerkrankung. Eine klare allgemeine Empfehlung zur Revaskularisationstherapie der Nierenarterienstenose, beispielsweise durch endovaskuläre Ballondilatation und/oder Stenteinlage, spricht die Leitlinie allerdings nicht aus (94).

### **3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Das Renin-Angiotensin-System ist eine wichtige Steuerungsachse im Flüssigkeits- und Salzhaushalt des Körpers. Bereits in den letzten Jahren des 20. Jahrhunderts konnten neben der systemischen Steuerungsachse eine Vielzahl lokaler Renin-Angiotensin-Systeme in verschiedenen Organen entdeckt werden, unter anderem auch in der Niere. In weiteren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die Substrate, welche im Rahmen dieser lokalen Systeme gebildet werden, Treiber der pathophysiologischen Vorgänge vieler Nierenerkrankungen, beispielsweise der diabetischen Nephropathie oder der Nierenfibrose sind. Eines dieser Substrate stellt die Ausgangssubstanz aller Renin-Angiotensin-Systeme, Renin, sowie seine Vorläufersubstanz Prorenin dar.

Von besonderem Interesse ist daher, welche Zellen lokal Renin exprimieren und daher der Ursprung dieser pathophysiologischen Vorgänge sind. So könnte im weiteren Verlauf eine medikamentöse Strategie entwickelt werden. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Schweda haben gezeigt, dass beispielsweise bei Diabetes mellitus das Tubulusepithel für die Ausschüttung von Prorenin und damit den Prozess eines solchen lokalen-renalen Renin-Angiotensin-Systems ist. Daher liegt es nahe, auch andere renale Zellen, wie beispielsweise interstitielle Zellen, sowie weitere Krankheitsmodelle auf die lokale Reninausschüttung zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen etablierten Modellen der Nierenschädigung die interstitiellen Zellen auf mögliche Reninexpression untersucht; somit kann diese Arbeit Teil der Grundlage für das pathophysiologische Verständnis der Beteiligung der interstitiellen Zellen an der Progression häufiger Nierenerkrankungen sein.

## 4. Methoden

### 4.1. Versuchstiere und verwendete Schädigungsmodelle

Im Gegensatz zur menschlichen Niere ist die murine Niere unilobal aufgebaut, besitzt also nur eine Markpyramide. Der Anteil des Gewichts einer Niere am Körpergewicht beträgt laut Cook ca. 0,5 - 0,8 % (95). Das Körpergewicht der zu den Versuchen herangezogenen Tiere betrug etwa 30 g, sodass das Nierengewicht laut Formel etwa 225 mg beträgt. Im Versuch wurden mehrere etablierte Modelle der Nierenschädigung angewendet, welche im Folgenden beschrieben werden.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte mit Genehmigung der örtlichen Tierschutzbehörden. Die Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) für die optimalen Haltungsbedingungen für Labormäuse (Raumtemperatur gleichbleibend  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 10\%$ , zehn- bis vierzehnstündiges Hell-/Dunkelintervall (96)) wurden erfüllt. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum; für die genaue Zusammensetzung des Trinkwassers im Rahmen der Erforschung der Auswirkungen von Schleifendiuretika siehe Kap. 4.1.4. Im Rahmen der Versuchsreihe wurden Tiere des Mausstammes C57BL/6 verwendet. Tiere dieses Stammes besitzen nur ein Reningen, welches als Ren-1<sup>c</sup> bezeichnet wird (97).

Alle verwendeten Mäuse stammten aus bereits abgeschlossenen und genehmigten Tierversuchen. Für diese Arbeit wurden keine gesonderten Tierversuche durchgeführt. Das Alter der Mäuse bei Versuchsende betrug minimal 8, maximal 45 Wochen.

#### 4.1.1. Diabetische Nephropathie

Das Schädigungsmodell der diabetischen Nephropathie kann im Mausmodell unter anderem durch die Injektion von Streptozotocin (STZ) erzeugt werden (98). Dieses Vorgehen führt zur Nekrose der  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Dadurch ist die Produktion von Insulin nicht mehr möglich, es kommt zur Ausbildung eines Diabetes mellitus, Typ I (99).

Im Rahmen der Versuchsreihe wurden die in Paraffin eingebetteten Nieren von STZ-Mäusen aus Vorversuchen von Federlein verwendet. Die genaue Vorgehensweise bei der Verwendung der Mäuse für die Versuche wird von Federlein beschrieben (72).

#### **4.1.2. Ureterligatur**

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Nierenfibrose auf die interstitielle Reninausschüttung wurde im Mausmodell eine einseitige Ureterobstruktion (UUO) durchgeführt. Die UUO ist ein etabliertes Modell der Nierenfibrose (100).

In Folge einer UUO kommt es innerhalb von 24 Stunden zu einer Erniedrigung des renalen Blutflusses und der GFR. Innerhalb einiger Tage entwickelt sich eine Hydronephrose und es kommt zur interstitiellen Einwanderung von Makrophagen. Außerdem werden die Nierentubuli apoptotisch und nekrotisch (100).

Gegenüber anderen Modellen der Nierenfibrose wie beispielsweise des ischämischen Reperfusionsmodells (101) hat eine UUO einige Vorteile: Es muss kein Toxin von außen zugeführt werden, es gibt keine urämische Komponente und die kontralaterale Niere kann als Kontrolle verwendet werden. Jedoch muss beachtet werden, dass in der kontralateralen Niere Kompensationsmechanismen zum Ausfall der ipsilateralen Niere auftreten (100). In den Studien von Chevalier et al. konnte gezeigt werden, dass bereits eine partielle chronische UUO eine deutliche Stimulation des RAAS mit sich bringt (102).

Die Operation wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach Narkose der Tiere mit Isofluran, Fixierung auf dem Operationstisch und Desinfektion erfolgte ein Hautschnitt an der rechten Flanke. Nach Präparation des Retroperitoneums erfolgte die Darstellung der rechten Niere sowie des rechten Ureters. Daraufhin wurde eine Fadenligatur des Ureters durchgeführt, eine Durchtrennung des Harnleiters erfolgte nicht. Der Verschluss der Operationswunde erfolgte mittels Faszien- und Hautnaht. Die gesamte Operationsdauer betrug etwa 15 Minuten. Eine genaue Übersicht der verwendeten Tieranzahl und die Dauer der Versuche gibt Kap. 4.4 dieser Arbeit.

#### **4.1.3. *CICnk2-Knockout***

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Nieren von Mäusen mit Nullmutation des CICnk2-Gens verwendet. Diese Mutation führt zu einer fehlenden Expression und Synthese des CICkB-Transporters (siehe Kap. 2.5).

Die Erzeugung von ebendiesen Knockout-Mäusen sowie die weitere Aufbereitung wird von Grill, Schießl et al. beschrieben (54). Die so fixierten und aufbereiteten Nieren wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Genehmigung von Prof. Dr. H. Castrop (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) für die Versuche verwendet.

#### **4.1.4. *Furosemidgabe***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde einigen Versuchstieren Furosemid per os zugeführt. Das Trinkwasser, das die Tiere ad libitum erhielten, enthielt das Schleifendiuretikum in der Dosis 0,4 mg/ml, was bei einer durchschnittlichen täglichen Trinkmenge von 20 ml pro Maus einer Tagesdosis von 8 mg entspricht. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Mäuse von 30 g entspricht dies einer gewichtsbezogenen Dosis von 0,27 mg/g Körpergewicht pro Tag bzw. 270 mg/kg KG pro Tag. Es erfolgte eine Überwachung der Trinkmenge. Nach 5 bzw. 10 Tagen wurden die Mäuse getötet, ihre Nieren perfusionsfixiert und für die weiteren Versuche aufbereitet (zur genaueren Vorgehensweise siehe Kap. 4.2).

#### **4.1.5. *Nierenarterienstenose***

Bei den zu untersuchenden Mäusen wurde eine Stenose der linken Nierenarterie nach Goldblatt durchgeführt (103). Diese Operation ist ein etabliertes Verfahren zur Erforschung von arterieller Hypertonie und/oder Minderdurchblutung der Niere. Insgesamt wird dieses experimentelle Setting als 2K1C („Two kidney, one clip“)-Situation bezeichnet (92).

Der genaue Ablauf der Operation wurde von Ströhl folgendermaßen beschrieben:

„[Die] Tiere [wurden] mit Isofluran narkotisiert und auf einem beheizten Operationstisch fixiert. Nach großflächiger Desinfektion des Operationsgebietes wurde mit sterilem Operationsbesteck über einen etwa 0,5 cm langen Hautschnitt an der linken Flanke der Zugang in das Retroperitoneum freipräpariert.

Unter zehnfacher lichtmikroskopischer Vergrößerung erfolgte die Darstellung der Arteria renalis sinistra, deren Lumen mit einem sterilen Clip auf 0,1 mm Durchmesser verengt wurde. Das Operationsgebiet wurde mittels Muskelnaht sowie Hautklammern verschlossen. Die OP-Dauer betrug etwa 15 Minuten.“ (104)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuchstiere 10 bzw. 14 Tage nach der Operation getötet und die Nieren durch Perfusion fixiert.

## 4.2. Fixierung der verwendeten Nieren

Das mikroskopische Studium des renalen Interstitiums wird von Kaissling und Le Hir als technisch schwierig beschrieben: Bei Immersionsfixierung des Nierengewebes kollabieren die Kapillaren sowie das Interstitium, während hingegen die Tubuli aufschwellen (105), sodass eine mikroskopische Betrachtung nicht möglich ist. Als Alternative wird die Perfusionsfixation angeführt (105). Diese Methode wurde deshalb auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Unter Mithilfe von Robert Götz (Lehrstuhl für Physiologie II der Universität Regensburg) wurden die Nieren der verwendeten Versuchstiere perfusionsfixiert; das Medium richtete sich nach der geplanten Verwendung der Organe. Im Rahmen der Arbeit wurde hauptsächlich auf zwei immunologische Nachweismethoden zurückgegriffen, welche in Kapitel 4.3 genauer beschrieben werden.

Für die Meerrettichperoxidase-(HRP)-Färbung wurden die Nieren mit einer Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung gespült. Formaldehyd sowie seine polymerisierte Form PFA wirken als Fixationsmedium molekular quervernetzend und wenig denaturierend. Daher bleibt die Sekundärstruktur der Proteine erhalten (106), was für die Antigen-Antikörper-Reaktion der HRP essentiell ist. Der genaue Vorgang der Fixierung wird von Federlein folgendermaßen beschrieben:

„Für die Perfusionsfixierung wurden die Versuchstiere zunächst mit einer Kombination aus Ketamin (80 mg / kg KGW i.p.) und Xylazin (12 mg / kg KGW i.p.) anästhesiert, die Bauchdecke eröffnet und die Aorta abdominalis freigelegt und unterhalb der Aorta renalis abgeklemmt. Distal zu der Klemme wurde die Perfusionskanüle in die Aorta abdominalis ( $\varnothing$  0,8 mm) eingeführt und fixiert. Anschließend wurde die Klemme gelöst und der Abfluss des Blutes durch Öffnung der Vena cava ermöglicht. Über die

## Methoden

Perfusionskanüle wurde die Niere mit 37°C warmen PBS gespült und im Anschluss mit der 4%igen PFA-Lösung bei einem konstanten Druck von 100 mmHg perfundiert. Nach fünfminütiger Perfusion wurde die fixierte Niere entnommen, transversal halbiert und bis zur Weiterverarbeitung im jeweiligen Medium aufbewahrt.“ (72)

Für die HRP-Färbung wurden die Organe für mindestens 24 Stunden bei 4°C in PFA gelagert und dann in Paraffin eingebettet: Die Nieren wurden einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt (30 min. 70% Methanol, 2 x 30 min. 80% Methanol, 2 x 30 min. 90% Methanol, 2 x 30 min. 100% Methanol, 1 x 30 min. 100 % Isopropanol, 1 x 30 min. 100% Isopropanol bei 45°C sowie 30 min. 50:50-Gemisch Paraffin-Isopropanol bei 60°C). Daraufhin erfolgte eine Einbettung in flüssiges Paraffin für insgesamt 48 Stunden. Dann konnte das Paraffin in passende Blöcke gegossen werden.

Die Organe, die im weiteren Verlauf zur *in situ*-Hybridisierung (ISH) verwendet wurden, wurden statt mit 4% PFA mit 10% NBF (neutral buffered formalin) perfundiert und nach der Perfusion entsprechend in 10% NBF aufbewahrt. Die Paraffineinbettung erfolgte auf dieselbe Weise wie die der für die HRP bestimmten Organe.

## 4.3. Immunologische Nachweismethoden

### 4.3.1. Meerrettichperoxidase (HRP)-Färbung

Zum Nachweis von Renin wurde unter anderem die Meerrettichperoxidase-Färbung angewendet. Abb. 16 zeigt das immunologische Prinzip dieser Methode:

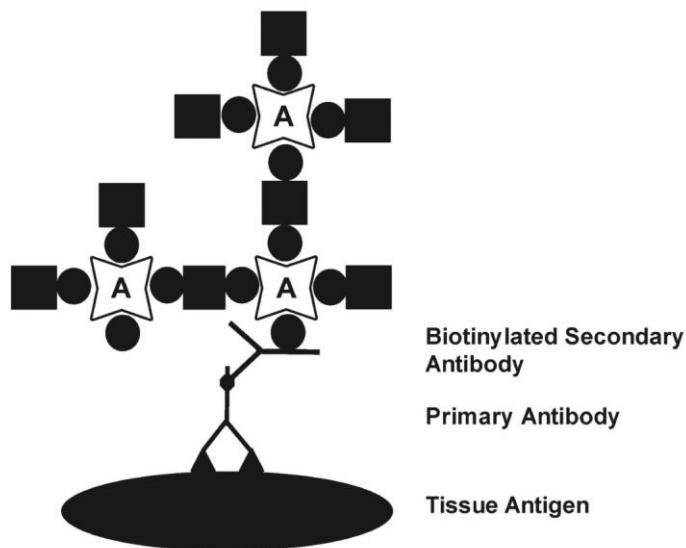


Abbildung 16: Aufbau des ABC-Komplexes

Ein Kreis entspricht einem Biotinmolekül, ein mit „A“ bezeichnetes Symbol einem Avidinmolekül. Ein Quadrat entspricht einem Meerrettichperoxidasemolekül.

[aus: Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods 2010; 588:257–70. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0\_26. (107)]

Das zu detektierende Antigen wird durch einen passenden primären Antikörper gebunden. Dieser wird durch einen sekundären Antikörper gebunden, der mit einem Biotinmolekül verknüpft ist. An diesem Molekül können bis zu zwei Avidinmoleküle binden. Das Protein Avidin besitzt selbst vier Bindungsstellen für Biotin. Dadurch kann ein ebenfalls biotinyliertes Meerrettichperoxidasemolekül an Avidin binden. So entsteht ein Gitter aus Avidin- und biotinylierten Peroxidasemolekülen (siehe Abbildung 16). Es können also pro Antigen mehrere Peroxidasemoleküle gebunden werden, was die Sensitivität der Methode durch immunologische Amplifizierung erhöht. Die Detektion des Signals erfolgt durch Enzymmarkierung: Die Meerrettichperoxidase bildet aus DAB (Diaminobenzidin) einen wasserunlöslichen Farbstoff (108). Dieser ist lichtmikroskopisch detektierbar.

Folgendes Protokoll wurde im Rahmen der Arbeit zur HRP-Färbung etabliert:

Zur Färbung wurden in PFA fixierte und in Paraffin eingebettete Nieren verwendet (Übersicht des Einbettungprozesses: siehe Kap. 4.2). Diese wurden in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgetragen.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte 2 x 12 Minuten mit Xylol entparaffiniert und dann in eine absteigende Alkoholreihe (Je 5 Minuten in 100%, 95%, 80%, 70% Ethanol) getaucht. Nach zweimaligem fünfminütigem Waschen mit PBS Otto wurden die Schnitte für 15 Minuten in Citratpuffer gekocht. Nach erneutem zweimaligem fünfminütigem Waschen mit PBS Otto wurde zur Blockade von unerwünschtem Hintergrundsignal eine 1:10-Verdünnung von 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS Otto aufgetragen und dann erneut 5 Minuten mit PBS Otto gewaschen. Daraufhin konnte unspezifisches Signal mit einer Lösung aus dem Serum des Tieres, aus dem der verwendete Sekundärantikörper stammte (10% Serum in 1% BSA in PBS Otto), blockiert werden. Dies fand für eine Stunde bei 37°C im Inkubator statt. Daraufhin fand für mehrere Stunden die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Renin in der Verdünnung 1:300 bei Raumtemperatur statt.

Am nächsten Tag wurde nach dem Waschen die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper, Verdünnung 1:200) bei Raumtemperatur durchgeführt; dieser Schritt dauerte eine Stunde. Nach erneutem Waschen mit PBS Otto wurde für 15 Minuten ein zweiter Schritt zur Hintergrundblockade durchgeführt (1:10-Verdünnung von 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS Otto) und erneut gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem ABC-Komplex für eine Stunde bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschritt. Daraufhin wurde die DAB-Reaktion durchgeführt. War die Reaktion unter dem Mikroskop zu beobachten, wurden die Objektträger zum Stoppen der Reaktion für 5 Minuten in fließendes Leitungswasser gestellt. Es fand eine kurze Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun statt; überflüssige Farbe wurde mit 0,1% HCl in Ethanol von den Schnitten entfernt. Das Bläuen des Farbstoffs fand für 5 Minuten in fließendem Leitungswasser statt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 70%, 80%, 95% und 100% Ethanol) sowie zweimaligem fünfminütigem Waschen mit Xylol konnten die Schnitte mit DePex-Medium eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet werden.

### 4.3.2. In situ-Hybridisierung

Um einen Hinweis auf eine mögliche lokale Bildung von Renin in interstitiellen Zellen zu erhalten, wurde die Renin-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) angefärbt.

In Abb. 17 ist das Grundprinzip der ISH dargestellt:

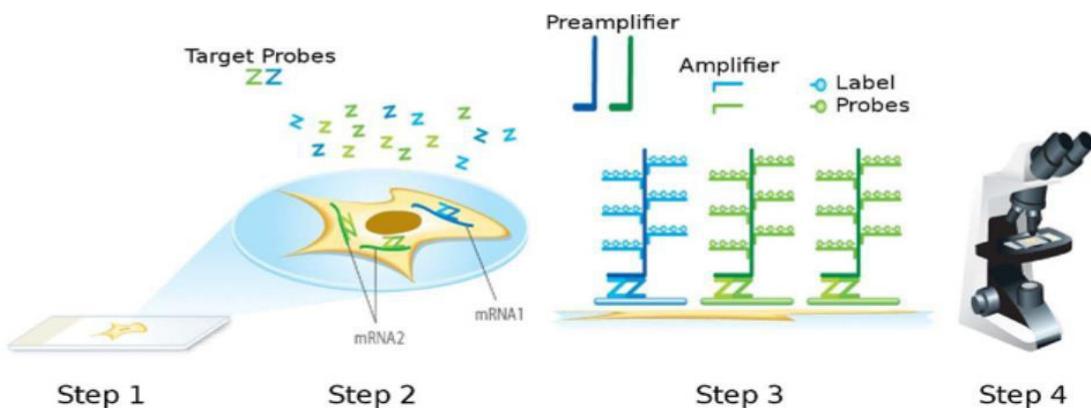


Abbildung 17: Prinzip der ISH

Die Ziel-mRNA wird durch die Probesubstanz gebunden. Ein Präamplifizierer bindet an die Probesubstanz als Ansatzpunkt für mehrere Amplifizierungssubstanzen, die chromogene Substanzen tragen. Durch Detektionssubstanzen wird das Signal lichtmikroskopisch sichtbar.

[aus: Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A et al. RNAscope: A Novel *in Situ* RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 2012; 14(1):22–9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002. (109)]

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die In-situ-Hybridisierung mithilfe des RNAscope 2.5 Duplex Detection Kit (Chromogenic) der Firma ACD durchgeführt. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Sonden und Detektionsfarben zwei unterschiedliche mRNA-Moleküle detektiert werden können. Hier wurde der Versuch mit einer Renin-mRNA-Sonde und einer PDGFR-β-mRNA-Sonde durchgeführt. PDGFR-β-mRNA wird hier als Marker für die interstitiellen Zellen verwendet (siehe Kap. 2.1.3.1): Der Rezeptor wird von medullären und kortikalen interstitiellen Zellen exprimiert, jedoch nicht vom Gefäßendothel oder glatten Muskelzellen (18).

Folgende Schritte wurden während des Versuchs ausgeführt: Nach der Perfusion der Nieren mit 10 % Neutral buffered formalin (NBF) wurden die Organe für 16-32 Stunden in NBF eingelegt, dann dehydriert und in Paraffin

eingebettet. Zur Paraffineinbettung wurde eine aufsteigende Methanolreihe verwendet; die Nieren wurden 30 Minuten in 70 % Methanol, dann jeweils eine Stunde in 80%, 90% und 100% Methanol und anschließend in Isopropanol 100% gelegt. Zur Überführung in Paraffin schloss sich eine Überführung in ein Isopropanol-Paraffin-50/50-Gemisch an; abschließend wurden die Organe zweimal für 24 Stunden in Paraffin eingelegt. Daraufhin wurde das Paraffin mit den Nieren in Formen ausgegossen und im Eisschrank gekühlt. Die dadurch entstandenen Blöcke wurden mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Zu Beginn der ISH mussten die verwendeten Objektträger für die Methode durch einstündiges Backen bei 60°C vorbereitet werden. Anschließend wurden die Schnitte durch zweimaliges zehnminütiges Einlegen in Xylol sowie kurzes Inkubieren in 100% Ethanol deparaffiniert. Auch die Schnitte selbst wurden für die ISH vorbereitet: Zunächst erfolgte eine zehnminütige Inkubation mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zur Blockade endogener Peroxidaseaktivität, die zu unerwünschtem Hintergrundsignal führt. Es folgte ein kurzes Waschen und fünfzehnminütiges Kochen in Target Retrieval zum Aufschluss des Gewebes. Nach anschließenden kurzen Waschschritten in destilliertem Wasser und 100% Ethanol wurde eine hydrophobe Barriere um die Schnitte gezogen; daraufhin wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Tag konnte eine Protease zur Verdauung des Gewebes aufgetragen und für 30 Minuten bei 40°C inkubiert werden (nach: Protokoll „Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Sample Preparation and Pretreatment for the RNAscope® 2.5 Assay Part 1“ der Firma ACD, Dokument-Nr. 322452).

Nach anschließendem Waschen wurde die mRNA-Sonde aufgetragen und bei 40°C inkubiert; zur Kontrolle wurden außerdem ein Negativ- sowie ein Positivkontrollmedium angewendet. Die Negativkontrolle erfolgte mit einem Serum, das gegen ein bakterielles Gen gerichtet ist; diese Kontrolle stellt sicher, dass keine unspezifische Färbung der Schnitte auftritt. Das Positivkontrollmedium ist gegen ein konstitutiv exprimierte Gen gerichtet. Ist bei der ISH mit diesem Medium eine Färbung vorhanden, kann von einer handwerklich erfolgreichen Hybridisierung ausgegangen werden. Nach erneutem Waschen erfolgte die Hybridisierung im engeren Sinne: Es schlossen sich zehn Amplifizierungsschritte unterschiedlicher Dauer an. Dabei wurden an die das Zielprotein bindende Sonde zunächst eine Präamplifizierungssubstanz und dann verschiedene Amplifizierungssubstanzen gebunden. Letztere dienen zur

## Methoden

Bindung des Detektionsmediums und damit zur Verstärkung des Signals. Diese Amplifizierungsschritte liefen nach folgendem Muster ab: Nach Auftragen des Amplifizierungsmediums wurden die Schnitte damit inkubiert und danach kurz gewaschen. Die ersten vier Schritte erfolgten bei 40°C, weitere zwei bei Raumtemperatur. Danach wurde das erste der beiden Signale durch Auftragen der Detektionslösung und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur detektiert. Es schlossen sich weitere vier Amplifikationsschritte an, jeweils zwei bei 40°C und bei Raumtemperatur; dann konnte das zweite Signal detektiert werden. Zur Verbesserung der Darstellung des Signals unter dem Mikroskop erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin und Ammoniumwasser. Dann wurden die Objektträger unter Zuhilfenahme von Mounting Medium mit Deckgläsern versehen; zur Vorbereitung darauf wurden die Objektträger 20 Minuten bei 60°C getrocknet (nach: Protokoll „RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection Kit (Chromogenic) User Manual Part 2“ der Firma ACD, Dokument-Nr. 322500-USM).

Die Betrachtung der Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung erfolgte lichtmikroskopisch.

#### 4.4. Übersicht über die Zusammenstellung der verwendeten Tiere

Folgende Zusammenstellung wurde im Rahmen der Versuche für die verschiedenen Mausmodelle gewählt:

Krankheit	Diabetes mellitus	Nierenfibrose			Schleifendiuretika		Nierenarterienstenose		Bartter-Syndrom IVb	Kontrolle
Modell	STZ	UUO			Furosemidgabe		Goldblatt-Ligatur		CICnk2-Knockout	-
Versuchsdauer	6 Wo	5 d	10 d	14 d	5 d	10 d	10 d	14 d		
Anzahl NBF-perfundierte Tiere	5	2	2	2	1	3	2	2	-*	3
Anzahl PFA-perfundierte Tiere	-*	2	2	2	1	3	2	2	3	3

\*: Aus versuchstechnischen Gründen konnten die Nieren der CICnk2-Knockout-Mäuse nicht zur ISH und die Nieren der STZ-Mäuse nicht zur HRP-Färbung herangezogen werden.

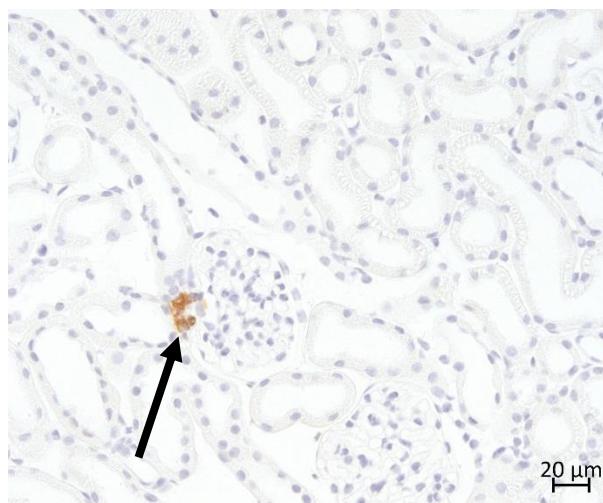
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Aktivität des systemischen RAAS bei Nierenschädigung: Beurteilung der Reninexpression

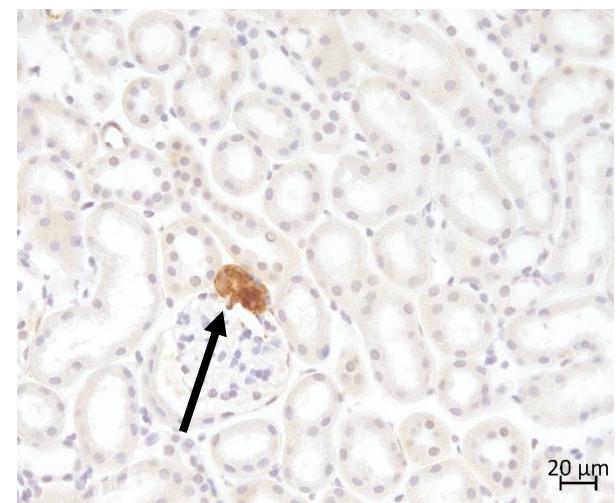
#### 5.1.1. Vergleich der Reninexpression am Einzelglomerulum

In Abb. 18 wird die Menge des Renins pro (reninpositivem) Glomerulum in der HRP-Färbung aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Schädigungsmodellen anhand eines Beispielglomerulums verglichen. Die braune Färbung zeigt das Protein Renin in der immunhistochemischen Färbung an.

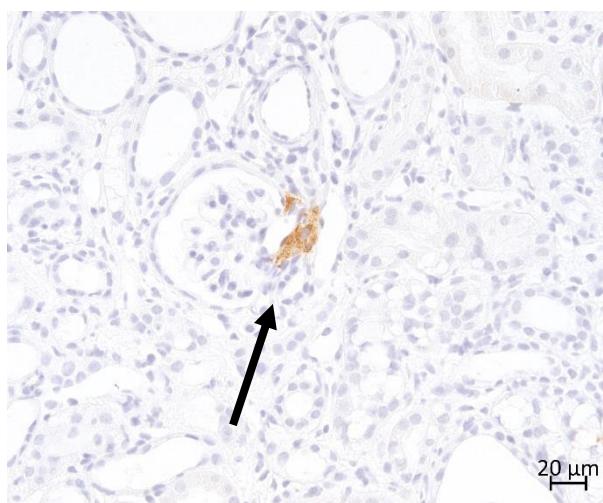
A: Kontrolle



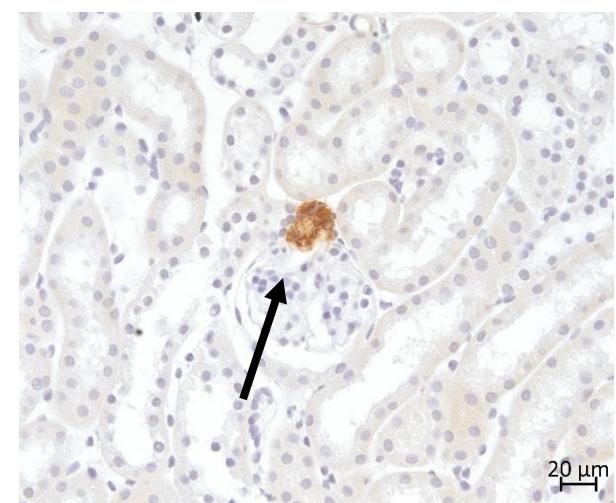
B: Furosemid



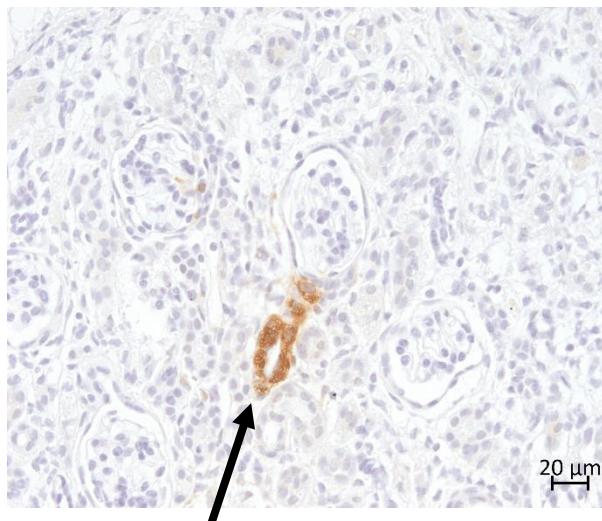
C: Ureterligatur ipsilateral



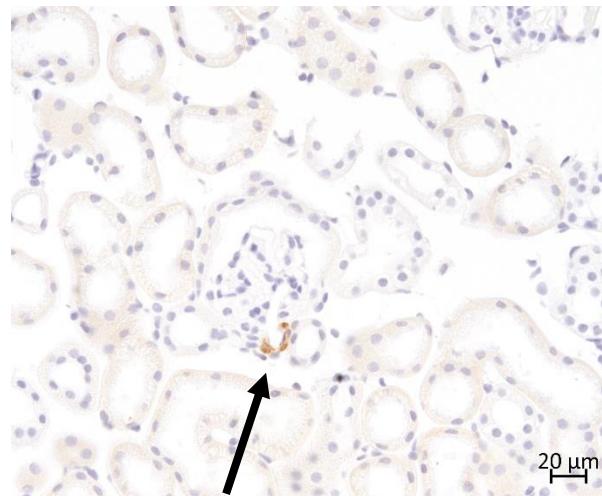
D: Ureterligatur kontralateral



E: Nierenarterienstenose ipsilateral



F: Nierenarterienstenose kontralateral



G: ClCnk2-Knockout

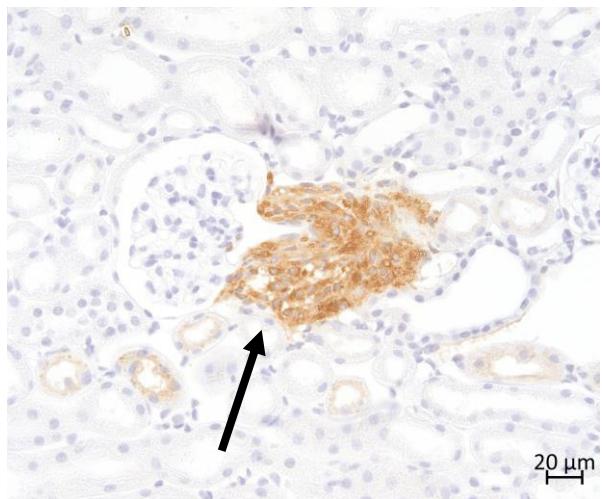


Abbildung 18: glomeruläre Reninexpression in der HRP-Färbung

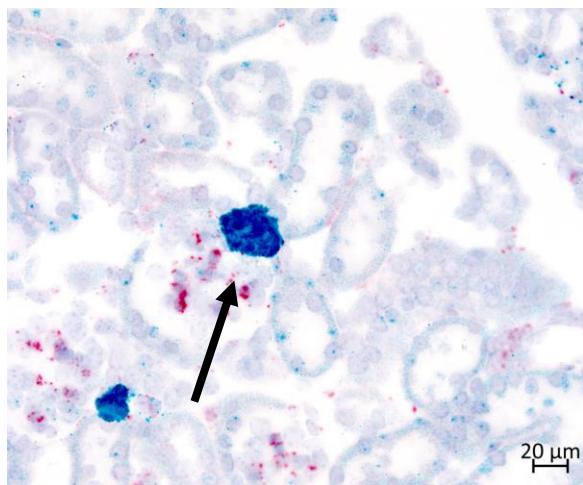
Deutlich zu erkennen ist die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Reninmenge im Eurosemid-Modell. Im Ureterligatur-Modell lassen sich zwischen ipsi- und kontralateraler Seite wenig Unterschiede feststellen. Im Nierenarterienstenose-Modell zeigt sich in der ipsilateralen Niere erwartungsgemäß (Goldblatt-Mechanismus) eine deutlich erhöhte und in der kontralateralen Niere eine deutlich erniedrigte Reninmenge pro reninpositivem Glomerulum.

Die bei weitem deutlichste Stimulation der glomerulären Reninproduktion lässt sich in den ClCnk2-Knockout-Mäusen detektieren.

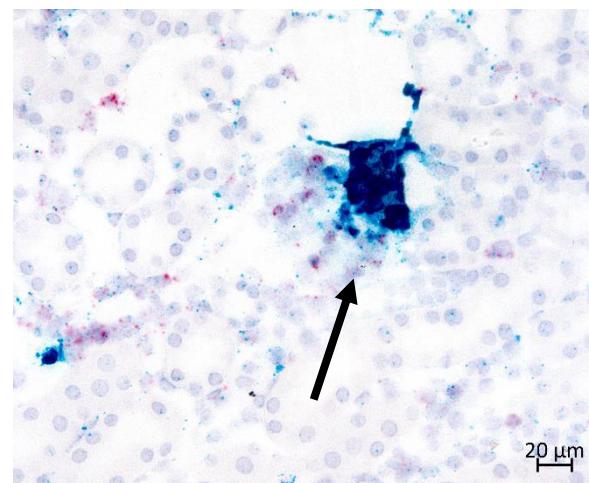
## Ergebnisse

In Abb. 19 werden Glomeruli aus Nieren der verschiedenen Schädigungsmodelle in der Duplex-ISH gezeigt. Die Renin-mRNA ist grün dargestellt, die PDGFR $\beta$ -mRNA rosa. Mit einem schwarzen Pfeil ist glomeruläre Renin-mRNA markiert.

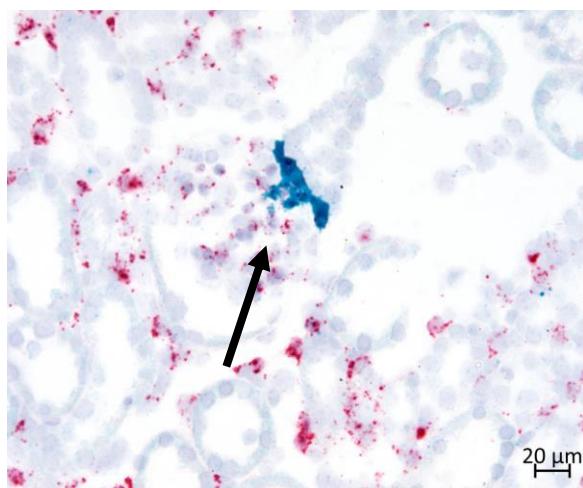
A: Kontrolle



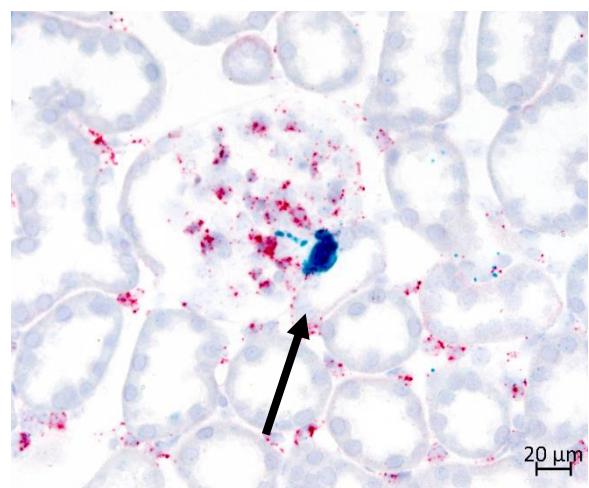
B: Furosemid



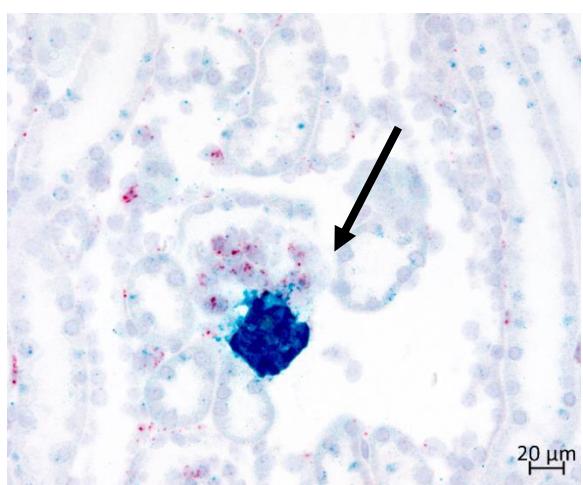
C: Ureterligatur ipsilateral



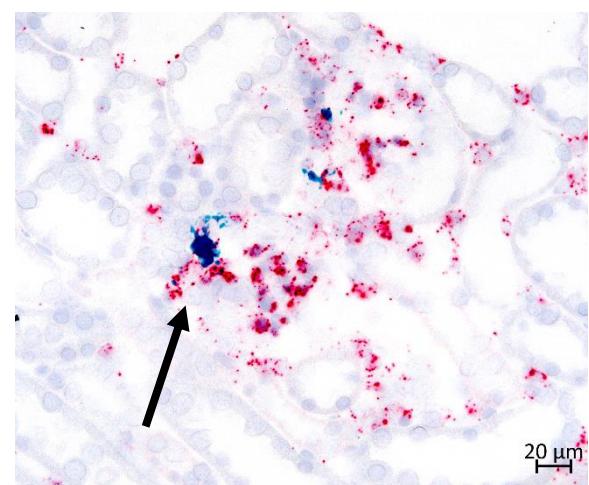
D: Ureterligatur kontralateral



E: Nierenarterienstenose ipsilateral



F: Nierenarterienstenose kontralateral



G: Diabetes mellitus, Typ I

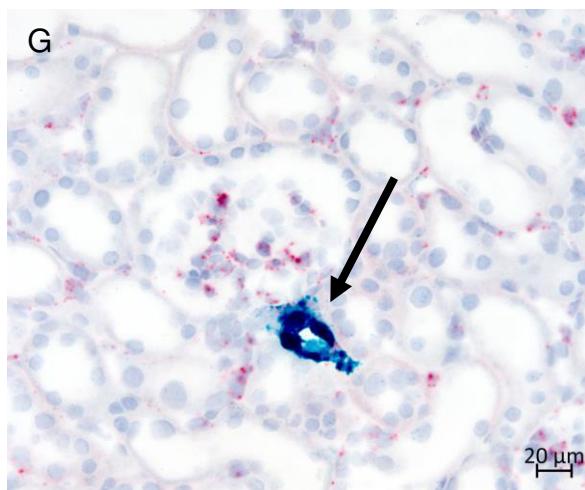


Abbildung 19: glomeruläres Renin-mRNA-Signal

Bezüglich des Glomerulums fällt eine deutliche PDGFR $\beta$ -mRNA-Färbung auf. Dies ist dadurch zu erklären, dass neben den interstitiellen Zellen auch die glomerulären Mesangiumzellen PDGFR $\beta$ -positiv sind.

In der Darstellung der glomerulären Renin-mRNA fällt besonders im Nierenarterienstenose-Modell eine deutliche Erhöhung der mRNA-Menge in der ipsilateralen Niere und ein Absinken in der kontralateralen Niere auf. Auch die Nieren der Mäuse des Furosemid-Modells zeigen eine erhöhte glomeruläre Renin-mRNA-Expression.

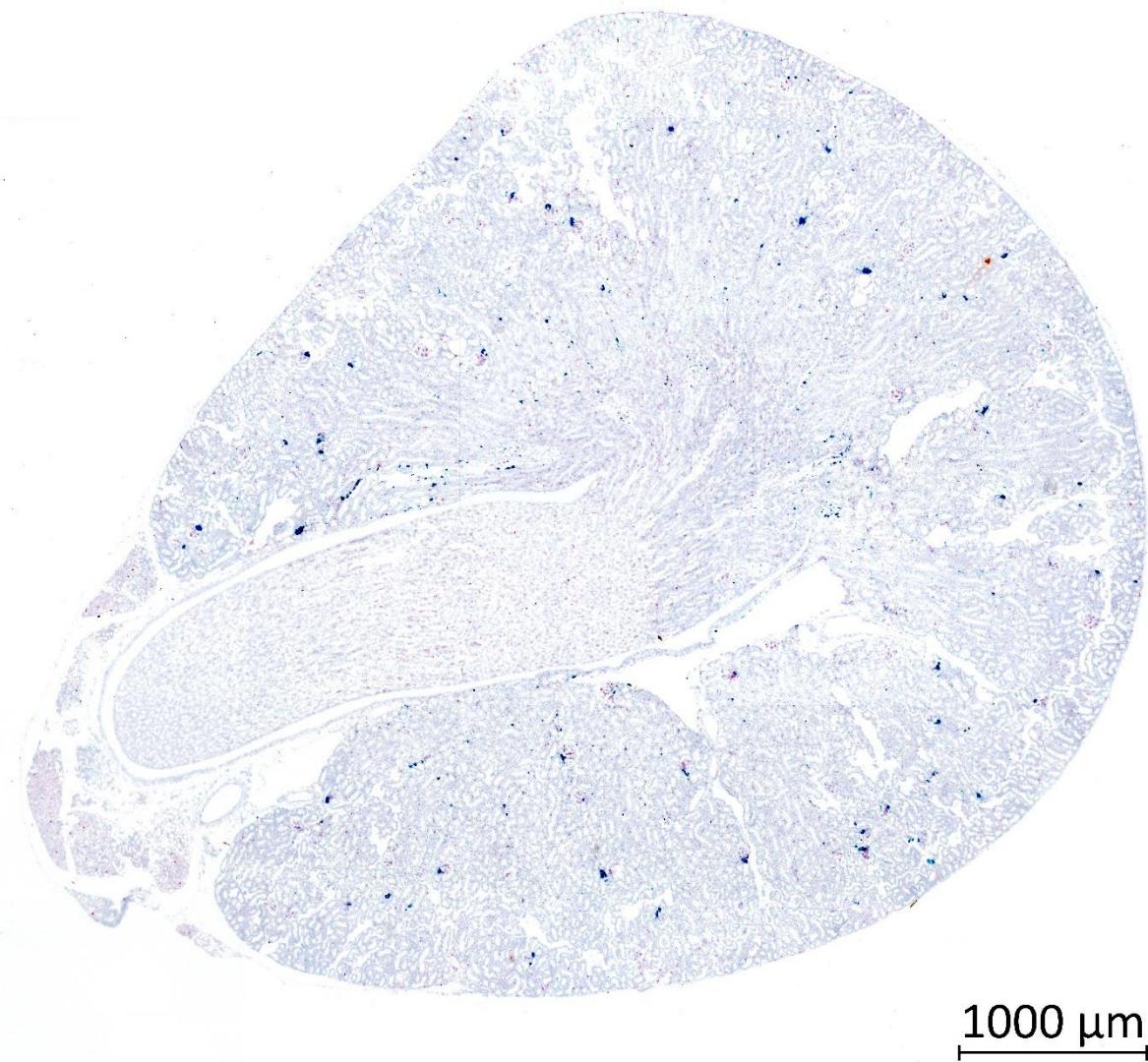
Eine deutliche glomeruläre Stimulation bezogen auf die Renin-mRNA-Menge sticht im Ureterligatur-Modell nicht heraus.

Im Diabetes-Modell lässt sich ebenfalls keine glomeruläre Stimulation der mRNA-Menge feststellen.

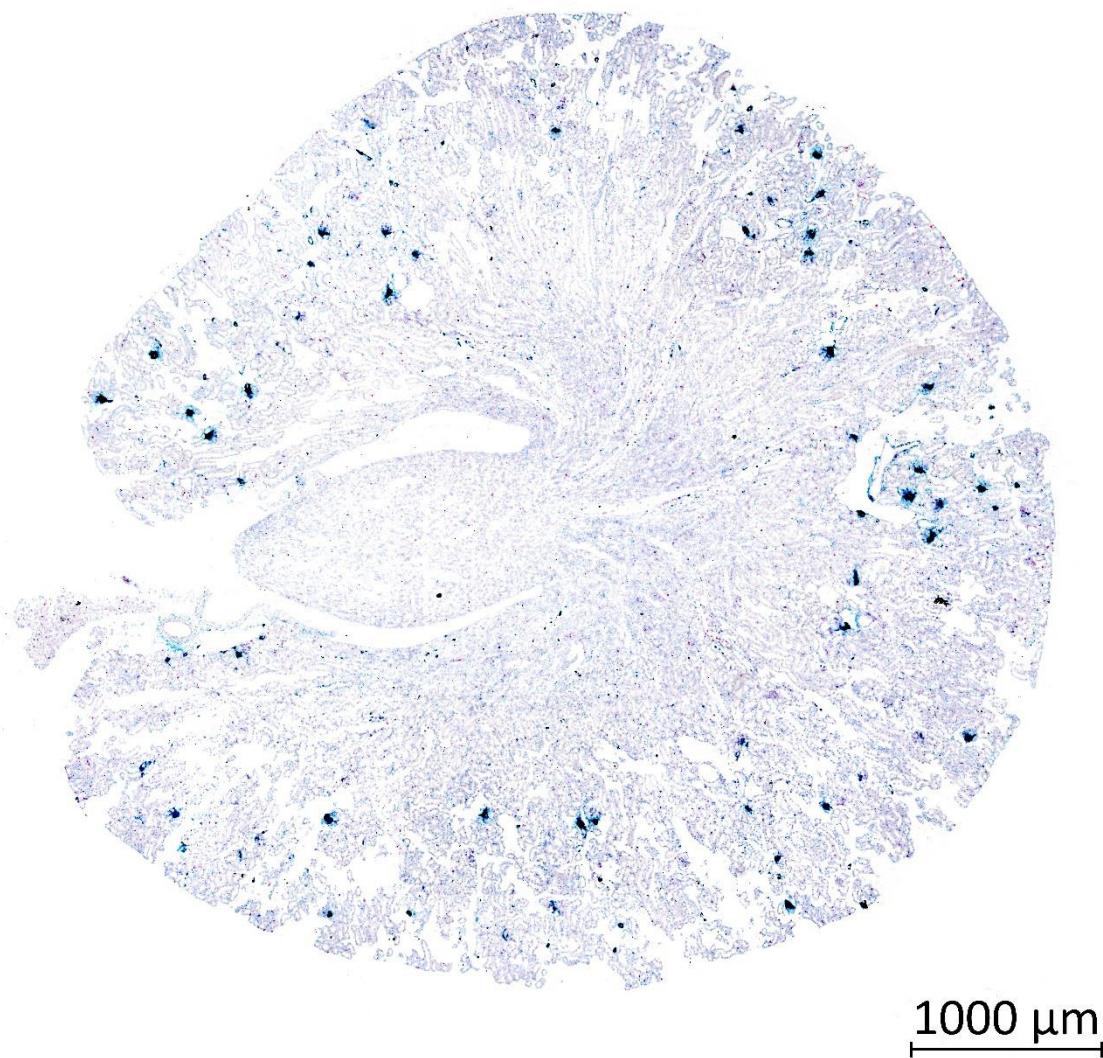
### 5.1.2. semiquantitativer Überblick über die gesamtrenale Stimulation der glomerulären Reninexpression zwischen den Schädigungsmodellen

Es folgen die Aufnahmen der Gesamtnieren in der Duplex-ISH (Renin-mRNA grün, PDGFR $\beta$ -mRNA rot). Die Aufnahmen von Abb. 20 dienen dazu, einen visuellen Überblick über das glomeruläre Renin zu erhalten.

A: Kontrolle

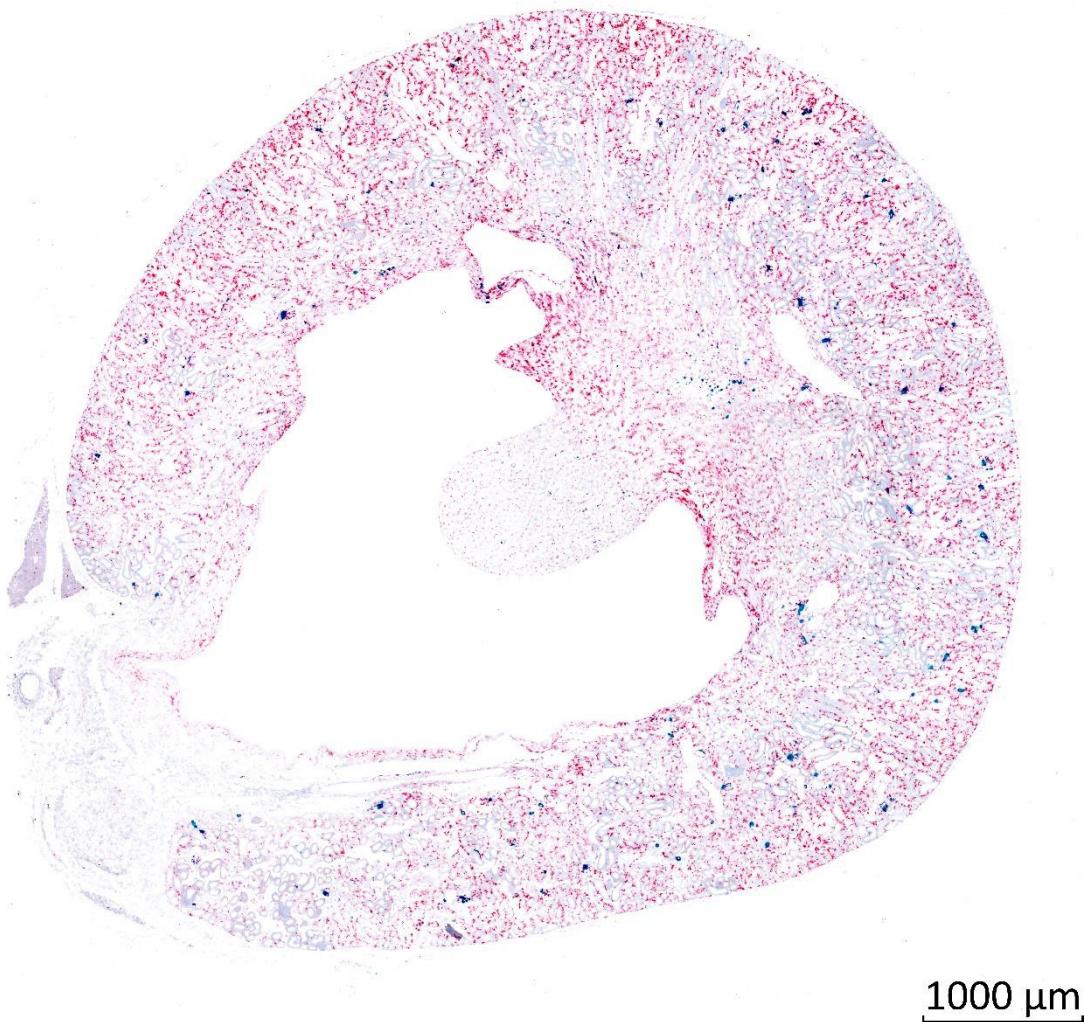


B: Furosemid



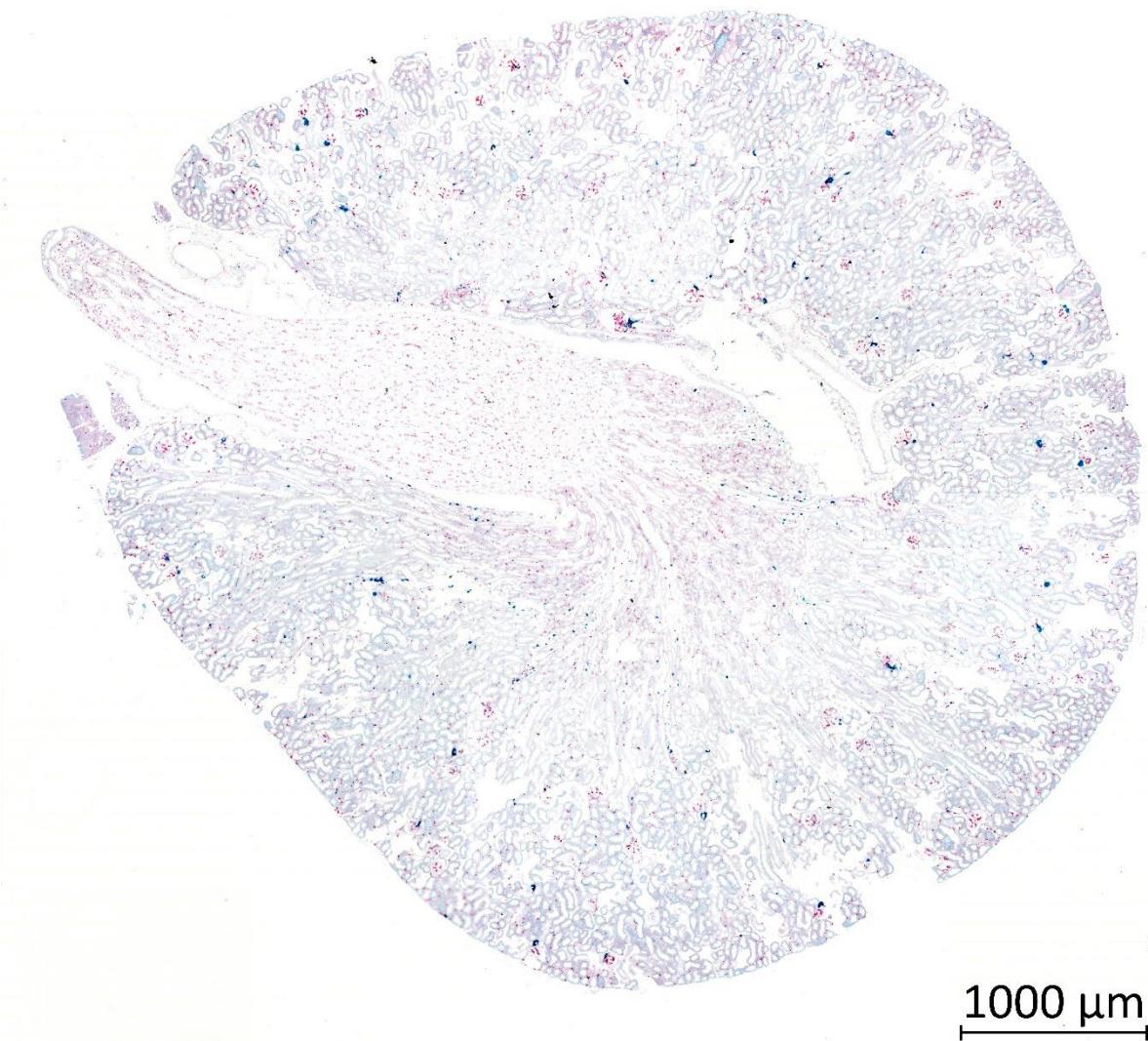
Im Vergleich zur Kontrolle fällt eine deutlich erhöhte Anzahl an Renin-mRNA-positiven Glomeruli auf. Auch die Intensität der Färbung an den einzelnen Glomeruli scheint erhöht.

C: Ureterligatur ipsilateral



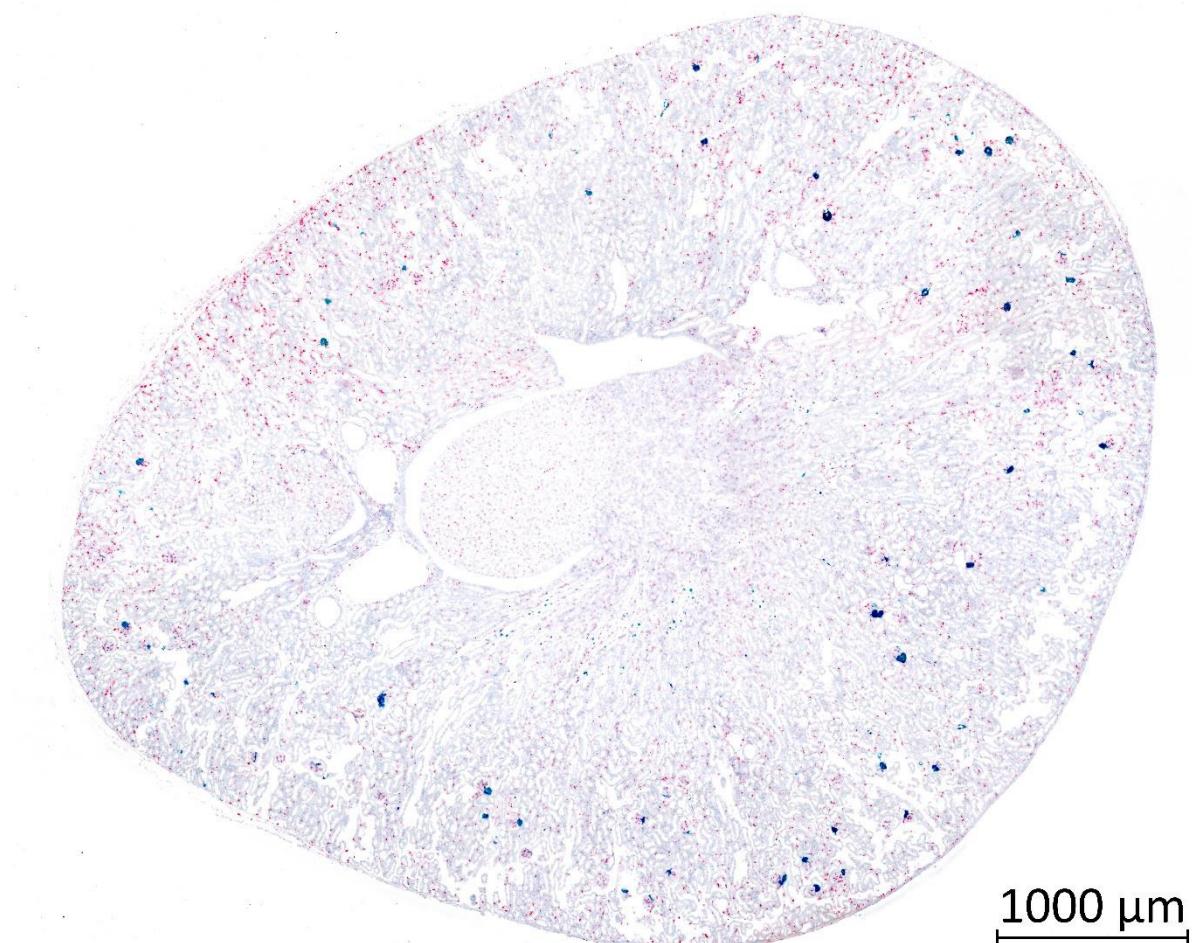
Im Vergleich zur Kontrolle fällt eine deutlichere Rotfärbung des Präparates auf. Dies ist durch die vermehrte (interstitielle) Fibrose und die damit verbundene Vermehrung des Interstitiums mit vermehrter PDGRB-mRNA zu erklären. Eine Erhöhung der Anzahl oder Intensität der glomerulären Renin-mRNA lässt sich nicht feststellen.

D: Ureterligatur kontralateral



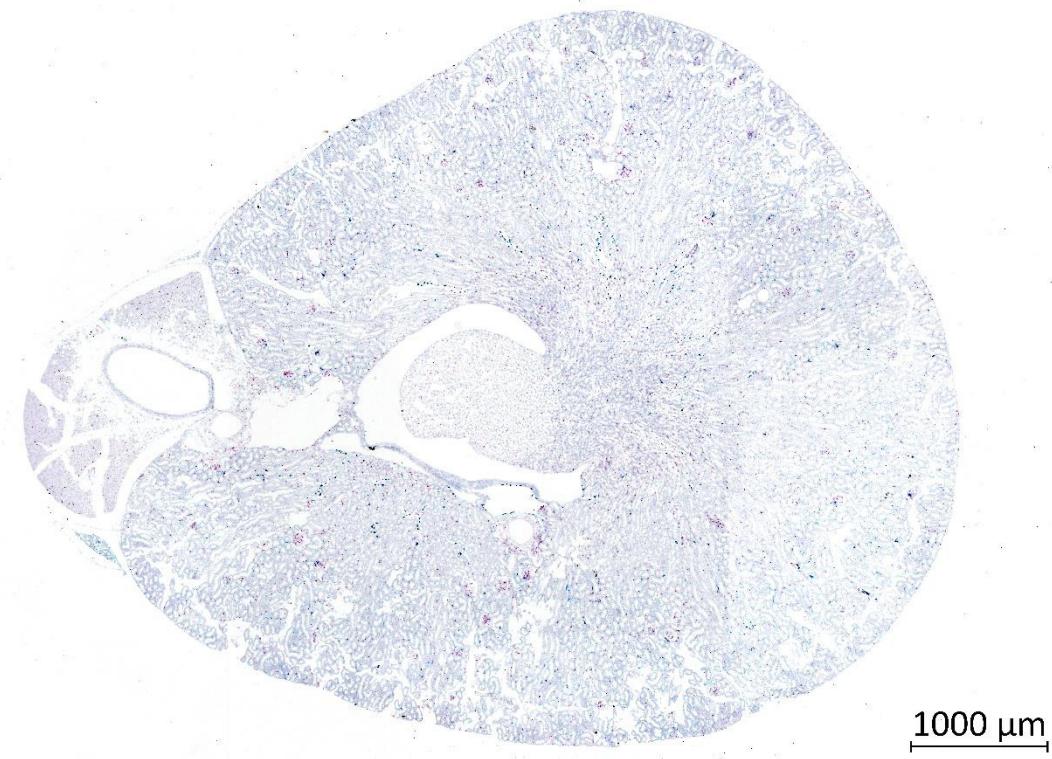
Im Vergleich zur Gegenseite ist die Rotfärbung deutlich reduziert; die interstitielle Fibrose ist nicht im selben Umfang vorhanden. Bezuglich der Intensität und Anzahl der Renin-mRNA-positiven Glomeruli lässt sich kein Unterschied zur Kontrolle feststellen.

E: Nierenarterienstenose ipsilateral



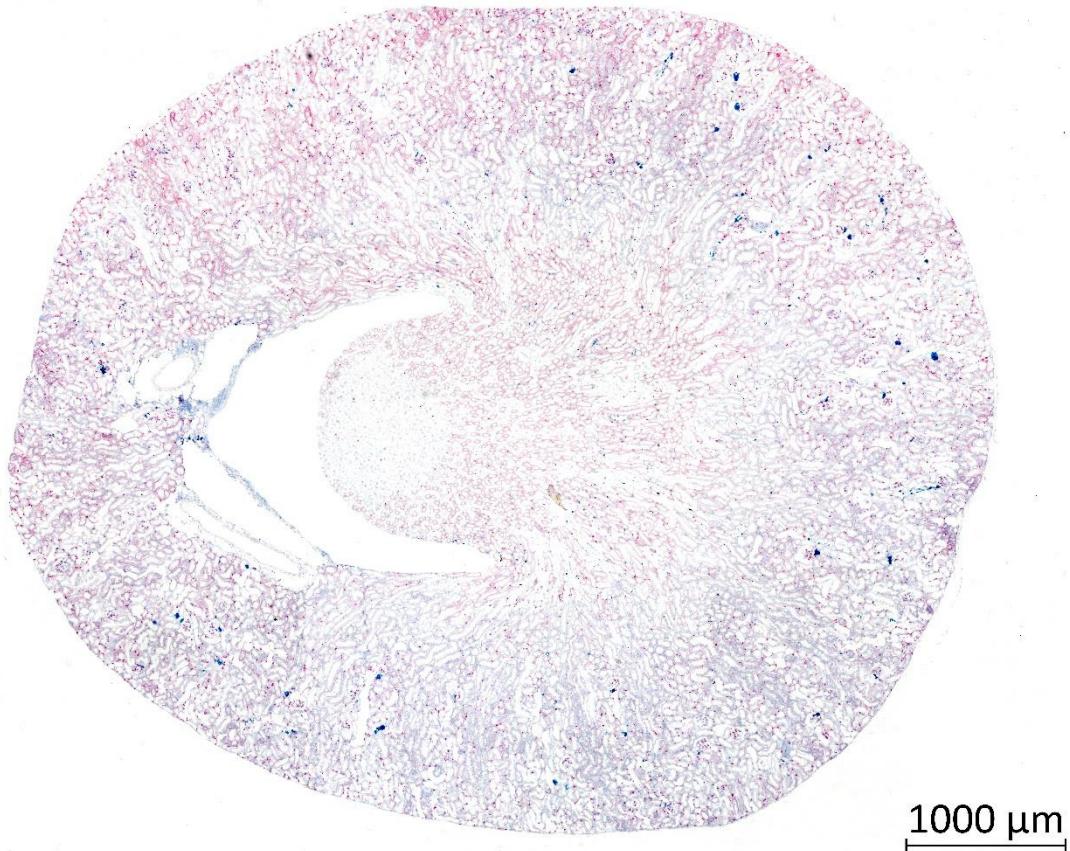
Hier wird im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Anzahl und Intensität der Renin-mRNA-Färbung im Bereich der Glomeruli deutlich.

F: Nierenarterienstenose kontralateral



Im Vergleich zur Kontrolle fällt eine deutlich geringere Intensität und Anzahl der Renin-mRNA-Färbung im Bereich der Glomeruli auf.

G: Diabetes mellitus, Typ I



Insgesamt ist das Präparat etwas rötlicher gefärbt als das Kontrollpräparat. Dies könnte auf eine beginnende diabetische Nierenfibrose hindeuten. Besonders zu beachten ist die lange Expositionsdauer gegenüber des Streptozotocins (6 Wochen) im Diabetesmodell der Mäuse aus der Versuchsreihe von Federlein im Vergleich zu den im Rahmen dieser Versuchsreihe operierten Mäusen (längste Versuchsdauer 14 Tage).

Hier wird keine deutliche Änderung der glomerulären Renin-mRNA hinsichtlich Intensität oder Anzahl der Glomeruli ersichtlich.

*Abbildung 20: semiquantitative Beurteilung hinsichtlich der Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA im Vergleich der verschiedenen Schädigungsmodelle*

## 5.2. Expression von Renin und Renin-mRNA durch interstitielle Zellen bei Nierenschädigung

### 5.2.1. Fehlender Nachweis von Renin auf Proteinebene im Interstitium

Die Existenz von Renin wurde mittels HRP-Färbung überprüft. Hierbei zeigte sich weder bei den Kontrolltieren noch bei einem der Tiere, die einem der Schädigungsmodelle zugeordnet waren, eine interstitielle Reninfärbung (siehe Abb. 21).

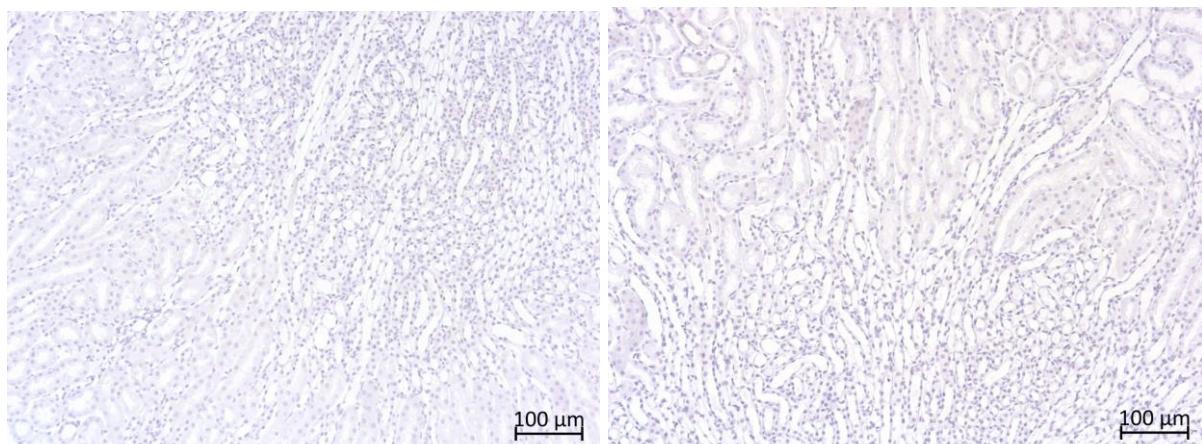


Abbildung 21: fehlender Nachweis von Reninprotein im renalen Interstitium

Es zeigt sich keine (messbare) Expression des Reninproteins (braune Färbung, nicht vorhanden; vgl. hierzu Abb. 18) im renalen Interstitium in der HRP-Färbung. Exemplarisch werden hier Ausschnitte aus Nieren gezeigt, die in ihrer glomerulären Reninproduktion deutlich stimuliert sind: links ipsilaterale Nierenarterienstenose, rechts Furosemid

### 5.2.2. Nachweis von Renin-mRNA in interstitiellen Zellen

Zunächst erfolgte eine *in situ*-Hybridisierung der STZ-Mäuse, die auch in der Arbeit von Federlein verwendet wurden, sowie von Kontrollmäusen aus dem Bestand jener Arbeit, mit Renin-mRNA. Es zeigte sich sowohl in den STZ-Tieren als auch in den Kontrollen ein Signal, dass sich durch seine Position dem renalen Interstitium zuordnen lässt (siehe Abb. 22).

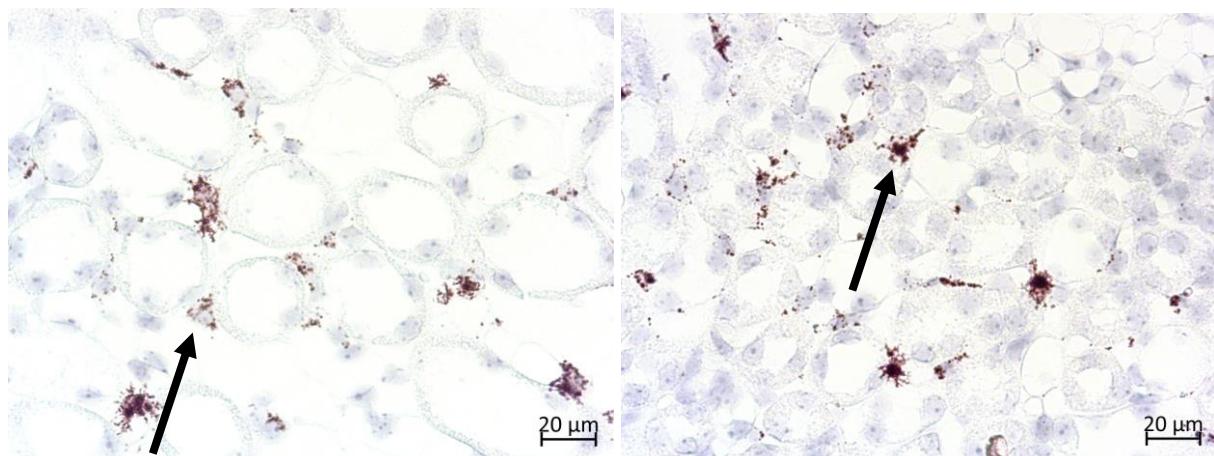


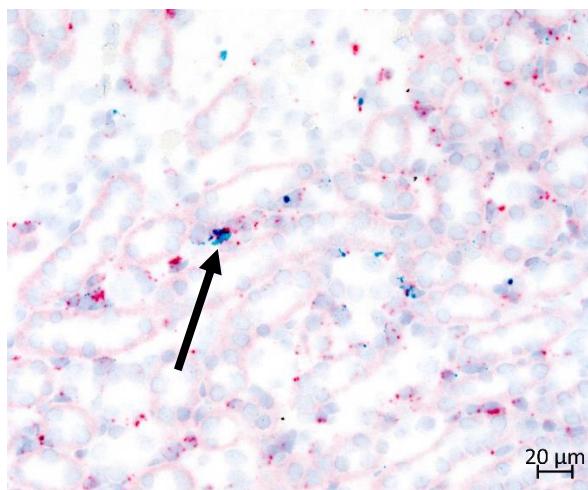
Abbildung 22: Nachweis von Renin-mRNA an interstitieller Position

Gezeigt wird die interstitielle Expression von Renin-mRNA (braune Färbung) in STZ-Mäusen (links) sowie Wildtyp-Kontrollmäusen (rechts).

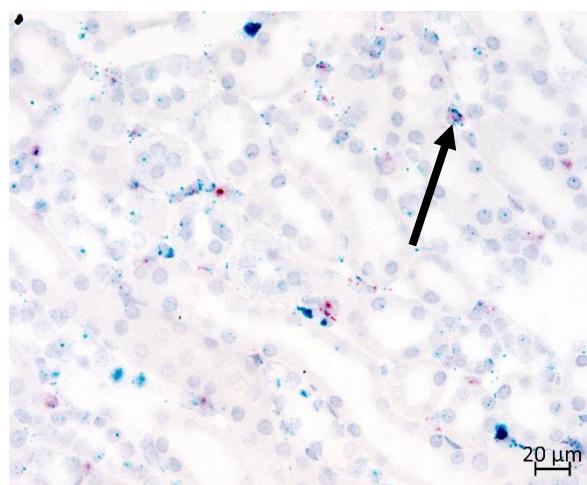
Im Folgenden wurde eine Co-in situ-Hybridisierung mit Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA als Marker für die interstitiellen Zellen durchgeführt. Es zeigte sich in allen Schädigungsmodellen sowie auch in den Kontrollmäusen an mehreren Stellen eine Kolokalisation zwischen den beiden verwendeten Markern. Insofern kann auf eine Expression von Renin-mRNA durch interstitielle Zellen geschlossen werden.

Markiert ist in Abb. 23 jeweils beispielhaft eine interstitielle Kolokalisationsstelle für jedes Schädigungsmodell.

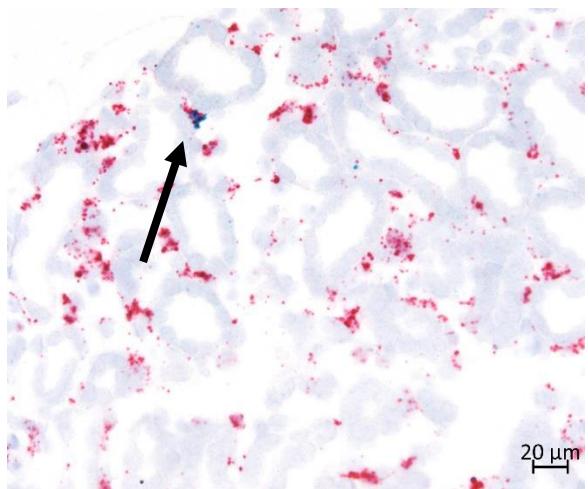
A: Kontrolle



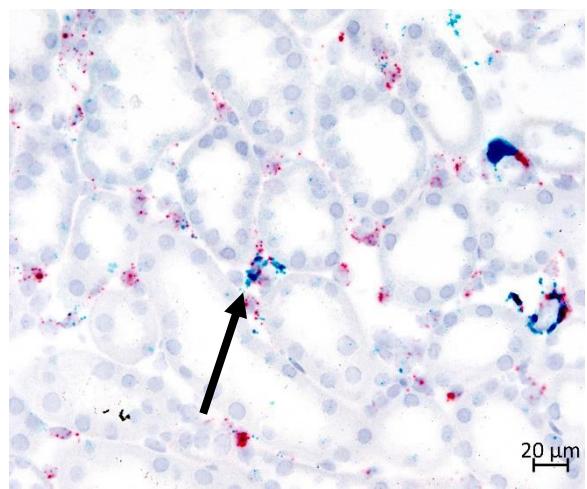
B: Furosemid



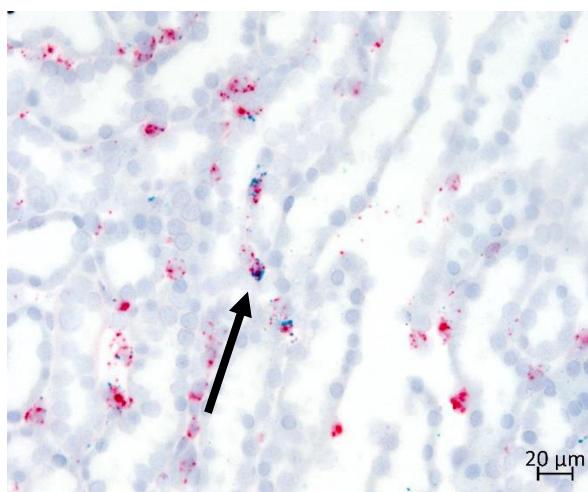
C: Ureterligatur ipsilateral



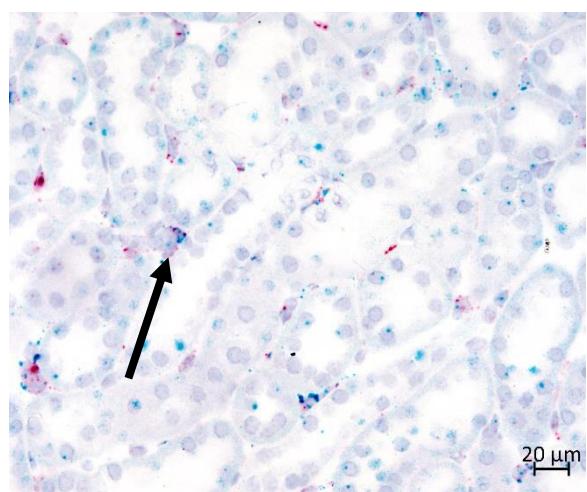
D: Ureterligatur kontralateral



E: Nierenarterienstenose ipsilateral



F: Nierenarterienstenose kontralateral



## G: Diabetes mellitus, Typ I

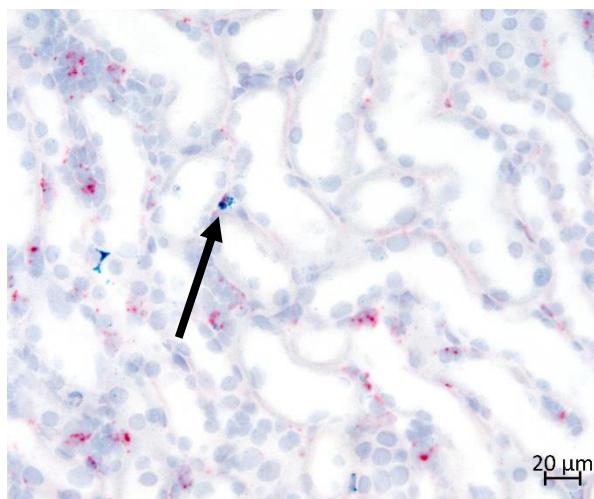
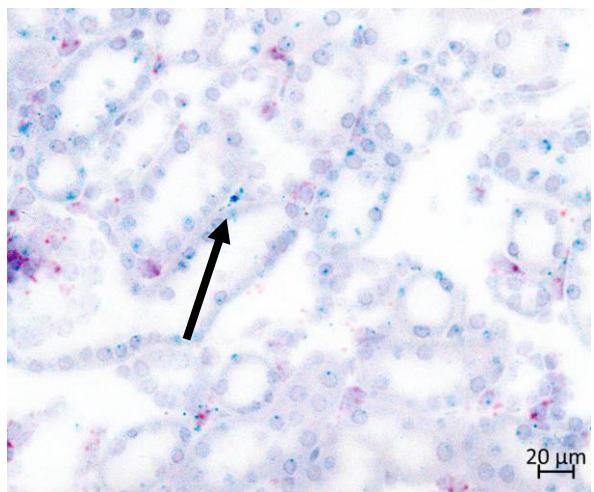


Abbildung 23: Kolokalisation von Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA im renalen Interstitium

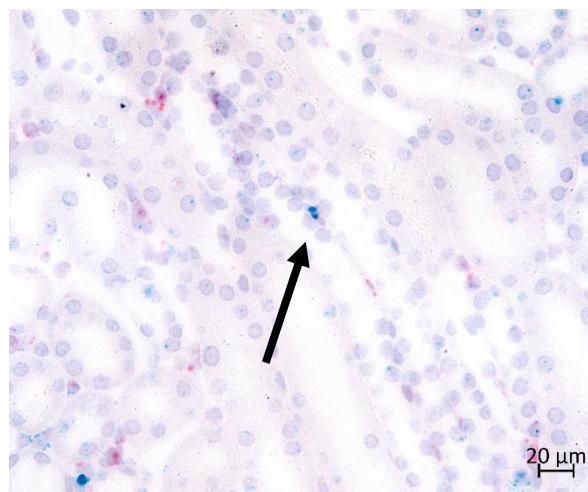
Gezeigt wird mit einem schwarzen Pfeil für jedes der Schädigungsmodelle sowie die Kontrolltiere exemplarisch je eine Kolokalisationsstelle von PDGFR $\beta$ -mRNA (rot) und Renin-mRNA (grün).

Hierbei ist zu beachten, dass nicht jede Renin-mRNA-positive Zellen im Interstitium gleichzeitig auch PDGFR $\beta$ -mRNA exprimiert. In Einzelfällen exprimierten auch PDGFR $\beta$ -mRNA-negative interstitielle Zellen Renin-mRNA. Beispielhaft sind in Abb. 24 von Kontrolltieren und Schädigungsmodellen interstitielle, Renin-mRNA-positive Zellen ohne gleichzeitige PDGFR $\beta$ -mRNA-Färbung gezeigt.

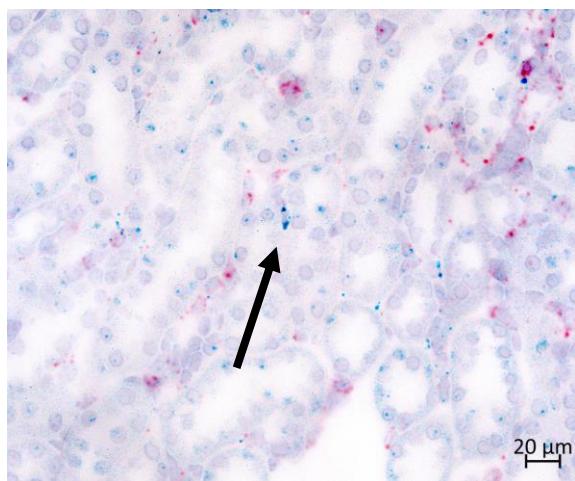
## A: Kontrolle



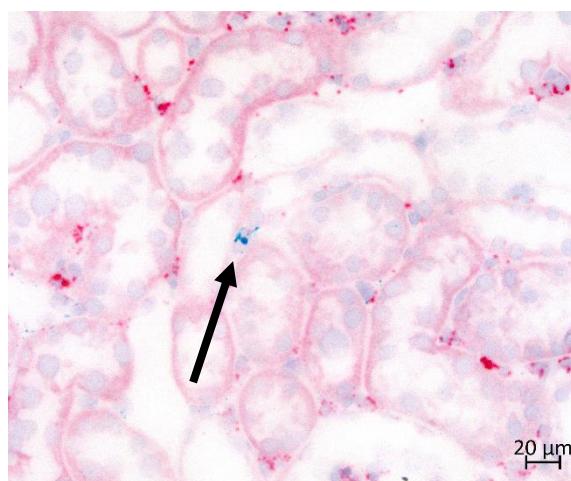
## B: Furosemid



C: Nierenarterienstenose ipsilateral



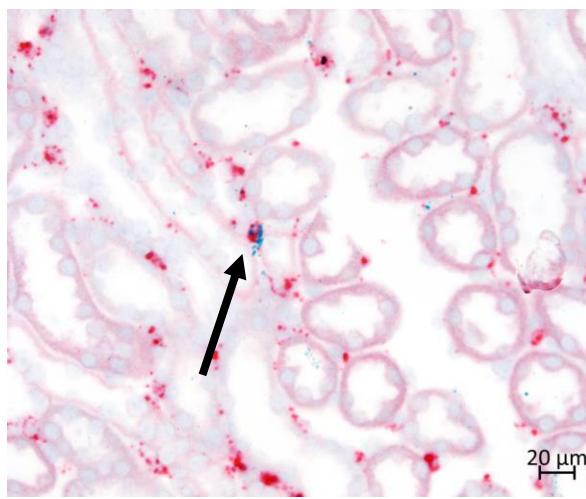
D: Diabetes mellitus

Abbildung 24: Renin-mRNA-positive Zellen im Interstitium ohne Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA

Bei zwei der Schädigungsmodelle (UUO, Nierenarterienstenose) wurde die Intensität der renalen Schädigung durch mehrere Expositionsdauern variiert. Insgesamt konnte jedoch festgestellt werden, dass die interstitielle Renin-mRNA-Färbung unabhängig von der Dauer der Schädigung ist; in allen untersuchten Expositionsdauern war die Färbung nachweisbar.

Abb. 25 zeigt die interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach unilateraler Nierenarterienstenose über 10 und 14 Tage.

A: Expositionsdauer 10 Tage



B: Expositionsdauer 14 Tage

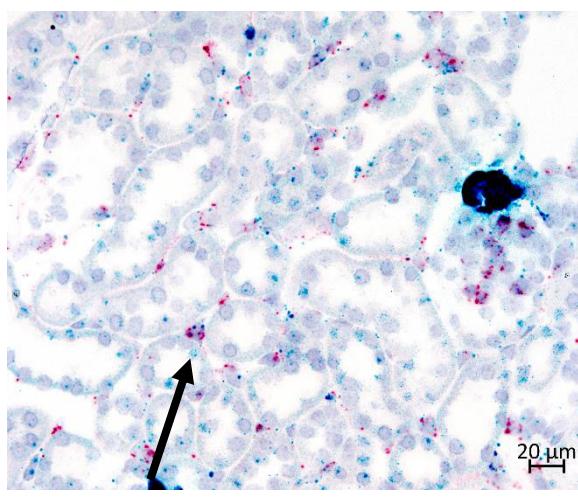
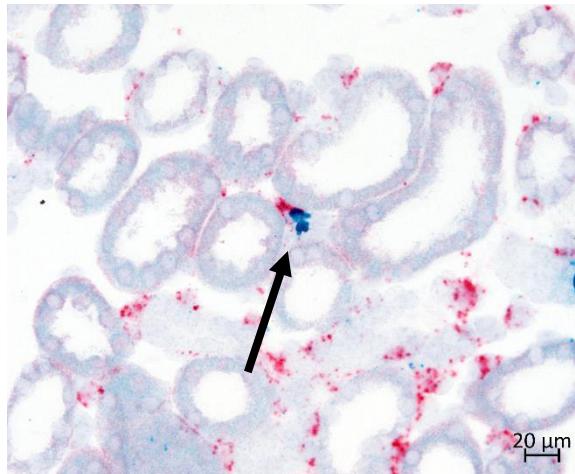
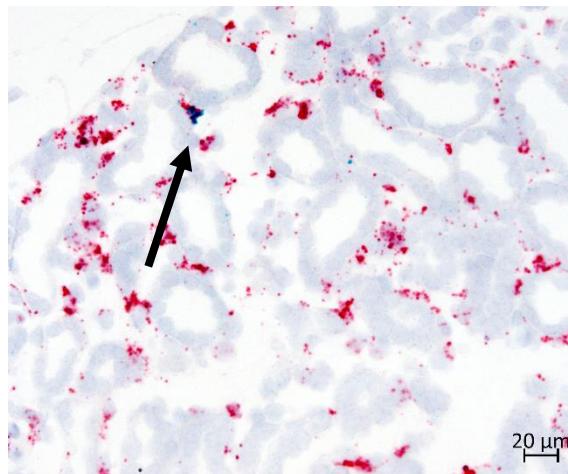
Abbildung 25: interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach verschiedenen Expositionsdauern der Nierenarterienstenose (Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA)

Abb. 26 zeigt die interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach unilateraler Ureterligatur über 5, 9 und 14 Tage.

A: Expositionsdauer 5 Tage



B: Expositionsdauer 9 Tage



C: Expositionsdauer 14 Tage

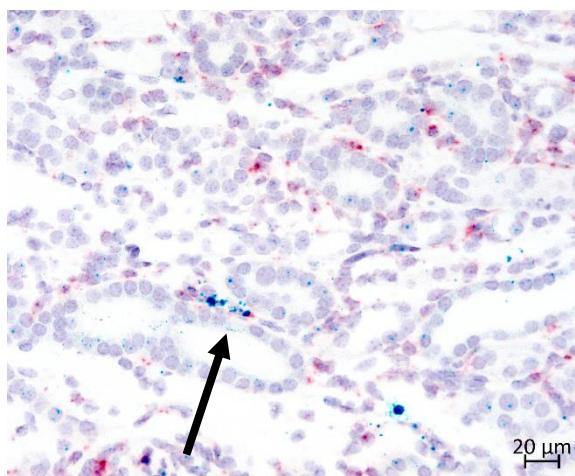
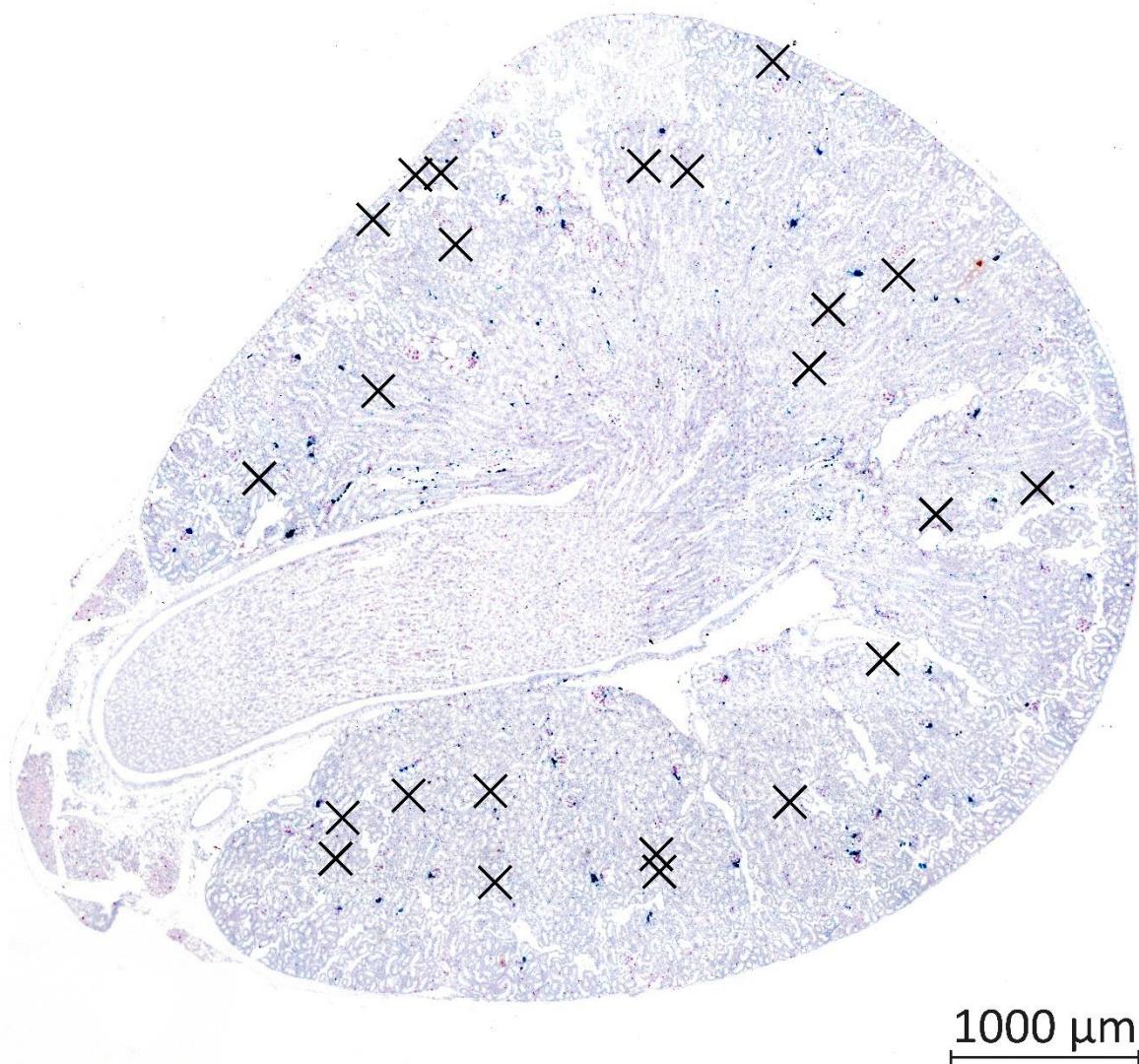


Abbildung 26: interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach verschiedenen Expositionsdauern der Ureterligatur (Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA)

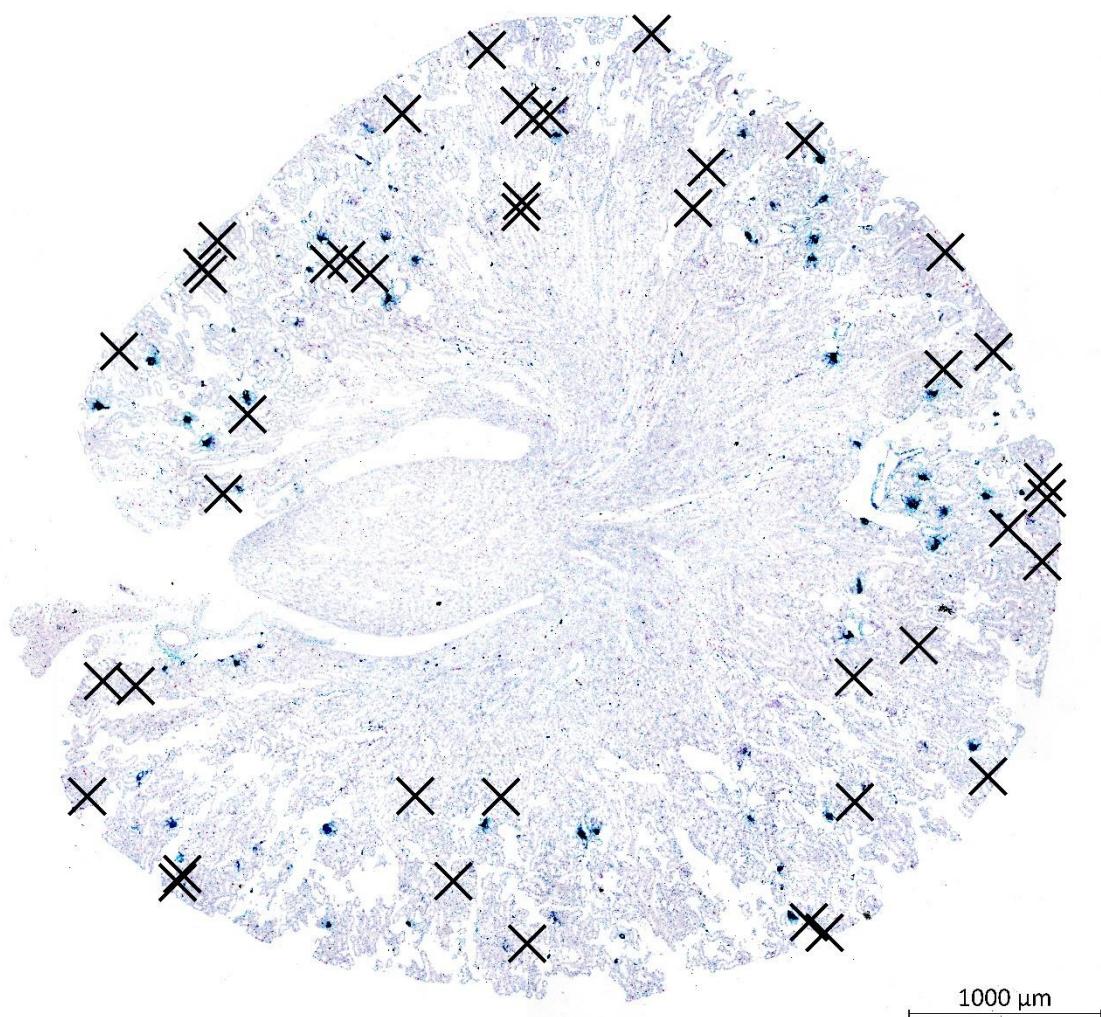
### 5.2.3. Topographische Verteilung interstitieller Renin-mRNA innerhalb der Mausniere

In Abb. 27 werden im Folgenden die in Kapitel 5.1.2 gezeigten Nierenschnitte erneut gezeigt. In diesem Fall sind die Stellen, an denen eine Kolokalisation der Renin-mRNA mit der PDGFR $\beta$ -mRNA vorhanden ist, markiert.

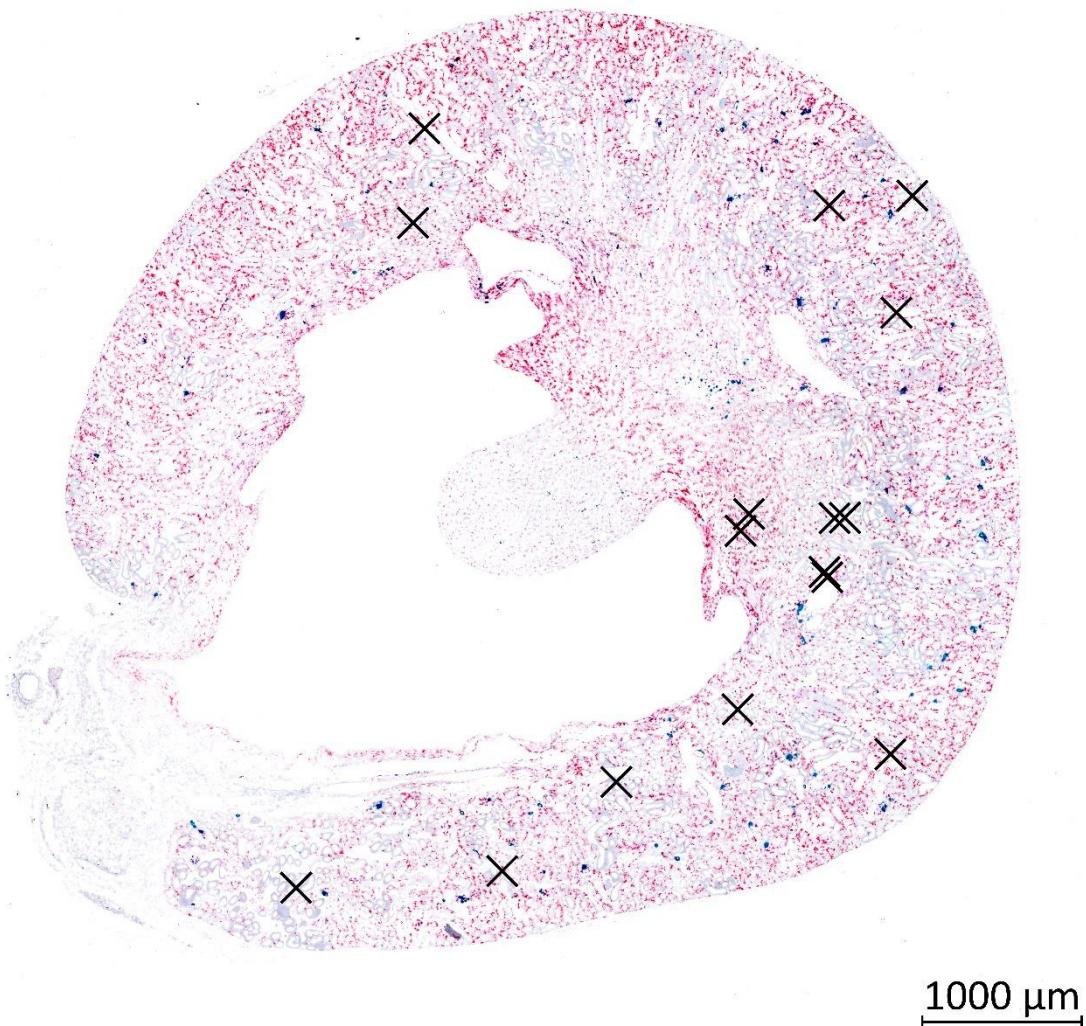
A: Kontrolle



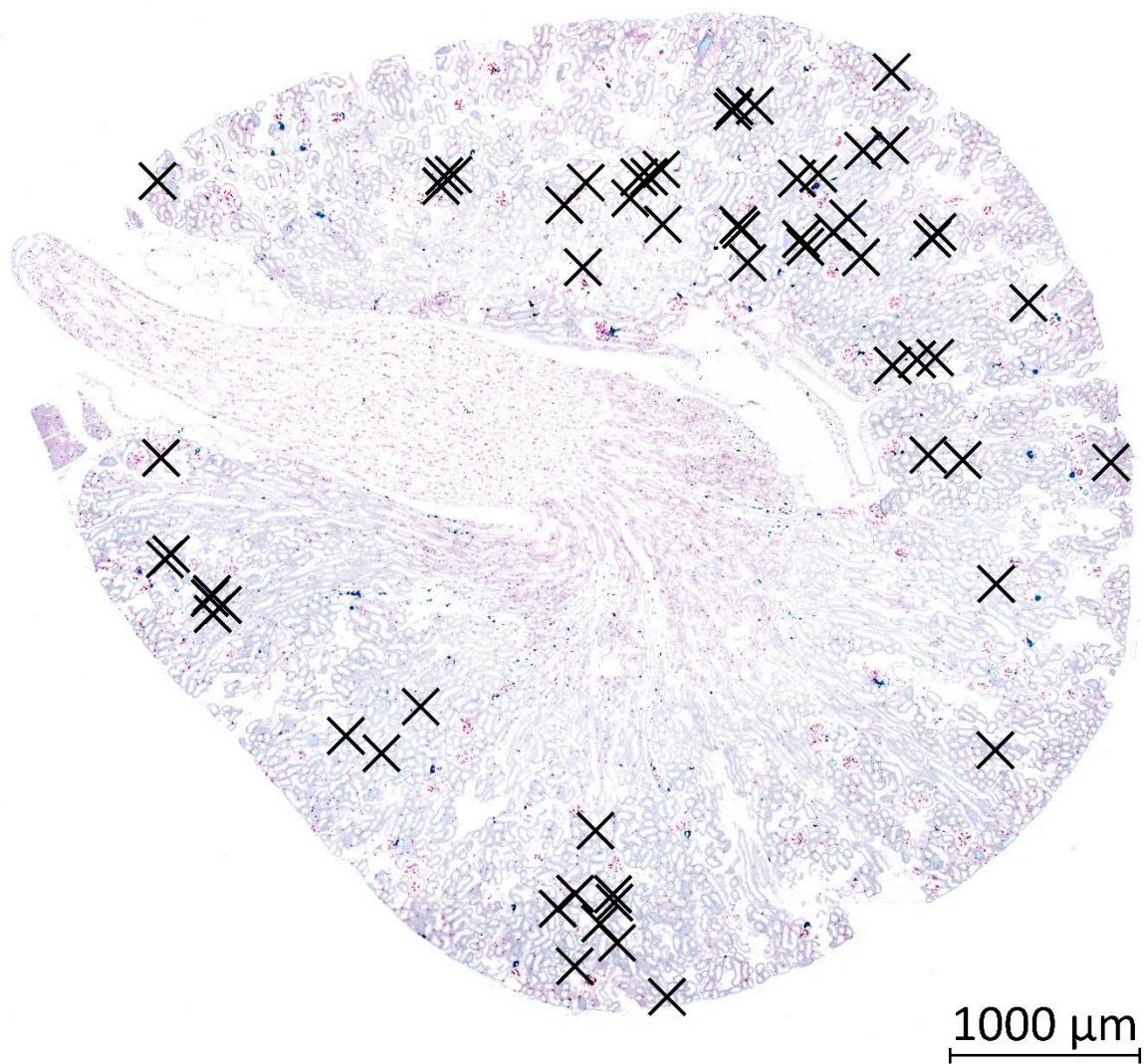
B: Furosemid



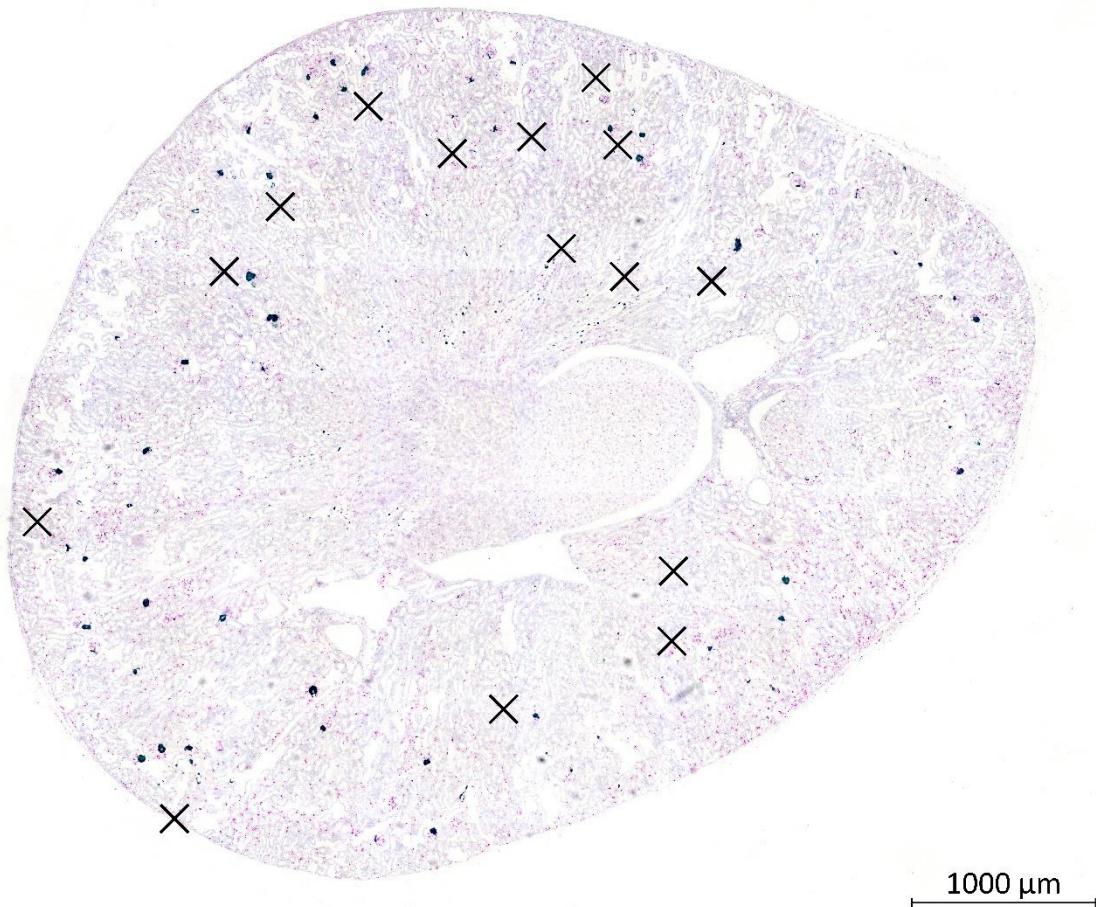
C: Ureterligatur ipsilateral



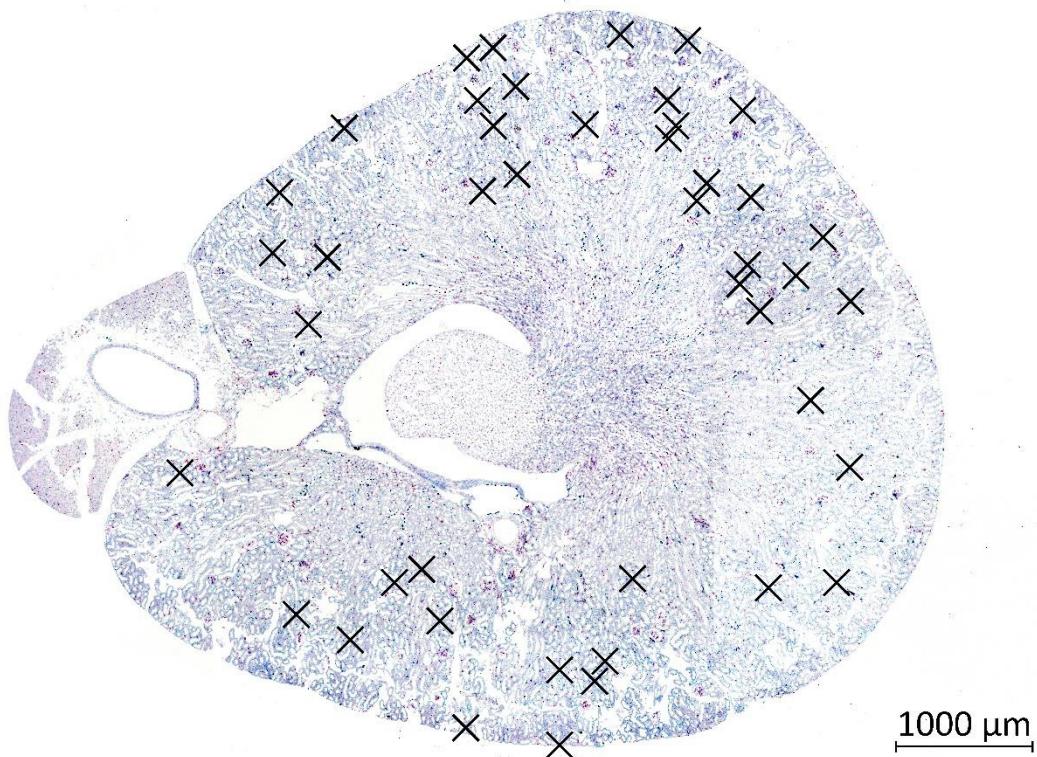
D: Ureterligatur kontralateral



E: Nierenarterienstenose ipsilateral



F: Nierenarterienstenose kontralateral



G: Diabetes mellitus, Typ I

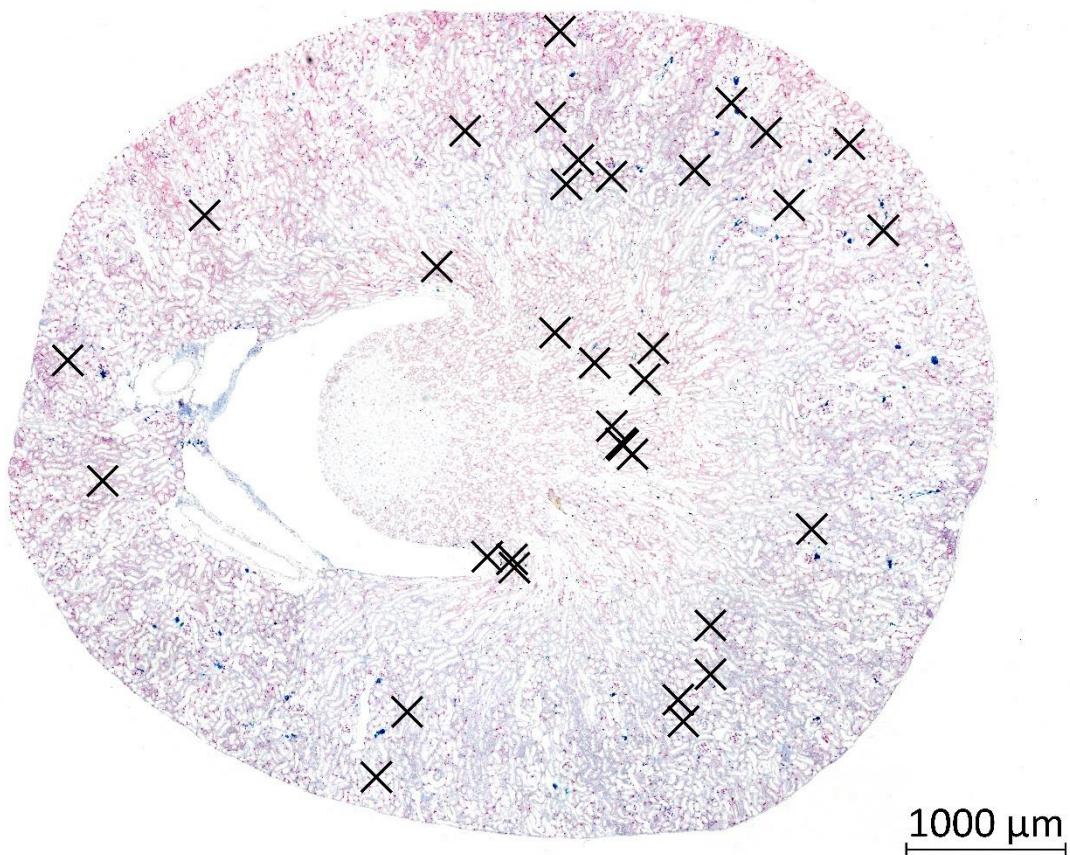


Abbildung 27: Vergleich der Anzahl und Lokalisation der Kolokalisationen von Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA zwischen den verschiedenen Schädigungsmodellen

Auffällig ist die Häufung der Kolokalisationsstellen im kortikalen Interstitium, wohingegen im marknäheren Interstitium nur sporadisch Kolokalisationsstellen auftreten.

Insgesamt lässt sich zwischen den verschiedenen Modellen kein deutlicher Unterschied hinsichtlich Anzahl und Lokalisation der Kolokalisationsstellen zwischen Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA feststellen.

## 6. Diskussion

### 6.1. Vergleich der Ergebnisse mit der Ursprungsarbeit von Federlein

Die Forschungsfrage dieser Arbeit wurde von Dr. rer. nat. Anna Federlein aufgeworfen. In Ihrer Dissertation hat Federlein unter anderem die Reninexpression der renalen Tubuluszellen bei STZ-induziertem Diabetes mellitus untersucht. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich in den STZ-Mäusen neben einer Renin-mRNA-Expression in Tubuluszellen auch eine Renin-mRNA-Expression im Interstitium (siehe Abb. 28).

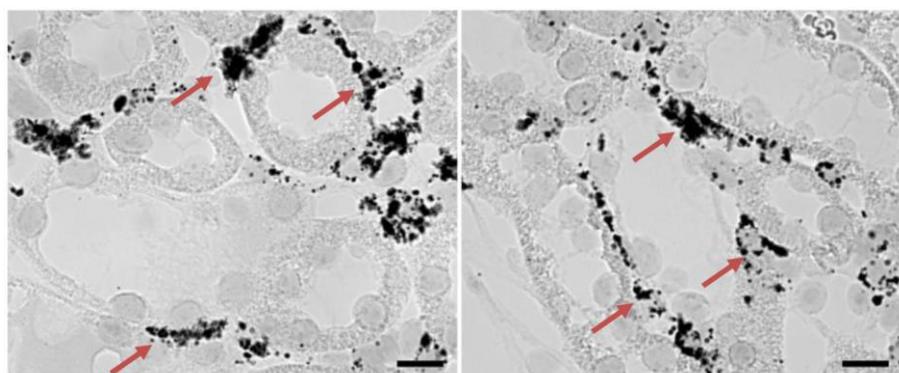


Abbildung 28: interstitielle Renin-mRNA-Expression in STZ-Mäusen

Federlein zeigt hier, dass in den Nieren der Wildtyp-Mäuse 8 Wochen nach Induktion des STZ-induzierten Diabetes eine Expression der Renin-mRNA im Interstitium nachzuweisen war. Maßstabsbalken: 20 µm.

[aus: Federlein A. Die funktionelle Rolle des tubulären Renin-Systems.]

Das Renin konnte in jener Arbeit auf Proteinebene interstitiell nicht nachgewiesen werden (72). Zur Herstellung einer Retest-Reliabilität und damit zur Vergleichbarkeit zu den Experimenten von Federlein wurde die *in situ*-Hybridisierung mit den Nieren der STZ-Mäuse aus der Versuchsreihe von Federlein wiederholt. Hier zeigte sich erneut ein interstitieller Nachweis von Renin-mRNA (vgl. Kap. 5.2.2, Abb. 22).

Die Zuordnung des positiven Renin-mRNA-Signals hat in der Arbeit von Federlein sowie in der ersten *in situ*-Hybridisierung dieser Arbeit aufgrund der Lokalisation des Signals stattgefunden. Um diese interstitielle Zuordnung des Signals zu bestätigen,

wurde die Methode in dieser Arbeit auf eine Co-in situ-Hybridisierung mit PDGFR- $\beta$ -mRNA erweitert. Dieser Marker wird beispielsweise von Perizyten als Teil des renalen Interstitiums exprimiert (110) (111). Die Verwendung eines perizytären Markers bot sich deswegen an, da beispielsweise in der Nephrogenese und postnatalen murinen Niere eine perizytäre Expression von Renin durch PDGFR $\beta$ -positive Zellen nachgewiesen werden konnte (20). Insofern schien es durchaus möglich, dass die interstitielle Renin-mRNA-Produktion durch Perizyten vollzogen wird.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich neben der zu erwartenden Expression von Renin-mRNA in den STZ-Tieren jedoch auch eine Renin-mRNA-Expression im renalen Interstitium bei den Wildtyp-Kontrollmäusen aus der Versuchsreihe von Federlein. Darüber hinaus wurden auch die Nieren weiterer Kontrolltiere herangezogen, bei denen sich ebenfalls eine interstitielle Renin-mRNA-Expression nachweisen ließ. Diese mRNA-Expression bei den Kontrolltieren wird von Federlein nicht beschrieben (72). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine Co-in situ-Hybridisierung von Renin-mRNA mit einer Marker-mRNA für interstitielle Zellen in der Versuchsreihe von Federlein nicht stattgefunden hat. In diesem Zusammenhang kann interstitielle Renin-mRNA (besonders in kleinen Mengen) nicht sicher von tubulärer Renin-mRNA unterschieden werden. Insofern erscheint eine Zuordnung interstitieller Renin-mRNA zum tubulären Kompartiment in jener Arbeit durchaus möglich.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Ergebnis bestätigt werden, dass interstitielles Renin bei den Kontrolltieren auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte. Aus versuchstechnischen Gründen konnten die STZ-Tiere aus der Versuchsreihe von Federlein auf interstitielles Renin nicht untersucht werden. Es wurden jedoch andere Nierenschädigungsmodelle auf die interstitielle Expression von Renin untersucht. Da Federlein keine interstitielle Reninfärbung detektieren konnte, wurde in dieser Arbeit auf eine andere Nachweismethode zurückgegriffen; auch mittels HRP-Färbung konnte jedoch kein interstitieller Reninnachweis erbracht werden.

Die Ergebnisse der STZ-Tiere durch Federlein fallen insofern analog zu denen der anderen Schädigungsmodelle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, aus, als auch hier zwar interstitiell Renin-mRNA nachgewiesen wurde, aber kein Renin-Protein durch eine Antikörper-Färbung detektierbar war.

## 6.2. Auswahl der Mausmodelle

Die UUO ist ein etabliertes Modell der Nierenfibrose, das zumindest kurzfristig (innerhalb von 24 Stunden) zu einer Verstärkung des juxtaglomerulären Renin-Signals, aber auch zu einer Expression von Renin durch Mesangiumzellen oder Tubuluszellen führt (112) (113). Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass es im Rahmen der UUO zu einer Nachrekrutierung weiterer reninbildender Zellen über den juxtaglomerulären Apparat hinaus kommt. Übertragen auf einen weiteren renalen Zelltyp erscheint eine Nachrekrutierung auch interstitieller Zellen zur Reninproduktion im Rahmen der UUO möglich. Eine komplette UUO führt im Zeitraum von ein bis zwei Wochen bei Mäusen zu einer Hydronephrose der Niere mit deutlichem Verlust des Nierenparenchyms (100). Um mögliche langfristigere Veränderungen der interstitiellen Reninproduktion nachvollziehen zu können, wurde in dieser Arbeit Kohorten von Nieren nach 5, 10 und 14 Tagen zu den Versuchen herangezogen; semiquantitativ zeigte sich kein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Reninproduktion: In allen Nieren konnte interstitielle Renin-mRNA nachgewiesen werden, jedoch kein interstitielles Reninprotein.

Auch im Rahmen des ClCnk2-Knockouts zeigte sich eine deutliche Stimulation der juxtaglomerulären Reninproduktion: Castrop et al. berichten von einer deutlich verstärkten juxtaglomerulären Reninexpression sowie von einem Recruitment von Zellen des renalen Gefäßbaums zur Reninproduktion. Eine Neurekrutierung liegt also in diesem Modell ebenfalls vor (54). Über eine interstitielle Reninproduktion wird von den Autoren jedoch nicht berichtet; aus diesem Grund erfolgte eine Untersuchung der Nieren der ClCnk2-Knockout-Mäuse auf interstitielles Renin in dieser Arbeit. Aus versuchstechnischen Gründen war eine *in situ*-Hybridisierung auf PDGFR $\beta$ - oder Renin-mRNA im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zur Modellierung der pathophysiologischen Zusammenhänge der Nierenarterienstenose wurde ein Clipping der Nierenarterie durchgeführt. Insgesamt wurde so eine 2K1C-Situation (92) hergestellt: Bei zwei vorhandenen Nieren wurde die Arterie einer Niere mit einem Clip versehen. Die Pathophysiologie der 2K1C-Nierenarterienstenose bezogen auf das RAAS lässt sich in drei Phasen einteilen: In der Frühphase kommt es zur vermehrten RAAS-Aktion in beiden Nieren mit daraus folgender Hypertension. In der Übergangsphase kommt es in der stenosierten Niere

zu einer RAAS-Überfunktion und einer daraus folgenden weiteren systemischen Hypertension. In der nicht stenosierten Niere kommt es zu einer kompensatorischen RAAS-Hemmung. Insgesamt ist in dieser zweiten Phase der Plasmareninspiegel vermindert. In der chronischen Phase kommt es zum Versagen der stenosierten Niere aufgrund niedrigen Perfusionsdrucks (92). Es lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere sich zum Ende des Versuchs in der zweiten oder dritten Phase befanden, da sich in den zur Stenose kontralateralen Nieren ein deutlich geringeres Reninlevel (sichtbar an reduziertem glomerulärem Renin-Protein-Signal) zeigte. Da keine Messung des Renin-Plasmaspiegels erfolgte, kann jedoch keine genauere Zuordnung getroffen werden. Insgesamt zeigte sich sowohl eine Erhöhung der Anzahl der Renin-mRNA-positiven Glomeruli als auch eine Erhöhung der Färbungsintensität bezogen auf ein einzelnes reninpositives Glomerulum. Insofern scheint das Renin-Stimulationsmodell korrekt funktioniert zu haben.

Im Furosemid-Modell spielen besonders der Verabreichungsweg sowie die Dosis des Medikaments eine Rolle. Nüsing et al. haben bereits die vermehrte glomeruläre Expression von Renin-mRNA nach oraler Furosemidgabe festgestellt (114). Den in diesen Experimenten verwendeten C57BL/6-Mäusen wurde über das Trinkwasser Furosemid in einer Dosis von 1 mg/ml Trinkwasser über sieben Tage verabreicht. In der vorliegenden Versuchsreihe wurde die Furosemid-Dosis auf 0,4 mg/ml Trinkwasser festgesetzt. Im Gegenzug wurde die Versuchsdauer gegenüber der der Experimente von Nüsing et al. auf bis zu 10 Tage verlängert. Eine Dosis ähnlicher Größenordnung verwendet Saleem et al. zum Recruitment und zur JG-Zell-Expansion: In deren Versuchsreihe wurde über eine Expositionsdauer von 10 Tagen C57/BL6-Mäusen eine Furosemid-Dosis über Trinkwasser von 2,28 mmol/l gegeben (115). Bei einem Molekulargewicht von Furosemid von 330,74 g/mol entspricht dies einer Dosis von 0,75 mg/ml Trinkwasser.

Eine Überwachung der Experimente fand in der vorliegenden Arbeit durch die Messung der täglichen Trinkmenge der Mäuse statt. Hierbei zeigte sich eine auf das im Durchschnitt 3,4-fache gesteigerte Trinkmenge der Mäuse, deren Trinkwasser mit Furosemid versetzt war, im Vergleich zu der Trinkmenge der Kontrollmäuse. Insofern kann von einer gesteigerten Diurese und einer daraus folgenden zufriedenstellenden RAAS-Stimulation ausgegangen werden.

Das STZ-Modell ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung des Diabetes mellitus. Insbesondere werden bereits seit Längerem Untersuchungen des RAAS im STZ-Nagermodell durchgeführt (116) (117).

In der Arbeit von Federlein wurde den Mäusen über fünf Tage intraperitoneal STZ verabreicht. Danach wurde der Blutglucosespiegel gemessen; bei einem Wert über 300 mg/dl wurde das jeweilige Tier in die Versuchsgruppe mit aufgenommen (72). Bei einem physiologischen murinen Blutzuckerspiegel von 100-200 mg/dl (118) ist hier also eine klare Erhöhung Voraussetzung für eine Zuordnung zur Versuchsgruppe. Insofern kann also von einer zufriedenstellenden Provokation der pathophysiologischen Veränderung des Diabetes mellitus ausgegangen werden.

### **6.3. Nachweis der Renin-mRNA im Interstitium bei fehlendem Nachweis des Renin-Proteins**

Zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist ein Nachweis interstitieller Renin-mRNA in den Kontrolltieren sowie darüber hinaus in allen Schädigungsmodellen; eine deutliche Stimulation der interstitiellen Renin-mRNA-Menge in den Schädigungsmodellen im Vergleich zu den Kontrolltieren ließ sich semiquantitativ nicht feststellen. Der Nachweis von interstitiellem Renin auf Proteinebene konnte in keinem der verwendeten Tiere erbracht werden.

#### ***6.3.1. Methodenbasierte Überlegungen zur weiteren Erforschung interstitieller reninproduzierender Zellen***

Möglich erscheint auch eine lediglich geringe Menge an produziertem Renin. Die HRP-Färbung bietet im Vergleich zur *in situ*-Hybridisierung eine geringe Sensitivität, sodass die synthetisierte Reninmenge zu gering für einen Nachweis in der HRP-Färbung sein könnte. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch Federlein in der Immunfluoreszenzfärbung kein Renin im Interstitium nachweisen konnte (72). Im Vergleich der beiden Färbemethoden Immunfluoreszenzfärbung – HRP-Färbung erscheinen beide in etwa gleich sensitiv: Die CICnk2-Knockout-Mäuse, in deren Nieren

von Castrop et al. eine tubuläre Reninproduktion mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, zeigten auch im Rahmen dieser Versuchsreihe in der HRP-Färbung Hinweise auf eine tubuläre Reninproduktion (siehe Abb. 29 und Abb. 30).

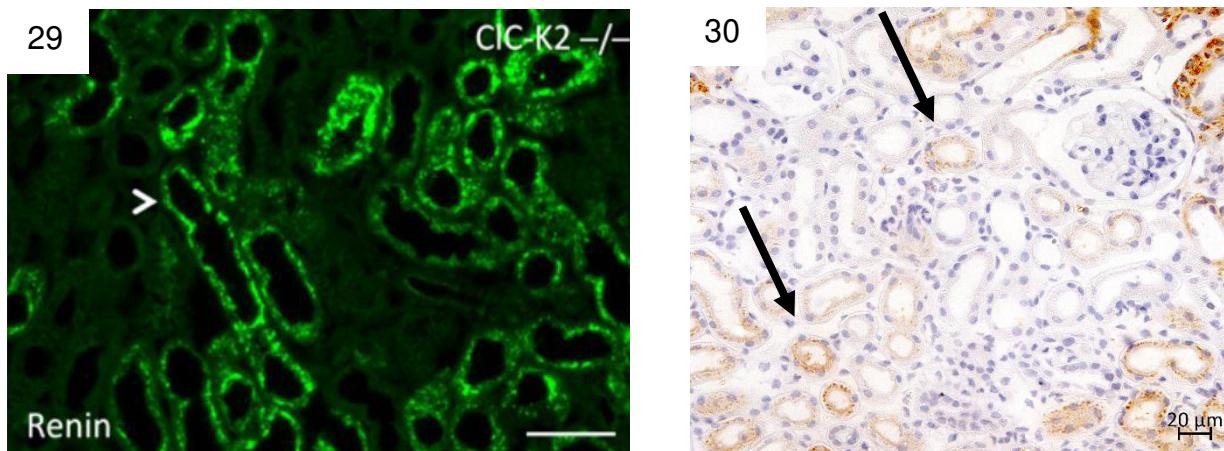


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von tubulärem Renin in ClCnK2-Knockout-Mäusen

[Maßstabsbalken: 50 µm; aus: Grill A, Schießl IM, Gess B, Fremter K, Hammer A, Castrop H. Salt-losing nephropathy in mice with a null mutation of the Clcnk2 gene. *Acta Physiol (Oxf)* 2016; 218(3):198–211. doi: 10.1111/apha.12755.]

Abbildung 30: HRP-Färbung von tubulärem Reninverhalten in ClCnK2-Knockout-Mäusen

[eigene Aufnahme]

Insgesamt zeigt sich in den beiden Färbungen ein ähnliches tubuläres Reninfärbungsverhalten, weshalb eine ähnliche Sensitivität der beiden Nachweismethoden naheliegt. Dass tubuläres Renin nur in diesem Modell des extrem stimulierten RAAS mit den Methoden eindeutig nachgewiesen werden kann, spricht für eine unzureichende Sensitivität der Nachweismethoden für tubuläres Renin in den weniger extrem stimulierten RAAS-Zuständen der anderen untersuchten Schädigungsmodelle.

Um weitere Hinweise auf eine Reninbildung der interstitiellen Zellen zu finden, könnte eine Überprüfung des Interstitiums auf Marker von reninbildenden Zellen stattfinden. Hierfür bietet sich beispielsweise die Aldose-Ketoreduktase 1B7 (Akr1b7) an: Nach Brunskill et al. ist dieses Enzym ein Marker, der in vielen reninproduzierenden Zellen

vorliegt (119). Neben einem Nachweis auf Proteinebene kann auch der Nachweis der Akr1b7- mRNA einen Hinweis auf eine interstitielle Reninexpression geben.

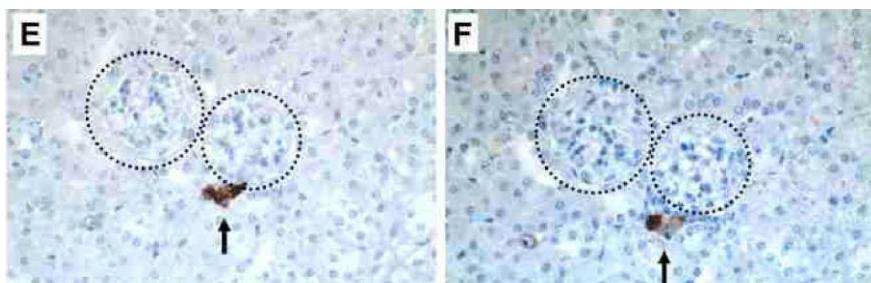


Abbildung 31: Koexpression von Akr1b7 und Renin in der Mausniere

Zu erkennen ist eine Kolokalisation von Akr1b7 (E) und Renin (F). Die Kreise zeigen Glomeruli an.

[aus: Lin EE, Pentz ES, Sequeira-Lopez MLS, Gomez RA. Aldo-keto reductase 1b7, a novel marker for renin cells, is regulated by cyclic AMP signaling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2015; 309(5):R576-84. doi: 10.1152/ajpregu.00222.2015.]

Es muss berücksichtigt werden, dass eine Expression von Genen, die für reninbildende Zellen typisch ist, nicht automatisch auch eine Reninproduktion der jeweiligen Zelle beweist. Insbesondere scheinen besonders juxtaglomeruläre Zellen Akr1b7-positiv zu sein (siehe Abb. 31). Insofern könnte selbst die Expression dieses Markers höchstens einen Hinweis auf eine mögliche Produktion von Renin geben.

Reninbildende Zellen besitzen nicht nur molekularbiologische Merkmale. Auch auf Genom-Ebene sind bestimmte Eigenschaften dieser Zellgruppe erforscht. So befindet sich nach Martinez et al. am Genlocus des Reningens ein Renin-Superenhancer, der Kennzeichen der reninbildenden Zellen ist. Diese Schlussfolgerung bauen die Autoren auf den Erkenntnissen auf, dass der Superenhancer nicht nur in JG-Zellen, sondern auch im Rahmen eines Recruitments generierten reninbildenden Zellen vorhanden ist. Sollten interstitielle Zellen von Grund auf oder auch im Rahmen eines Stimulus zur Reninproduktion befähigt sein, sollte dieser Superenhancer auch dort auftreten (120). Eine Messung der Reninaktivität im Gewebe ist ebenfalls möglich. Um die extraglomeruläre Reninbildung zu untersuchen, erscheint eine solche Messung im Bereich des Nierenmarks sinnvoll, da dort keine Glomeruli vorhanden sind. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass dann keine Unterscheidung getroffen werden

kann zwischen interstitiell und tubulär gebildetem Renin. Dazu müssten weitere Untersuchungen *in vitro* (Zellkultur) an isolierten interstitiellen Zellen erfolgen. Zusammenfassend kann nur eine Kombination von Merkmalen reninbildender Zellen einen weiteren Hinweis auf eine interstitielle Reninproduktion geben.

### ***6.3.2. Vergleich mit anderen Nierenmodellen zur Stimulation der Reninproduktion***

Zentrales Ergebnis der Arbeit ist der Nachweis von Renin-mRNA im Interstitium, während hingegen das Renin-Protein im Interstitium nicht nachgewiesen wurde. Dies deckt sich nicht nur mit den Ergebnissen von Federlein (bereits diskutiert in Kapitel 6.1 dieser Arbeit). Auch Untersuchungen, die auf andere Schädigungsmodelle mit erhöhter RAAS-Aktivität zurückgreifen, haben Ergebnisse erbracht, die mit denen dieser Arbeit vereinbar sind: Makhanova et al. untersuchten mithilfe von Immunfärbung die Reninexpression in Mäusen, bei denen die Aldosteronproduktion durch Knockout der Aldosteron-Synthase nicht möglich war. Durch einen negativen Feedbackmechanismus kommt es dabei zur Stimulation der Reninproduktion. Die Autoren dieser Studie berichten zwar von einer deutlich erhöhten Reninexpression auf Proteinebene im JGA im Vergleich zu den Kontrolltieren sowie einem Recruitment reninbildender Zellen entlang der afferenten Arteriolen, aber nicht von einer interstitiellen Reninexpression auf Proteinebene (121). Broeker et al. haben Aldosteron-Synthase-Knockout-Mäuse ebenfalls im Hinblick auf interstitielle Reninexpression untersucht, allerdings auf mRNA-Ebene. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Versuchsreihe zeigte sich interstitiell eine Renin-mRNA-Expression, allerdings kein Renin auf Proteinebene (Vortrag, Kongress der Deutschen nephrologischen Gesellschaft, Oktober 2021, Rostock).

Unter ACE-Inhibition zeigten sich ähnliche Beobachtungen: Es fand sich ein erhöhter Anteil an reninpositiven Glomeruli; eine interstitielle Reninexpression auf Proteinebene wird aber nicht beschrieben (122).

Ein anderes Modell zur Untersuchung der pathophysiologischen Prozesse der Nierenfibrose ist die unilaterale Nephrektomie. Okada et al. haben hier die Lokalisation von Renin und Renin-mRNA bei TGF $\beta$ -überexprimierenden Mäusen untersucht. In diesem extremen Modell der Fibrosevorgänge konnte Renin-mRNA in interstitiellen

Fibroblasten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte immunhistochemisch auch Renin an interstitieller Lokalisation detektiert werden. Interessanterweise konnte jedoch interstitielle Renin-mRNA bei den Kontrolltieren in jener Arbeit nicht nachgewiesen werden (123); hier besteht also eine Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen. Die interstitielle Reninexpression wurde in jener Arbeit aufgrund der Lokalisation der Renin-mRNA-positiven Zellen festgestellt; eine Co-in situ-Hybridisierung oder Co-Immunofärbung hat hier nicht stattgefunden. Insofern erscheint eine eindeutige Zuordnung zu interstitiellen Fibroblasten zumindest diskussionswürdig (siehe Kap. 6.1: Vergleich mit den Ergebnissen der Arbeit von Federlein).

### **6.3.3. Ursprung der reninbildenden Zellen**

Wie bereits in Kapitel 2.1.3.2 dieser Arbeit erläutert, entstammen die reninproduzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates und die Zellen des renalen Interstitiums aus den gleichen Vorläuferzellen, welche als FoxD1-positive Zellen bezeichnet werden. Insofern stellt sich die Frage, inwieweit die reninproduzierenden Zellen und die Zellen des renalen Interstitiums miteinander verwandt sind. Hier soll das Augenmerk auf die Perizyten gerichtet werden; diese Zellen können im früh postnatalen murinen Organismus Renin freisetzen (20).

Stefanska et al. schlagen vor, die Perizyten nicht der Gruppe der reninbildenden Zellen zuzuordnen, sondern umgekehrt die reninbildenden Zellen der Gruppe der Perizyten zuzuordnen (124). In dieser Studie wurde auf die Definition einer Zelle als Perizyt durch eine Kombination aus einer bestimmten Proteinexpression (unter anderem die Expression von CD46, NG2 (neural-glial antigen 2 und PDGFR $\beta$ ) zurückgegriffen, die von Crisan et al. bestätigt wurde (110). Stefanska et al. erkennen eine Kolokalisation von perizytären Markern mit der Reninexpression, wohingegen eine Kolokalisation der Reninexpression mit Endothelzellen nicht vorliegt. Daraus folgern die Autoren, dass die reninexprimierenden Zellen den Perizyten zugeordnet werden können (124). Die Umkehrung dieser Theorie, also die Reninexpression durch Perizyten auch im adulten Nager oder Menschen, erscheint im Interstitium vor den Ergebnissen dieser Arbeit gut möglich.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob das Recruitment zur reninbildenden Zelle nicht nur für die glatte Gefäßmuskulatur der afferenten Arteriolen, sondern auch für Perizyten möglich ist. Berg et al. konnten feststellen, dass die embryonale perizytäre Reninexpression auch bei 45 Tage alten Mäusen noch darstellbar ist, deren Angiotensinbildung genetisch deletiert ist (20). Ob diese extreme Stimulation der Reninbildung ein perizytäres Recruitment darstellt oder den Rückgang der embryonalen perizytären Reninproduktion verlangsamt, wird aber durch diese Ergebnisse nicht eindeutig bestimmt, da auch bei den Angiotensin-defizienten Mäusen im Laufe der postnatalen Entwicklung die Anzahl der reninpositiven Perizyten deutlich abnahm. Ein Neurecruitment ist damit meiner Meinung nach nicht eindeutig festzustellen. Ein Zusammenhang zwischen der embryonalen perizytären Reninbildung und der in dieser Arbeit nachgewiesenen interstitiellen mRNA-Synthese scheint allerdings besonders angesichts des intrarenalen Verteilungsmusters möglich: Die embryonale perizytische Reninexpression ist nach Berg et al. fast ausschließlich auf das kortikale Interstitium beschränkt (20); im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihe zeigten sich Kolokalisationen zwischen PDGFR $\beta$ -mRNA und Renin-mRNA ebenfalls vermehrt kortikal. Insofern könnte bei denen im Versuch verwendeten, mindestens 50 Tage alten Versuchstieren kein perizytär synthetisiertes Renin, aber zumindest noch die dafür nötige mRNA vorhanden sein.

#### **6.3.4. Vergleich mit den erythropoietinproduzierenden interstitiellen Zellen**

Eine interessante Parallele lässt sich von den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zu den Erythropoietin (Epo) produzierenden Zellen ziehen: Epo wird physiologischerweise von interstitiellen, nicht endothelialen Zellen des renalen Kortex produziert (125). Der Identifizierung dieser Epo-Produktion gelang durch mRNA-Nachweis mithilfe von *in situ*-Hybridisierung, ein Nachweis des Proteins Erythropoietin im Interstitium gelang jedoch nicht. Le Hir, Kurtz et al. postulieren daher, dass neu synthetisiertes Epo nicht intrazellulär gespeichert wird, sondern stattdessen sofort freigesetzt wird und somit immunhistochemisch am Syntheseort nicht mehr nachweisbar ist (126). Diese Folgerung kann auch auf interstitiell gebildetes Renin übertragen werden, welches ebenfalls nach Synthese sofort freigesetzt werden könnte.

Diese These wird dadurch gestützt, dass offensichtlich eine enge Verwandtschaft zwischen Epo-produzierenden interstitiellen Zellen und Renin-mRNA-positiven interstitiellen Zellen besteht: Bei Deletion des von Hippel Lindau (vHL)-Gens können interstitielle Zellen, die bisher Renin produziert haben, auf eine Epo-Synthese umschwenken (127). Außerdem postulieren Gerl et al., dass die Epo-produzierenden Zellen der Niere mindestens teilweise ebenfalls von den mesenchymalen FoxD1-positiven Zellen abstammen (125). Da die interstitielle Renin-mRNA-Färbung in der vorliegenden Arbeit genauso an interstitieller Stelle vorhanden war wie die Epo-mRNA-Färbung in der Arbeit von Broeker (jeweils in Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ ), stellt sich die Frage, ob nicht sogar dieselben Zellen zur gleichzeitigen Renin- und Epo-Produktion fähig sind. Dieser Hypothese widerspricht allerdings die intrarenale Lokalisation der produzierenden Zellen: Während nach Broeker die PDGFR $\beta$ -mRNA-positiven und gleichzeitig Epo-mRNA-positiven Zellen in Wildtypmäusen vor Allem im Bereich des Übergangs von Kortex zu Medulla vorliegen (125), konnten in dieser Arbeit die Zellen, die PDGFR $\beta$ -mRNA-positiv und gleichzeitig Renin-mRNA-positiv sind, vor Allem im kortikalen Bereich der Versuchsorgane nachgewiesen werden. Zusammenfassend könnten aufgrund der gemeinsamen Herkunft die Synthesemechanismen beider Zelltypen sowie die fehlende Fähigkeit zur Speicherung der synthetisierten Proteine ebenfalls ähnlich sein.

### **6.3.5. Synthese interstitieller Renin-mRNA durch PDGFR $\beta$ -negative Zellen**

Im Rahmen der Versuchsreihe konnte Renin-mRNA interstitiell nicht nur in PDGFR $\beta$ -mRNA-positiven Zellen nachgewiesen werden. Auch Zellen, die die mRNA des Rezeptors nicht exprimieren, stellten sich Renin-mRNA-positiv dar. Wie bereits in Kap. 2.1.3.1 angeführt, exprimieren Epithelzellen, wie beispielsweise Tubuluszellen, keine PDGF-Rezeptoren (15) (128). Dass renale Tubuluszellen prinzipiell Renin-mRNA exprimieren können, wurde von Federlein nachgewiesen. Insofern könnte die von PDGFR $\beta$ -negativen Zellen exprimierte Renin-mRNA von Tubuluszellen stammen. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Federlein stellt sich diese nicht-glomeruläre, PDGFR-negative und damit möglicherweise tubuläre, Renin-mRNA-Expression nicht nur in Schädigungsmodellen wie den STZ-Mäusen, sondern auch in den Kontrolltieren

dar (vgl. hierzu Kap. 6.1: Vergleich mit den Ergebnissen von Federlein). Dazu im Widerspruch steht jedoch die eindeutige interstitielle Lokalisation der Zellen.

Eine andere Erklärung für dieses Phänomen wäre die Expression von Renin-mRNA durch glatte Gefäßmuskelzellen. Diese exprimieren kein PDGFR $\beta$ -Protein (128); daher erscheint eine Expression von PDGFR $\beta$ -mRNA durch diese Zellen unwahrscheinlich. Eine mögliche Renin-mRNA-Produktion durch glatte Gefäßmuskelzellen erscheint vor dem Hintergrund der Reninproduktion durch Gefäßmuskelzellen während der Ontogenese (vgl. hierzu Kap. 2.1.3.2) durchaus möglich. Außerdem entstammen sowohl die reninproduzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates als auch die glatten Gefäßmuskelzellen der FoxD1-positiven Zellpopulation; eine mögliche residuelle Renin-(mRNA-)Produktion erscheint ebenfalls möglich. In diesem Zusammenhang könnte die Produktion des Reninproteins stillgelegt worden sein, die mRNA-Produktion jedoch noch vorhanden sein.

Darüber hinaus existieren weitere, PDGFR-negative Zellen im Interstitium. Hierzu zählen beispielsweise Immunzellen (vgl. hierzu Kap. 2.1.3.1: Aufbau des renalen Interstitiums). Insofern könnten auch diese Zellen zu einer interstitiellen Renin-mRNA-Produktion beitragen. Hier wäre eine Co-in-situ-Hybridisierung von Renin mit Markern beispielsweise für dendritische Zellen zum Nachweis möglich.

### ***6.3.6. Hypothesen zur Funktion interstitiell gebildeten (Pro-)Renins***

Die Funktion des interstitiell gebildeten, aber in dieser Arbeit nicht nachweisbaren Renins ist bisher nicht bekannt. Im Folgenden sollen einige Thesen diskutiert werden. Zu berücksichtigen ist dabei, dass das Vorläufermolekül Prorenin durch Translation aus der gleichen mRNA wie Renin gebildet wird; insofern ist durch In situ-Hybridisierung nicht feststellbar, ob die detektierte Renin-mRNA zur Renin- oder Proreninsynthese dient.

#### *6.3.6.1. Konstitutionelle Proreninsynthese im Interstitium*

Wie bereits in Kap. 2.3.2 und 2.3.3 dieser Arbeit festgestellt wurde, erfüllt bereits Vorläufermolekül Prorenin per se regulatorische Aufgaben. Insofern ist es denkbar,

dass die (Pro-)Renin-mRNA-Synthese im Interstitium einer Proreninsynthese dient, ohne dass eine weitere Prozessierung des synthetisierten Prorenins zu Renin erfolgt. Im Vergleich der unterschiedlichen Schädigungsmodelle ist die Renin-mRNA in allen untersuchten Modellen sowie den Nieren der Kontrollmäuse vorhanden. Eine eindeutige Korrelation zwischen Schädigungsmodell und Anzahl der Kolokalisationsstellen zwischen Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA konnte nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist bei den Mäusen, die über Trinkwasser Eurosemid zugeführt bekamen, sowie bei den Mäusen, deren Nierenarterie einseitig stenosiert wurde, eine eindeutige Stimulation der JG-Zell-Renin-mRNA hinsichtlich Anzahl der Renin-mRNA-positiven Glomeruli sowie der Intensität des Renin-mRNA-Signals am einzelnen, positiven Glomerulum festzustellen. Als Konklusion dieser beiden Ergebnisse erscheint eine kurzfristige Stimulation oder Suppression der interstitiellen Renin-mRNA-Produktion unwahrscheinlich.

Insofern stellt sich die Frage, welchen Zweck die interstitielle Renin-mRNA-Produktion grundsätzlich erfüllt. Als Schluss aus der fehlenden kurzfristigen Stimulation im Rahmen der Nierenschädigungsmodelle erscheint eine konstitutive Renin-mRNA- oder auch Renin-Produktion durch die interstitiellen Zellen möglich. Die Produktion von Renin durch die JG-Zellen kann in diesem Modell als On-Top-Stimulation kurzfristig zugeschaltet werden. Dies passt zu der Vermutung, dass eine regulierte Exozytose von Renin den JG-Zellen vorbehalten ist (33). Im Umkehrschluss wäre eine konstitutive Expression von Renin auch durch andere Zellen, beispielsweise interstitielle Zellen, möglich. Zu dieser Vermutung steuert auch die Beobachtung bei, dass bei akuter Stimulation der Reninproduktion vermehrt reifes Renin (also über den regulierten Weg durch JG-Zellen) freigesetzt wird. Bei chronischer Stimulation der Reninexpression kommt es nach Toffelmire et al. darüber hinaus auch zu einer Erhöhung der Prorenin-Freisetzung über den regulierten Freisetzungsweg (37) (33). Die Autoren verglichen in ihrer Studie die Exposition von Amilorid über 6-11 Tage oder einer salzreichen Diät als langfristige Stimulatoren der Reninexpression mit einer Behandlung mit dem ACE-Hemmer Captopril über 3 Stunden als kurzfristige Stimulation der Reninexpression. Die Studie wurde mit humanen Probanden durchgeführt. Es erscheint möglich, dass der Umschlagpunkt zwischen lang- und kurzfristiger Stimulation der Reninproduktion in der Maus an einem anderen Zeitpunkt liegt. Insofern könnten die in der vorliegenden Versuchsreihe durchgeführten

Versuchsdauern von 5 bis 14 Tagen für den murinen Organismus noch im Bereich der kurzfristigen Reninstimulation liegen. Als Folge dessen kommt es glomerulär zu einer Stimulation der Reninproduktion, was sich im verstärkten Renin- und Renin-mRNA-Signal zeigt. Eine interstitielle Zunahme der Renin-mRNA-Expression ist jedoch nicht zu erheben. Inwiefern eine längere Taktung des murinen Organismus im Gegensatz zum humanen wahrscheinlich ist, erscheint jedoch angesichts des deutlich kürzeren Lebenszyklus der Maus im Vergleich zum Menschen äußerst fraglich.

Berücksichtigt werden muss in diesem Modell, dass auch bei den Kontrollnieren sowie den Nieren, die kontralateral zu einer Stenosierung der Nierenarterien lagen, eine gewisse, wenn auch im Vergleich zu den stimulierten Nieren geringere Anzahl an Renin-mRNA-positiven Glomeruli und auch Renin-positiven Glomeruli vorlag. Dies kann darauf hindeuten, dass eine gewisse JG-Zell-Reninproduktion ebenfalls konstitutiv vorliegt oder aber der die Reninproduktion supprimierende Reiz nicht ausreichend war. Hier könnten Experimente an Nieren, deren Reninproduktion exzessiv supprimiert wurde, Ausschluss darüber geben, ob selbst bei stärkster Hemmung der Reninproduktion noch ein JG-Zell-Signal vorliegt bei gleichzeitigem interstitiellen Renin-mRNA-Signal oder in diesem Fall eines oder beides der Signale erlischt.

Federlein kommt zum Schluss, dass die lokale tubuläre Reninbildung die Progression einer Nephropathie im Rahmen eines Diabetes mellitus fördert (72). Ob interstitiell produziertes Renin ebenfalls einen Progressionsfaktor darstellt, bleibt weiterhin unklar. Da jedoch keine deutliche Stimulation der interstitiellen Renin-mRNA-Produktion im Rahmen des Diabetes mellitus oder anderer Modelle der Nierenschädigung festgestellt werden konnte, erscheint diese These für interstitiell gebildetes Renin kaum zu halten.

#### *6.3.6.2. Embryonale und postnatale perizytäre Reninsynthese*

Ein weiterer Erklärungsansatz ist eine mögliche Rolle der interstitiellen Renin-mRNA und damit auch interstitiell produzierten Renins in der Nierenentwicklung. Wie bereits angeführt ist die Aktivität des RAAS essentiell für eine normale Nephrogenese (43). Postnatal konnte außerdem Renin perizytär nachgewiesen werden; der Reningehalt sinkt nach Berg et al. bei Wildtyp-Mäusen zwischen dem 21. und dem 45. postnatalen

Tag unter die Nachweisbarkeitsschwelle ab (20). Diese Ergebnisse decken sich insofern mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da die verwendeten Tiere nicht jünger als 5 Wochen (35 Tage) waren (54) und auch in dieser Arbeit keine perizytäre Reninexpression auf Proteinebene nachweisbar war.

Die Nephrogenese der Maus vollzieht sich im Gegensatz zur menschlichen Nephrogenese auch postnatal. Nephrone werden bis zum 7. bis 10. postnatalen Tag gebildet (129). Es wäre also möglich, dass nach Abschluss der Nephrogenese im Interstitium ein Mechanismus in Kraft tritt, der die Translation der Renin-mRNA in das Protein allmählich unterbindet oder zunehmend zu einem sofortigen Abbau des synthetisierten Renins führt. Die unübersetzte Region (UTR) am 3'-Ende der Renin-mRNA in die Regulation der Translation von Renin involviert; ein Löschen der 3'-UTR führt zu einer deutlichen Verminderung des Präproreninspiegels. Da dieser Mechanismus jedoch über eine reduzierte Stabilität der mRNA wirkt (130), kommt er wohl für interstitiell gebildetes Renin nicht infrage; die Renin-mRNA ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit und der Arbeit von Federlein vorhanden und nachweisbar. Auf zellulärer Ebene könnten die Perizyten die Fähigkeit zur Reninspeicherung verlieren. Möglicherweise können dann keine dichten core-Vesikel mehr gebildet werden, welche zur Umwandlung von Prorenin zu aktivem Renin und damit zur Speicherung von Renin benötigt werden (vgl. Kap. 2.3.2 dieser Arbeit).

Insgesamt muss jedoch die Hypothese „Transkription ohne Translation“ äußerst kritisch betrachtet werden; der energetische Aufwand ohne evolutionären Nutzen erscheint unverhältnismäßig.

#### *6.3.6.3. Interstitielles (Pro-)Renin zur Erhaltung der renalen Zellintegrität*

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass Renin nicht nur eine Rolle im Renin-Angiotensin-System spielt, sondern auch Aufgaben außerhalb dieses hormonellen Systems erfüllt.

Eine vollkommene Stilllegung der Reninproduktion kann unter anderem durch einen Knockout des stimulierenden G-Proteins  $\alpha$  durchgeführt werden. Das Fehlen dieses Proteins, das physiologischerweise die Bildung von cAMP katalysiert, führt über längere Sicht zu einem Sistieren der Reninproduktion (131) (vgl. Kap. 2.5: cAMP ist ein essentieller Bestandteil der Reninproduktion). Lachmann et al. haben festgestellt,

dass bei den Knockout-Tieren darüber hinaus über einen längeren Zeitraum (beispielsweise 6 Monate) auch glomeruläre Schäden auftreten (131). Insofern scheint Renin auch für die zelluläre Integrität der Niere eine wichtige Rolle zu spielen. Eine interstitielle Reninproduktion könnte also auch zur Aufrechterhaltung der Zellphysiologie in der Niere dienen. In dieser Hinsicht müssen auch die Ergebnisse von Castrop berücksichtigt werden: Bei Schädigungen des Tubulusepithels können Zellen des renalen kortikalen Interstitiums (insbesondere PDGFR $\beta$ -positive Zellen) zum Ort der Schädigung wandern und die Zellregeneration des Tubulusepithels unterstützen (132).

Bei dieser Migration läuft die tubulointerstitielle Zell-Zell-Kommunikation auf Seiten des Tubulusepithels durch die Freisetzung von transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ab (132). Die interstitielle Komponente dieses Kommunikationsweges könnte dort synthetisiertes Renin sein. Da auch unter physiologischen Bedingungen ein geringer Teil des Tubulusepithels zerfällt und ersetzt werden muss (132), kann auch unter Kontrollbedingungen ein gewisser interstitieller Reninspiegel nötig sein. Um diese Hypothese zu vertiefen, läge eine *in situ*-Hybridisierung auf Renin-mRNA unter Tubulusschädigung nahe.

Möglicherweise lassen sich diese renoprotektiven und renoregenerativen Wirkungen interstitiell synthetisierten Prorenins einfügen in die Vorstellung eines alternativen RAAS, das antagonistisch zum klassischen RAAS wirkt (vgl. Kap. 2.7 dieser Arbeit). Aus dieser Hypothese folgt, dass in den interstitiellen Zellen das antagonistische RAAS unter physiologischen, möglicherweise auch pathologischen Bedingungen stärker ausgeprägt sein muss als das klassische RAAS. Da zentraler Bestandteil des alternativen RAAS ACE 2 ist, müsste dieses zumindest in der Umgebung des renalen Interstitiums verstärkt vorhanden sein. ACE 2 konnte auf Proteinebene in der Niere im Endothel, im proximalen Tubulusepithel sowie vereinzelt in der glatten Gefäßmuskulatur mittelgroßer Gefäße nachgewiesen werden (133). Eine enge lokale Beziehung von ACE 2 und interstitiell produziertem Renin ist also durchaus vorhanden; somit erscheint ein Zusammenwirken in einem alternativen RAAS gut möglich.

Im klassischen RAAS ist die Aktivität des Systems durch die Transkription des Reningens reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings kein deutlicher Unterschied der interstitiellen Renin-mRNA zwischen Kontroll- und

Schädigungsmäusen detektiert werden. Möglicherweise wird die Aktivität des alternativen RAAS nicht auf Ebene des Renins, sondern auf ACE 2-Ebene reguliert. Dann ließe sich bei Nierenschädigung eine Änderung der ACE 2-Menge detektieren. Tikellis et al. postulieren beispielsweise, dass die ACE 2-Genexpression sowie der ACE 2-Spiegel bei der diabetischen Nephropathie (experimentell dargestellt bei STZ-Ratten) vermindert ist (134). Zu klären bleibt in diesem Fall, warum es bei Nierenschädigung nicht zu einer Stimulation des eigentlich doch renoprotektiv wirkenden alternativen RAAS kommt.

### ***6.3.7. Stellenwert interstitiell produzierten (Pro-)Renins bei der Progression der Nierenfibrose***

Eine übermäßige Stimulation des Wnt-Signalwegs führt zur Ausbildung einer interstitiellen Fibrose (45). Ein Bestandteil des Wnt-Signalwegs ist der Proreninrezeptor (PRR) (siehe Kap. 2.3.3). Insofern erscheint eine Expression des PRR im Interstitium möglich, um die profibrotischen Vorgänge, die im Rahmen der Fibrose auftreten, anzutreiben. In Zusammenhang mit einer Anwesenheit des PRR scheint eine Katalyse der Fibrosevorgänge durch interstitielles Renin möglich.

Zunächst muss erörtert werden, ob die die Progression einer Nierenfibrose via Aktivierung des PRR grundsätzlich reninabhängig verläuft. Yang und Xu vermuten eine positive Feedbackschleife zwischen Wnt-Signalweg und intrarenalem RAAS (135). Diese Wechselwirkung würde dann ihren Beginn in der Bindung von (Pro-)Renin an den PRR finden. Andere Autoren postulieren hingegen, dass Progression einer Nierenfibrose durch den PRR reninabhängig und/oder reninunabhängig verlaufen kann: Li et al. halten eine RAAS-abhängige Aktivierung von ERK-1 und -2 via PRR genauso für möglich wie eine RAAS-unabhängige Aktivierung des Wnt-Signalwegs. Sie schreiben jedoch den größeren Anteil letzterem Mechanismus zu (79). Dies deckt sich mit dem Ergebnis, dass eine Aktivierung des PRR durch Prorenin erst durch äußert hohe Plasmaspiegel von Prorenin erreicht werden würde, welche auch bei Nierenschädigungen nicht erreicht werden (vgl. Abb. 32). Selbst bei genetisch modifizierten Mäusen, die Prorenin überexprimieren, kommt es nicht zur renalen Fibrose; die Affinität des PRR zur Bindung von (Pro-)Renin ist äußerst gering (136).

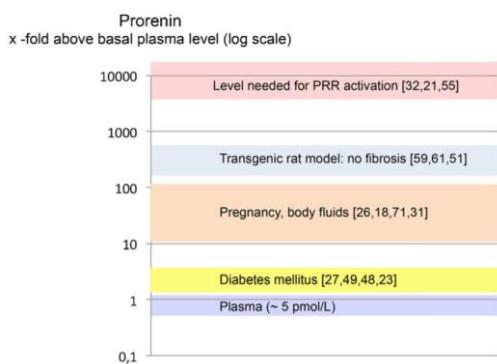


Abbildung 32: Plasmaproreninspiegel und PRR-Aktivierung in vivo

Eine Aktivierung des PRR durch Prorenin setzt einen  $10^5$ -fachen des physiologischen Proreninspiegels voraus. Selbst unter pathologischen Bedingungen wie dem Diabetes mellitus werden die Aktivierungslevel nicht annähernd erreicht.

[aus: Peters J. The (pro)renin receptor and its interaction partners. *Pflugers Arch* 2017; 469(10):1245–56. doi: 10.1007/s00424-017-2005-z.]

Insgesamt ist zu vermuten, dass die erhöhte Reninexpression nach UUO eher Folge der RAAS-Aktivierung durch den Wnt-Signalweg als Triebfeder der Fibrosevorgänge ist. Zhou et al. haben im UUO-Modell die Auswirkungen einer Stilllegung des Wnt-Signalwegs in verschiedenen renalen Zelltypen untersucht. Sie kommen zum Ergebnis, dass eine Deletion von Wnt-Liganden in den Tubuluszellen zu einer verminderten Ausprägung der Nierenfibrose in den UUO-Nieren führt. Im Gegensatz dazu bleibt eine Verminderung der Nierenfibrose aus, wenn ausschließlich die Expression von Wnt-Liganden in den Fibroblasten unterdrückt wird (137).

Dies führt zur Schlussfolgerung, dass der Wirkort der Wnt-Liganden nicht das renale Interstitium, sondern das Tubulusepithel ist. Inwiefern interstitiell produziertes (Pro-)Renin führt die tubuläre Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist, lässt sich aus diesen Experimenten jedoch nicht schließen.

Wie bereits oben angeführt kann der PRR auch Wnt-unabhängig zur Progression einer Nierenfibrose beitragen; hier sei nochmals auf die Aktivierung von ERK1/2-MAP-Kinasen hingewiesen (vgl. Kap. 2.3.3). Eine Aktivierung dieser Kinasen durch Phosphorylierung scheint bereits bei einer Reninkonzentration im picomolaren Bereich möglich zu sein (138). Insofern kann die interstitiell produzierte Reninmenge, die für eine Progression einer Nierenfibrose nötig ist, auch unter der Nachweisschwelle für die in der Arbeit verwendete HRP-Färbung, jedoch über der Nachweisschwelle der in

situ-Hybridisierung liegen. Eine wichtige Rolle interstitiell produzierten Renins in diesem Zusammenhang kann also durch die vorliegenden Experimente nicht ausgeschlossen werden.

Zuletzt bleibt noch zu klären, ob der PRR interstitiell exprimiert wird. Bisherige Studien belegen eine renale Expression des PRR im Epithel des distalen Tubulus, in den Schaltzellen vom Typ A des Sammelrohrs sowie in glomerulären Podozyten und Mesangialzellen (79) (139). Eine interstitielle PRR-Expression ist auf Grundlage der von Advani et al. im Rahmen dieser Studien veröffentlichten Bilder weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eindeutig zu bestätigen (79); auszuschließen ist sie jedoch genauso wenig. Nach Yosypiv et al. konnte der PRR im Sammelrohr, in den Podozyten, den Macula densa-Zellen, einigen Arten von Tubuluszellen sowie dem glomerulären Mesangium nachgewiesen werden (43); auch in diesem Fall fehlt eine Aussage über das renale Interstitium. Hier brächte eine Co-in situ-Hybridisierung der PRR-mRNA mit einem interstitiellen Marker einen weiteren Erkenntnisgewinn.

### ***6.3.8. Abschließende Überlegungen zur pharmakologischen Beeinflussung des RAAS***

In Zusammenschau mit Kap. 6.3.6 dieser Arbeit lassen sich Hypothesen für den Stellenwert interstitiell produzierten (Pro-)Renins für den Wirkmechanismus von RAAS-Antagonisten wie ACE-Hemmern (z. B. Enalapril) aufstellen: Die renoprotektive Wirkung dieser Medikamente könnte nicht nur durch eine direkte Hemmung des RAAS mit nachfolgend verminderter Angiotensin II-Produktion auftreten. Kompensatorisch kommt es bei RAAS-Hemmung nach der Ebene des Renin zu einer vermehrten Bildung von Renin (zumindest in den JG-Zellen). Sollte, wie in dieser Arbeit vermutet, besonders Prorenin auch eine glomeruloprotektive Wirkkomponente haben, tritt diese nach Gabe von ACE-Hemmern durch den Kompensationsmechanismus verstärkt auf. Andererseits könnte eine vermehrte PRR-Aktivierung durch einen höheren Proreninspiegel auch zu einer schnelleren Progression einer beginnenden Fibrose führen, was den protektiven Wirkungen dieser Medikamentenklasse entgegenwirken würde.

Insgesamt gibt es Hinweise, dass nicht nur Angiotensin II, sondern auch (Pro-)Renin selbst zu histomorphologischen Schäden führt. Dies kann darauf zurückgeführt

werden, dass auch nach Behandlung mit dem direkten Renin-Antagonisten Aliskiren eine Besserung dieser Schäden eintritt. Versuche mit UUO-Tieren und STZ-Tieren deuten in diese Richtung (140) (141). Insofern erscheint eher die zweite von mir vorgestellte Hypothese zuzutreffen und bei Nierenschädigungen das RAAS und im Besonderen (Pro-)Renin eher eine schädigende als eine protektive Rolle zu haben.

## 6.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich eine Expression von Renin-mRNA in Kolokalisation mit PDGRF $\beta$ -mRNA, was auf eine interstitielle Expression der Renin-mRNA hindeutet. Diese Expression war in verschiedenen Nierenschädigungsmodellen, aber auch in den Kontrollnieren vorhanden. Daraus folgt eine konstitutive Transkription des Reningens und daraus möglicherweise auch eine Translation, welche beispielsweise in der Synthese von Prorenin münden könnte.

In dieser Arbeit war die Auswertung der *in situ*-Hybridisierung rein qualitativ. Von großem Interesse für das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge ist die quantitative Auswertung sowohl zwischen den einzelnen Schädigungsmodellen als auch im Verhältnis zum von den JG-Zellen produzierten Renin. Möglicherweise muss die These überdacht werden, dass die JG-Zellen für die Aufrechterhaltung des Plasmareninspiegels verantwortlich sind. Mit Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit scheint eine konstitutive Reninsynthese kombiniert mit einer sofortigen Freisetzung des produzierten Renins, beispielsweise ins Blutplasma, durch die interstitiellen Zellen durchaus möglich. In diesem Zuge bleibt auch zu klären, ob die Expression von Renin-mRNA in pathologischen Zuständen der Niere eher progressionsfördernd oder -hemmend auf die jeweilige Erkrankung wirkt; aus dieser Erkenntnis ließe sich dann eine pharmakologische Angriffsmöglichkeit bei der Behandlung ebendieser Erkrankungen folgern. Die weitere Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems wird also auch künftig in der Physiologie und Nephrologie einen großen Stellenwert einnehmen.

## 7. Anhang

### 7.1. Literatur

1. Friedrich Anderhuber, Timm J. Filler, Franz Pera, Elmar T. Peuker. Innere Organe in Thorax, Abdomen und Becken. In: Anderhuber F, Pera F, Streicher J, Hrsg. Waldeyer: Anatomie des Menschen ; Lehrbuch und Atlas in einem Band. 19. Aufl. s.l.: Walter de Gruyter GmbH Co.KG; 2012. S. 427–601 (De Gruyter Studium).
2. Mount DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9(11):1974–86. doi: 10.2215/CJN.04480413.
3. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20(1):7–15. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283410a7d.
4. Scott RP, Quaggin SE. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* 2015; 209(2):199–210. doi: 10.1083/jcb.201410017.
5. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; 88(2):451–87. doi: 10.1152/physrev.00055.2006.
6. Castrop H, Schießl IM. Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(9):F991-F1002. doi: 10.1152/ajprenal.00432.2014.
7. Martini AG, Danser AHJ. Juxtaglomerular Cell Phenotypic Plasticity. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2017; 24(3):231–42. doi: 10.1007/s40292-017-0212-5.
8. Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 1979; 237(5):F333-43. doi: 10.1152/ajprenal.1979.237.5.F333.
9. Zeisberg M, Kalluri R. Physiology of the Renal Interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10(10):1831–40. doi: 10.2215/CJN.00640114.
10. Lemley KV, Kriz W. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 1991; 39(3):370–81. doi: 10.1038/ki.1991.49.

11. Takahashi-Iwanaga H. The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue in the rat kidney. *Cell Tissue Res* 1991; 264(2):269–81. doi: 10.1007/BF00313964.
12. Kurtz A. Endocrine functions of the renal interstitium. *Pflugers Arch* 2017; 469(7-8):869–76. doi: 10.1007/s00424-017-2008-9.
13. Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le Hir M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)* 1996; 193(4):303–18. doi: 10.1007/BF00186688.
14. Humphreys BD, Lin S-L, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American Journal of Pathology* 2010; 176(1):85–97. doi: 10.2353/ajpath.2010.090517.
15. Boor P, Ostendorf T, Floege J. PDGF and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29 Suppl 1:i45-i54. doi: 10.1093/ndt/gft273.
16. Demoulin J-B, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25(3):273–83.
17. Sadiq MA, Hanout M, Sarwar S, Hassan M, Do DV, Nguyen QD et al. Platelet derived growth factor inhibitors: A potential therapeutic approach for ocular neovascularization. *Saudi J Ophthalmol* 2015; 29(4):287–91. doi: 10.1016/j.sjopt.2015.05.005.
18. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF. PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 1993; 43(2):286–94.
19. Schiessl IM, Grill A, Fremter K, Steppan D, Hellmuth M-K, Castrop H. Renal Interstitial Platelet-Derived Growth Factor Receptor- $\beta$  Cells Support Proximal Tubular Regeneration. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29(5):1383–96. doi: 10.1681/ASN.2017101069.
20. Berg AC, Chernavvsky-Sequeira C, Lindsey J, Gomez RA, Sequeira-Lopez ML. Pericytes synthesize renin. *World journal of nephrology* 2013; 2(1).

21. Yosypiv IV. Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: implications for kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2014; 29(4):609–20. doi: 10.1007/s00467-013-2616-3.
22. Davies JA, Bard JB. The development of the kidney. *Curr Top Dev Biol* 1998; 39:244–301. doi: 10.1016/s0070-2153(08)60458-5.
23. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol* 2016; 117:31–64. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.10.010.
24. Kobayashi A, Mugford JW, Krautzberger AM, Naiman N, Liao J, McMahon AP. Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Reports* 2014; 3(4):650–62. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.008.
25. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension* 1979; 1(4):384–8.
26. Lu H, Cassis LA, Kooi CWV, Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens Res* 2016; 39(7):492–500.
27. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(8 Suppl B):9–20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.
28. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 2014; 4(3):1201–28. doi: 10.1002/cphy.c130040.
29. Knepper MA, Kwon T-H, Nielsen S. Molecular physiology of water balance. *N Engl J Med* 2015; 372(14):1349–58. doi: 10.1056/NEJMra1404726.
30. Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK et al. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* 1989; 243(4896):1346–51. doi: 10.1126/science.2493678.
31. Baxter JD, James MN, Chu WN, Duncan K, Haidar MA, Carilli CT et al. The molecular biology of human renin and its gene. *Yale J Biol Med* 1989; 62(5):493–501.

32. Tang J, James MN, Hsu IN, Jenkins JA, Blundell TL. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* 1978; 271(5646):618–21. doi: 10.1038/271618a0.
33. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22:310–9. doi: 10.1152/physiol.00024.2007.
34. Mullins LJ, Payne CM, Kotelevtseva N, Brooker G, Fleming S, Harris S et al. Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *J Biol Chem* 2000; 275(51):40378–84. doi: 10.1074/jbc.M007315200.
35. Pratt RE, Carleton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(22):7837–40.
36. Danser AJ, Deinum J. Renin, Prorenin and the Putative (Pro)renin Receptor. *Hypertension* 2005; 46(5):1069–76. doi: 10.1161/01.HYP.0000186329.92187.2e.
37. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J, Schambelan M. 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* 1989; 83(2):679–87. doi: 10.1172/JCI113932.
38. Sequeira Lopez MLS, Gomez RA. Novel mechanisms for the control of renin synthesis and release. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12(1):26–32. doi: 10.1007/s11906-009-0080-z.
39. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 2010; 90(2):607–73. doi: 10.1152/physrev.00011.2009.
40. Oshima Y, Morimoto S, Ichihara A. Roles of the (pro)renin receptor in the kidney. *World journal of nephrology* 2014; 3(4):302–7. doi: 10.5527/wjn.v3.i4.302.
41. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109(11):1417–27. doi: 10.1172/JCI14276.
42. Nguyen G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci* 2011; 120(5):169–78. doi: 10.1042/CS20100432.

43. Yosypiv IV. Prorenin receptor in kidney development. *Pediatr Nephrol* 2017; 32(3):383–92. doi: 10.1007/s00467-016-3365-x.
44. Kawakami T, Ren S, Duffield JS. Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair. *J Pathol* 2013; 229(2):221–31. doi: 10.1002/path.4121.
45. Tan RJ, Zhou D, Zhou L, Liu Y. Wnt/β-catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* (2011) 2014; 4(1):84–90. doi: 10.1038/kisup.2014.16.
46. Yosypiv IV. Renin-angiotensin system in mammalian kidney development. *Pediatr Nephrol* 2021; 36(3):479–89. doi: 10.1007/s00467-020-04496-5.
47. Almeida LF, Tofteng SS, Madsen K, Jensen BL. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. *Clin Sci* 2020; 134(6):641–56.
48. Arthur G, Osborn JL, Yiannikouris FB. (PRO)RENIN RECEPTOR IN THE KIDNEY: FUNCTION AND SIGNIFICANCE. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2021.
49. Jones CA, Sigmund CD, McGowan RA, Kane-Haas CM, Gross KW. Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol Endocrinol* 1990; 4(3):375–83. doi: 10.1210/mend-4-3-375.
50. Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* 2008; 73(1):43–51.
51. Gubler MC, Antignac C. Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis. *Kidney Int* 2010; 77(5):400–6.
52. Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:377–99. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142238.
53. Offermanns S. Diuretika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S, Hrsg. Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. S. 391–406 (Springer-Lehrbuch).
54. Grill A, Schießl IM, Gess B, Fremter K, Hammer A, Castrop H. Salt-losing nephropathy in mice with a null mutation of the Clcnk2 gene. *Acta Physiol (Oxf)* 2016; 218(3):198–211. doi: 10.1111/apha.12755.

55. Davis JO, Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 1976; 56(1):1–56. doi: 10.1152/physrev.1976.56.1.1.
56. Skinner SL, McCubbin JW, Page IH. Renal Baroceptor Control of Renin Secretion. *Science* 1963; 141(3583):814–6. doi: 10.1126/science.141.3583.814.
57. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ* 2009; 33(4):270–4. doi: 10.1152/advan.00049.2009.
58. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG et al. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int* 2000; 58(6):2320–30. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00416.x.
59. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007; 59(3):251–87. doi: 10.1124/pr.59.3.3.
60. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 1999; 34(6):1265–74.
61. Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J, Derkx FH, Franken AA, Peperkamp E et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68(1):160–7.
62. Sealey JE, Goldstein M, Pitarresi T, Kudlak TT, Glorioso N, Fiamengo SA et al. Prorenin secretion from human testis: no evidence for secretion of active renin or angiotensinogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(5):974–8. doi: 10.1210/jcem-66-5-974.
63. Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. *World journal of nephrology* 2015; 4(1):74–82. doi: 10.5527/wjn.v4.i1.74.
64. Batlle D, Wysocki J, Soler MJ, Ranganath K. Angiotensin-converting enzyme 2: enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2012; 81(6):520–8. doi: 10.1038/ki.2011.381.
65. Prieto MC, González-Villalobos RA, Botros FT, Martin VL, Pagán J, Satou R et al. Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1-7 are associated with

- enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol 2011; 300(3):F749-55.
66. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. Saudi Med J 2002; 23(4):373–8.
67. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. Diabetes 2017; 66(2):241–55. doi: 10.2337/db16-0806.
68. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. Am J Physiol 1993; 265(4 Pt 2):F477-86. doi: 10.1152/ajprenal.1993.265.4.F477.
69. Yacoub R, Campbell KN. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy. Int J Nephrol Renovasc Dis 2015; 8:29–40. doi: 10.2147/IJNRD.S37893.
70. Peti-Peterdi J, Kang JJ, Toma I. Activation of the renal renin-angiotensin system in diabetes--new concepts. Nephrol Dial Transplant 2008; 23(10):3047–9. doi: 10.1093/ndt/gfn377.
71. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Meer EJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J. THE COLLECTING DUCT IS THE MAJOR SOURCE OF PRORENIN IN DIABETES. Hypertension 2008; 51(6):1597–604. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107268.
72. Federlein A. Die funktionelle Rolle des tubulären Renin-Systems.
73. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. Clin Exp Pharmacol Physiol 2011; 38(7):441–50. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05487.x.
74. Girndt M. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. Internist (Berl) 2017; 58(3):243–56. doi: 10.1007/s00108-017-0195-2.
75. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. Annu Rev Physiol 2018; 80:309–26. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.
76. Chevalier RL, Cachat F. Role of angiotensin II in chronic ureteral obstruction. Contrib Nephrol 2001; (135):250–60. doi: 10.1159/000060171.
77. Macconi D, Remuzzi G, Benigni A. Key fibrogenic mediators: old players. Renin-angiotensin system. Kidney Int Suppl (2011) 2014; 4(1):58–64. doi: 10.1038/kisup.2014.11.

78. Lv L-L, Liu B-C. Role of non-classical renin-angiotensin system axis in renal fibrosis. *Front Physiol* 2015; 6:1. doi: 10.3389/fphys.2015.00117.
79. Li Z, Zhou L, Wang Y, Miao J, Hong X, Hou FF et al. (Pro)renin Receptor Is an Amplifier of Wnt/β-Catenin Signaling in Kidney Injury and Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(8):2393–408. doi: 10.1681/ASN.2016070811.
80. Bartter FC, Pronove P, Gill JR, MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. 1962. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(3):516–28.
81. Da Cunha TS, Heilberg IP. Bartter syndrome: causes, diagnosis, and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2018; 11:291–301. doi: 10.2147/IJNRD.S155397.
82. Sturm K, Siedel W, Weyer R, Ruschig H. Zur Chemie des Furosemids, I. Synthesen von 5-Sulfamoyl-antranilsäure-Derivaten. *Chem. Ber.* 1966; 99(1):328–44. doi: 10.1002/cber.19660990150.
83. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016; 37(27):2129–200. doi: 10.1093/eurheartj/ehw128.
84. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2018; 69(2):406–60. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.024.
85. Wile D. Diuretics: a review. *Ann Clin Biochem* 2012; 49(Pt 5):419–31. doi: 10.1258/acb.2011.011281.
86. Martínez-Maldonado M, Gely R, Tapia E, Benabe JE. Role of macula densa in diuretics-induced renin release. *Hypertension* 1990; 16(3):261–8. doi: 10.1161/01.hyp.16.3.261.
87. Fraser R, James V, Brown JJ, Isaac P, Lever AF, Robertson J. EFFECT OF ANGIOTENSIN AND OF FRUSEMIDE ON PLASMA ALDOSTERONE,

- CORTICOSTERONE, CORTISOL, AND RENIN IN MAN. *The Lancet* 1965; 286(7420):989–91. doi: 10.1016/S0140-6736(65)92847-3.
88. Facemire CS, Nguyen M, Jania L, Beierwaltes WH, Kim H-S, Koller BH et al. A major role for the EP4 receptor in regulation of renin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(5):F1035-41. doi: 10.1152/ajprenal.00054.2011.
89. Thurner LR, Höcherl K. Role of protease-activated receptor 2 in regulation of renin synthesis and secretion in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019; 392(11):1401–10. doi: 10.1007/s00210-019-01677-4.
90. Schoepe R, McQuillan S, Valsan D, Teehan G. Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. *Adv Exp Med Biol* 2017; 956:209–13. doi: 10.1007/5584\_2016\_89.
91. Hansen KJ, Edwards MS, Craven TE, Cherr GS, Jackson SA, Appel RG et al. Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study. *J Vasc Surg* 2002; 36(3):443–51. doi: 10.1067/mva.2002.127351.
92. Dobrek L. An Outline of Renal Artery Stenosis Pathophysiology-A Narrative Review. *Life (Basel)* 2021; 11(3). doi: 10.3390/life11030208.
93. Schricker K, Holmer S, Hamann M, Riegger G, Kurtz A. Interrelation between renin mRNA levels, renin secretion, and blood pressure in two-kidney, one clip rats. *Hypertension* 1994; 24(2):157–62. doi: 10.1161/01.hyp.24.2.157.
94. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteriesEndorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* 2018; 39(9):763–816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095.
95. Jones TC, Hard GC, Mohr U, Hrsg. Urinary System. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998. (Monographs on Pathology of Laboratory Animals).

96. Busch M, Chourbaji S, Dammann P, Gerold S, Haemisch A, Jirkof P et al. Tiergerechte Haltung von Labormäusen.
97. Clark AF, Sharp MG, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ. Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 1997; 272(29):18185–90. doi: 10.1074/jbc.272.29.18185.
98. Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman H-J. The Streptozotocin-Induced Diabetic Nude Mouse Model: Differences between Animals from Different Sources. *Comp Med* 20; 61(4):356–60.
99. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(5):481–90. doi: 10.1258/ebm.2012.011372.
100. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 75(11):1145–52. doi: 10.1038/ki.2009.86.
101. Fu Y, Tang C, Cai J, Chen G, Zhang D, Dong Z. Rodent models of AKI-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 315(4):F1098-F1106. doi: 10.1152/ajprenal.00199.2018.
102. Chevalier RL, Gomez RA. Response of the renin-angiotensin system to relief of neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol* 1988; 255(6 Pt 2):F1070-7. doi: 10.1152/ajprenal.1988.255.6.F1070.
103. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. *J Exp Med* 1934; 59(3):347–79.
104. Ströhl S. Nephroprotektive Effekte der podocytären Guanylatcyclase A; 2017.
105. Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 2008; 130(2):247–62. doi: 10.1007/s00418-008-0452-5.

106. Lang G. Fixierung. In: Lang G, Hrsg. Histotechnik. Vienna: Springer Vienna; 2013. S. 47–77.
107. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods 2010; 588:257–70. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0\_26.
108. Katikireddy KR, O'Sullivan F. Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis. In: O'Driscoll L, Hrsg. Gene expression profiling: Methods and protocols. 2. edition. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Humana Press; 2011. S. 155–67 (Springer protocols; vol. 784).
109. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A et al. RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 2012; 14(1):22–9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
110. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3):301–13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
111. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell* 2011; 21(2):193–215.
112. Pimentel JL, Martinez-Maldonado M, Wilcox JN, Wang S, Luo C. Regulation of renin-angiotensin system in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1993; 44(2):390–400.
113. Pimentel JL, Montero A, Wang S, Yosipiv I, el-Dahr S, Martínez-Maldonado M. Sequential changes in renal expression of renin-angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1995; 48(4):1247–53.
114. Nüssing RM, Treude A, Weissenberger C, Jensen B, Bek M, Wagner C et al. Dominant role of prostaglandin E2 EP4 receptor in furosemide-induced salt-losing tubulopathy: a model for hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(8):2354–62. doi: 10.1681/ASN.2004070556.

115. Saleem M, Hodgkinson CP, Xiao L, Gimenez-Bastida JA, Rasmussen ML, Foss J et al. Sox6 as a new modulator of renin expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020; 318(2):F285-F297. doi: 10.1152/ajprenal.00095.2019.
116. Tojo A, Kinugasa S, Fujita T, Wilcox CS. A local renal renin-angiotensin system activation via renal uptake of prorenin and angiotensinogen in diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2016; 9:1–10. doi: 10.2147/DMSO.S91245.
117. Funakawa S, Okahara T, Imanishi M, Komori T, Yamamoto K, Tochino Y. Renin-angiotensin system and prostacyclin biosynthesis in streptozotocin diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 1983; 94(1-2):27–33. doi: 10.1016/0014-2999(83)90438-7.
118. Klueh U, Liu Z, Cho B, Ouyang T, Feldman B, Henning TP et al. Continuous glucose monitoring in normal mice and mice with prediabetes and diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2006; 8(3):402–12.
119. Brunskill EW, Sequeira-Lopez MLS, Pentz ES, Lin E, Yu J, Aronow BJ et al. Genes that confer the identity of the renin cell. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(12):2213–25. doi: 10.1681/ASN.2011040401.
120. Martinez MF, Medrano S, Brown EA, Tufan T, Shang S, Bertoncello N et al. Super-enhancers maintain renin-expressing cell identity and memory to preserve multi-system homeostasis. *J Clin Invest* 2018; 128(11):4787–803. doi: 10.1172/JCI121361.
121. Makhanova N, Lee G, Takahashi N, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, Kim H-S et al. Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(1):F61-9. doi: 10.1152/ajprenal.00257.2005.
122. Gonzalez-Villalobos RA, Satou R, Ohashi N, Semprun-Prieto LC, Katsurada A, Kim C et al. Intrarenal mouse renin-angiotensin system during ANG II-induced hypertension and ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(1):F150-7. doi: 10.1152/ajprenal.00477.2009.
123. Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Kopp JB et al. Interstitial fibroblast-like cells express renin-angiotensin system components in a fibrosing murine kidney. *The American Journal of Pathology* 2002; 160(3):765–72. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64898-5.

124. Stefanska A, Kenyon C, Christian HC, Buckley C, Shaw I, Mullins JJ et al. Human kidney pericytes produce renin. *Kidney Int* 2016; 90(6):1251–61. doi: 10.1016/j.kint.2016.07.035.
125. Gerl K, Nolan KA, Karger C, Fuchs M, Wenger RH, Stolt CC et al. Erythropoietin production by PDGFR- $\beta$ (+) cells. *Pflugers Arch.* 2016; 468(8):1479–87. doi: 10.1007/s00424-016-1829-2.
126. Le Hir M, Eckardt KU, Kaissling B, Koury ST, Kurtz A. Structure-function correlations in erythropoietin formation and oxygen sensing in the kidney. *Klin Wochenschr* 1991; 69(13):567–75. doi: 10.1007/BF01649319.
127. Broeker KAE, Fuchs MAA, Schrankl J, Lehrmann C, Schley G, Todorov VT et al. Prolyl-4-hydroxylases 2 and 3 control erythropoietin production in renin-expressing cells of mouse kidneys. *J Physiol* 2022; 600(3):671–94. doi: 10.1113/JP282615.
128. Taneda S, Hudkins KL, Topouzis S, Gilbertson DG, Ophascharoensuk V, Truong L et al. Obstructive uropathy in mice and humans: potential role for PDGF-D in the progression of tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2544–55. doi: 10.1097/01.ASN.0000089828.73014.C8.
129. Lechner MS, Dressler GR. The molecular basis of embryonic kidney development. *Mechanisms of Development* 1997; 62(2):105–20. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00667-9.
130. Persson PB, Skalweit A, Mrowka R, Thiele B-J. Control of renin synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285(3):R491-7. doi: 10.1152/ajpregu.00101.2003.
131. Lachmann P, Hickmann L, Steglich A, Al-Mekhlafi M, Gerlach M, Jetschin N et al. Interference with G $\alpha$ -Coupled Receptor Signaling in Renin-Producing Cells Leads to Renal Endothelial Damage. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(12):3479–89. doi: 10.1681/ASN.2017020173.
132. Castrop H. The Role of Renal Interstitial Cells in Proximal Tubular Regeneration. *Nephron* 2019; 141(4):265–72. doi: 10.1159/000496278.

133. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5):E1-9. doi: 10.1161/01.res.87.5.e1.
134. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003; 41(3):392–7. doi: 10.1161/01.HYP.0000060689.38912.CB.
135. Yang T, Xu C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(4):1040–9. doi: 10.1681/ASN.2016070734.
136. Peters J. The (pro)renin receptor and its interaction partners. *Pflugers Arch* 2017; 469(10):1245–56. doi: 10.1007/s00424-017-2005-z.
137. Zhou D, Fu H, Zhang L, Zhang K, Min Y, Xiao L et al. Tubule-Derived Wnts Are Required for Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(8):2322–36. doi: 10.1681/ASN.2016080902.
138. Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA. Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 2007; 72(1):45–52. doi: 10.1038/sj.ki.5002243.
139. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K et al. The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney. *Hypertension* 2009; 54(2):261–9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.128645.
140. Mahfuz AM, El-Latif HAA, Ahmed LA, Hassanein NM, Shoka AA. Anti-diabetic and renoprotective effects of aliskiren in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in female rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2016; 389(12):1315–24. doi: 10.1007/s00210-016-1299-2.
141. Wu W-P, Chang C-H, Chiu Y-T, Ku C-L, Wen M-C, Shu K-H et al. A reduction of unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by a therapy combining valsartan with aliskiren. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(5):F929-41. doi: 10.1152/ajprenal.00192.2010.

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung einer rechten menschlichen Niere .....	7
Abbildung 2: Abschnitte des Nephrons sowie Schichtaufbau der Niere .....	8
Abbildung 3: Bindungsspezifität der PDGF-Liganden an die PDGF-Rezeptoren .....	11
Abbildung 4: Intrarenale Verteilung des PDGFR $\beta$ .....	12
Abbildung 5: Zelluläre und molekulare Organisation von Coxd1- und Six2-positiven Zellen während der Nephrogenese.....	14
Abbildung 6: Überblick über FoxD1- und Six2-positive Zellen während der Entwicklung des Nephrons .....	14
Abbildung 7: Struktur von Renin .....	16
Abbildung 8: molekularbiologische Mechanismen der Reninfreisetzung .....	17
Abbildung 9: Formen und Unterteilung des PRR.....	19
Abbildung 10: Hauptregulationsweg der Reninfreisetzung .....	22
Abbildung 11: Steuerung der Reninexpression in der Macula densa-Zelle .....	23
Abbildung 12: Transportprozesse im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife	24
Abbildung 13: alternatives RAAS.....	27
Abbildung 14: Häufigkeit der eGFR <60 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> KOF abhängig vom Lebensalter .....	30
Abbildung 15: Ursachenverteilung der renalen Fibrose .....	30
Abbildung 16: Aufbau des ABC-Komplexes .....	41
Abbildung 17: Prinzip der ISH.....	43
Abbildung 18: glomeruläre Reninexpression in der HRP-Färbung .....	48
Abbildung 19: glomeruläres Renin-mRNA-Signal.....	50
Abbildung 20: semiquantitative Beurteilung hinsichtlich der Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA im Vergleich der verschiedenen Schädigungsmodelle .....	57
Abbildung 21: fehlender Nachweis von Reninprotein im renalen Interstitium .....	58
Abbildung 22: Nachweis von Renin-mRNA an interstitieller Position.....	59
Abbildung 23: Kolokalisation von Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA im renalen Interstitium.....	61
Abbildung 24: Renin-mRNA-positive Zellen im Interstitium ohne Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA.....	62
	105

Abbildung 25: interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach verschiedenen Expositionsdauern der Nierenarterienstenose (Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA) .....	62
Abbildung 26: interstitielle Renin-mRNA-Färbung nach verschiedenen Expositionsdauern der Ureterligatur (Kolokalisation mit PDGFR $\beta$ -mRNA) .....	63
Abbildung 27: Vergleich der Anzahl und Lokalisation der Kolokalisationen von Renin-mRNA und PDGFR $\beta$ -mRNA zwischen den verschiedenen Schädigungsmodellen.....	70
Abbildung 28: interstitielle Renin-mRNA-Expression in STZ-Mäusen .....	71
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von tubulärem Renin in ClCnk2-Knockout-Mäusen .....	76
Abbildung 30: HRP-Färbung von tubulärem Reninverhalten in ClCnk2-Knockout-Mäusen .....	76
Abbildung 31: Koexpression von Akr1b7 und Renin in der Mausniere .....	77
Abbildung 32: Plasmaproreninspiegel und PRR-Aktivierung in vivo.....	88

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

2K1C	Two-kidney-one-clip
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AC	Adenylatzyklase
ACE	angiotensin converting enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Akr1b7	Aldose-Ketoreduktase 1B7
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CKD	chronische Nierenerkrankung (engl. chronic kidney disease)
COX-2	Cyclooxygenase 2
Cx	Connexin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
eGFR	geschätzte (engl. estimated) glomeruläre Filtrationsrate
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
Epo	Erythropoietin
ERK	extracellular-signal related kinases
ESC	European Society of Cardiology
FFPE	formalin fixed paraffin embedded
FLC	Fibroblast like cell
FoxD1	Forkhead Box-D1
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
JG-Zellen	juxtaglomeruläre Zellen
HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
ISH	In situ-Hybridisierung
MAP	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure

NG2	neural/glial antigen 2
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NBF	neutral buffered formalin
PBS	phosphate buffered saline
p.c.	post conceptionem
PDE	Phosphodiesterase
PDGRF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PRR	(Pro-)Renin-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ren	Renin
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RKI	Robert-Koch-Institut
RTD	renal-tubuläre Dysgenesie
Six-2	SIX Homebox 2
STZ	Streptozotocin
UTR	unübersetzte (Gen-)Region (engl. untranslated region)
UUO	einseitige (engl. unilateral) Ureterobstruktion
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$

## 7.4. Verwendete Materialien

### 7.4.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### Verbrauchsmaterialien:

Material	Hersteller/Lieferant
Deckgläser	Hartenstein
Einbettkassetten	Hartenstein
Reaktionscups (0,2 - 2,0 ml)	Sarstedt
Falcon-Röhrchen (15 - 50 ml)	Sarstedt
Fettstift PAP (ISH)	Vector Laboratories
Fettstift Immedge	Biozol Diagnostica
Filter (HRP)	Hartenstein
Filter (ISH)	Advanced Cell Diagnostics
Glaswaren	Roth
Kocher „Food Steamer“	Braun
Nitrilhandschuhe	Rotiprotect
Objektträger „Super Frost Plus“	ThermoScientific
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten	Kimble
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter	Nerbe
Serologische Pipetten (5 - 25 ml)	Sarstedt

#### Geräte:

Name	Hersteller
Desktop-Computer	Dell
Eisbereiter CryoTherm	Apollo
HybEZ Ofen	Advanced Cell Diagnostics
Inkubator	Binder
Isofluran-Verdampfer	Havard Apparatus GmbH
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Fa. Zeiss

Mikrotom RM 2265	Axio Oberserver 7, Fa. Zeiss
pH-Meter Calimatic 766	Leica
Reinstwassersystem	Knick
Schüttler MiniRocket Platform	Merck
Vortexmixer Vortex Genic 2	Biometra
Waage Kern emb 200-3	Bender & Hobein
Wärmeschrank	Hartenstein
Wasserbad 1083	Memmet
Zentrifuge	GFL
	Eppendorf

### **7.4.2. Chemikalien**

#### **Reagenzien**

##### **Material**

ABC Kit Vectastain PK 6100  
 BSA  
 DAB Substrate Kit  
 Dako Mounting Medium  
 DePeX Mounting Medium  
 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$   
 Eurosemid  
 Formalin (37-40 %)  
 $\text{H}_2\text{O}_2$   
 Hämalaun  
 HCl  
 Isopropanol  
 Ketamin  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$   
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 Methanol  
 NaCl  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
 Paraffin  
 Paraformaldehyd  
 Permanent Mounting Medium (ISH)  
 RNAscope H2O2 & Protease Plus  
 RNAscope Probe – MmRen1  
 RNAscope Probe – MmPDGF  
 RNAscope Reagent Kit-Brown  
 RNAscope Target Retrieval Reagents  
 RNAscope Wash Buffer Reagents  
 Xylol

##### **Hersteller/Lieferant**

Vector Laboratories  
 PAN-Biontech  
 Vector Laboratories  
 Dako  
 Serva Elektrophoresis  
 Sigma-Aldrich  
 ratiopharm  
 Sigma-Aldrich  
 Roth  
 Merck  
 Fluka Analytical  
 Sigma-Aldrich  
 CP-Pharma  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Leica  
 Sigma-Aldrich  
 Vector Laboratories  
 Advanced Cell Diagnostics  
 Sigma-Aldrich

**Antikörper**

Name	Spezies	Verdünnung	Art.-Nr.	Hersteller
------	---------	------------	----------	------------

primärer Antikörper:

Renin	chicken	1:300	OACA02177	Hölzel Diagonstica
-------	---------	-------	-----------	--------------------

Renin	rabbit	1:300	*	Davids
-------	--------	-------	---	--------

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

sekundäre Antikörper:

anti-chicken	goat	1:200	58-39-081517	InVitrogen
--------------	------	-------	--------------	------------

anti-rabbit	donkey	1:200	sc-2795	Santa Cruz
-------------	--------	-------	---------	------------

**Puffer und Lösungen:**

ABC Komplex: Herstellung aus ABC Kit Vectastain PK 6100

- 20 µl Substanz A
- 20 µl Substanz B
- 1 ml PBS Otto

Citratpuffer:

- 0,3165 g Citratmonohydrat
- 2,0587 g Natriumcitratdihydrat
- Auffüllen auf 1 l mit H<sub>2</sub>O

DAB-Reaktionssubstanz: Herstellung aus DAB Substrate Kit SK-4100 (Fa. Vector Laboratories)

- 84 µl Buffer Stock Solution
- 100 µl DAB Stock Solution
- 84 µl Hydrogen Peroxide Solution
- 2,5 ml H<sub>2</sub>O

NBF (10%):

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

- 850 ml H<sub>2</sub>O
- Titration auf pH = 7,0 mit HCl
- Filtration

PBS nach Otto („PBS Otto“), pH 7,5:

- K<sub>2</sub>HPO<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

#### **7.4.3. Software**

- ClickCharts Flussdiagramm-Software
- Microsoft Office 2019 (Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint)
- PubMed der National Library of Medicine
- ZEN 3.0 & 3.3, Fa. Carl Zeiss

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als die gekennzeichneten Hilfsmittel verfasst habe. Wo Daten aus anderen Quellen übernommen wurden, ist dies mit Angabe der Quelle vermerkt.

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

Regensburg, 16.11.2022

---

Julius Baier

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

An erster Stelle gebührt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Schweda, der mir das interessante Thema sowie die für die Arbeit notwendigen Räumlichkeiten und Mittel zur Verfügung stellte. Seine außerordentlich gute Betreuung sowie seine Anregungen zum wissenschaftlichen und experimentellen Vorgehen machten mir die Durchführung der Arbeit erst möglich. Sein jederzeit offenes Ohr und die faire und kontinuierliche Betreuung trugen einen großen Teil zu meiner Motivation bei.

An weiterer Stelle danke ich meiner Betreuerin Dr. Anna Federlein, welche mich in die praktischen Laborarbeiten einführte und mir jederzeit mit einer ehrlichen Rückmeldung sowie bei Fragen zur Verfügung stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Kollegen der Arbeitsgruppe Schweda des Lehrstuhls für Physiologie II bedanken, welche mir die notwendigen Tricks und Kniffe in der Laborarbeit zeigten, insbesondere Katharina Ortmaier für die Unterstützung bei der Arbeit mit Labortieren und Robert Götz für die Perfusion der Mäuse. Dr. Katharina Broeker und Dr. Michaela Fuchs danke ich für die Einführung in die Technik der in-situ-Hybridisierung.

An letzter und zugleich erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung und Motivation bedanken; besonders in den zäheren Phasen der Arbeit konnte ich mir ihrer Unterstützung immer gewiss sein.