

Funktionelle Bedeutung und Regulation von Renin in interstitiellen Zellen der Niere



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

vorgelegt von
Claudia Lehrmann
aus Würzburg
im Jahr 2024

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 08.01.2024

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

Unterschrift: _____

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Niere	5
1.1.1 Anatomie und Funktion der Niere.....	5
1.1.2 Anatomie und Funktion des Nephrons	6
1.2 Physiologische Bedeutung von Renin	8
1.2.1 Juxtaglomeruläre Zelle	8
1.2.2 Synthese und Freisetzung von Renin.....	9
1.2.3 Systemisches Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	10
1.2.3.1 Regulation des Blutdrucks	12
1.2.3.2 Regulation des Salz -und Wasserhaushalts.....	12
1.2.4 Regulation der Renin-Freisetzung.....	13
1.2.4.1 Blutdruck	14
1.2.4.2 Sympathikus	14
1.2.4.3 NaCl-Konzentration.....	14
1.2.4.4 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg	15
1.2.4.5 Calcium	16
1.2.4.6 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg	17
1.2.4.7 Adenosintriphosphat/PGE ₂ -Freisetzung durch Macula densa-Zellen.....	18
1.3 Pathophysiologische Bedeutung des RAAS	18
1.3.1 Prorenin und Proreninrezeptor (PRR)	19
1.3.2 Lokales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	21
1.4 Interstitium und interstitielle Zelle	23
1.5 Chronische Nierenerkrankung (CKD)	24
1.5.1 Chronische Nierenerkrankung im Mausmodell: Adeninnephropathie	25
1.5.2 Chronische Nierenerkrankung im Mausmodell: Diabetische Nephropathie.....	25
2 Fragestellung und Zielsetzung	27
3 Methoden.....	28
3.1 Versuchstiere.....	28
3.1.1 Haltung der Versuchstiere	28
3.1.2 Verwendete Mauslinien	28
3.1.3 Generierung der Ren 1 flox Mäuse	28
3.1.4 Generierung von PDGFR β Cre Ren 1 ^{flox/flox} Mäuse (im Folgenden: PDGFR β Ren KO).....	29
3.1.5 Generierung von PDGFR β Cre Reporter Mäuse (im Folgenden: PDGFR β tomato)	29
3.1.6 Genotypisierung der Mäuse.....	30
3.1.7 Induktion der PDGFR β Ren1 WT/KO und PDGFR β tomato Mäuse	30

3.1.8 Behandlung mit Adeninfutter (0,2 %).....	30
3.1.9 Behandlung mit Streptozotocin (STZ) (low-dose).....	30
3.1.10 Behandlung mit Isoproterenol [180].....	31
3.1.11 Behandlung mit Enalapril und Niedrigsalz-Diät	31
3.1.12 Blutabnahme.....	31
3.1.13 Spontanurin	32
3.1.14 GFR-Messung	32
3.1.15 Blutdruck-Messung mithilfe Tail Cuff Plethysmographie	32
3.1.16 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd (PFA).....	33
3.1.17 Isoliert perfundierte Niere mit Brefeldin A	33
3.2 Histologie.....	34
3.2.1 Paraffineinbettung.....	34
3.2.2 Immunfluoreszenz- Färbungen- Paraffinschnitte.....	34
3.2.3 Immunfluoreszenz- Färbungen Gefrierschnitte	35
3.2.4 Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit	35
3.3 In-situ Hybridisierung: RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit (brown)/ RNAscope® Multiplex Fluorescent Assay	36
3.4 Mikroskopie: Licht-/Fluoreszenzmikroskopie.....	36
3.5 RNA-Isolation und -Analyse.....	37
3.5.1 RNA-Isolation aus dem Nierengewebe.....	37
3.5.2 RNA-Isolation aus PDGFR β -Zellen (Primärkultur)	37
3.5.3 Quantifizierung der mRNA und Umschreiben in cDNA.....	37
3.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	38
3.6 Blutanalysen	38
3.6.1 Bestimmung der Plasmakonzentration von Renin bzw. Prorenin	38
3.6.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von Aldosteron	39
3.7 Urinanalysen-Spontanurin	39
3.7.1 Osmolarität	39
3.7.2 Kreatinin-Konzentration	39
3.7.3 Elektrolytkonzentration	40
3.7.4 Albumin-Konzentration im Urin	40
3.7.5 Renin-Konzentration im Urin.....	41
3.8 Renin-Konzentration im Gewebe.....	41
3.9 Zellkultur.....	41
3.9.1 Isolation von PDGFR β -Zellen (Primärkultur) aus der Mausniere.....	41
3.9.2 Stimulation der PDGFR β -Zellen mit PGE ₂	43
3.10 Statistische Auswertung	44
4 Ergebnisse	45

4.1 Generierung und Charakterisierung der PDGFR β -Cre Renin Knockout/ PDGFR β -Cre mTmG Maus.....	45
4.2 Physiologische Parameter der PDGFR β Ren KO und WT Mäuse.....	49
4.2.1 Körper- und Organgewichte.....	49
4.2.2 Renin-Expression im Nierengewebe	50
4.2.3 Renin-, Prorenin-, und Aldosteron-Konzentration im Plasma	52
4.2.4 Osmolarität, Elektrolytkonzentration im Urin	53
4.2.5 Albumin-Konzentration.....	55
4.2.6 Blutdruck	55
4.2.7 Zusammenfassung.....	56
4.3 Funktionelle Bedeutung von Renin aus interstitiellen Zellen der Niere im Krankheitsmodell	57
4.3.1 Blutzuckerspiegel.....	57
4.3.2 Körpergewicht, Nieren- und Herzgewicht	58
4.3.3 Untersuchung der Renin mRNA bei einer Adeninnephropathie	59
4.3.4 Untersuchung von juxtaglomerulärem (Pro)-Renin (Protein) bei einer Adeninnephropathie.....	62
4.3.5 Untersuchung der Renin mRNA bei einer diabetischen Nephropathie	63
4.3.6 Aktives Renin und Prorenin im Plasma unter Schädigungsbedingungen.....	65
4.3.7 Urin: Osmolarität und Elektrolytkonzentration	67
4.3.8 Renin-Konzentration im Urin.....	69
4.3.9 Pathologische Unterschiede der PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse unter Kontroll- und Schädigungsbedingungen.....	70
4.3.9.1 Albuminausscheidung im Urin.....	70
4.3.9.2 Renale Fibronectin, Kollagen I und III, F4/80 Expression	71
4.3.9.3 Glomeruläre Filtrationsrate	78
4.4 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen durch physiologische Stimuli	79
4.4.1 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen: chronische Renin Stimulation	79
4.4.2 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen: akute Renin Stimulation	82
4.5 Zellkulturexperimente: Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen.....	82
5 Diskussion	87
5.1 Regulation und funktionelle Bedeutung von Renin in interstitiellen Zellen unter physiologischen Bedingungen	87
5.2. Regulation und funktionelle Bedeutung von Renin aus interstitiellen Zellen der Niere bei chronischer Nierenschädigung.....	94
6 Zusammenfassung.....	104
7 Abstract	106
8 Literatur	107

9 Anhang	127
9.1 Materialien und Geräte	127
9.2 Protokolle	138
9.3 Abbildungsverzeichnis	150
9.4 Abkürzungsverzeichnis	152
9.5 Kongressbesuche	155
9.6 Eidesstattliche Erklärung	156
10 Danksagung	157

1 Einleitung

1.1 Niere

1.1.1 Anatomie und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes viszerales Organ, welches durch den Blutzufluss der Arteria renalis mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Der Blutabfluss erfolgt über die Vena renalis. Der in den Nieren produzierte Urin fließt durch die beiden Harnleiter (Ureter) in die Harnblase und wird anschließend über die Harnröhre (Urethra) ausgeschieden. Morphologisch ist die Niere in eine äußere Zone, die Nierenrinde (Cortex), und eine innere Zone, das Nierenmark (Medulla), unterteilt. Das Nierenmark besteht aus mehreren Nierenpyramiden, deren Papillen den Urin in becherförmige Kelche leiten. Von dort aus fließt der Urin in das Nierenbecken und wird über den Ureter in die Harnblase transferiert (siehe Abbildung 1) [1–3].

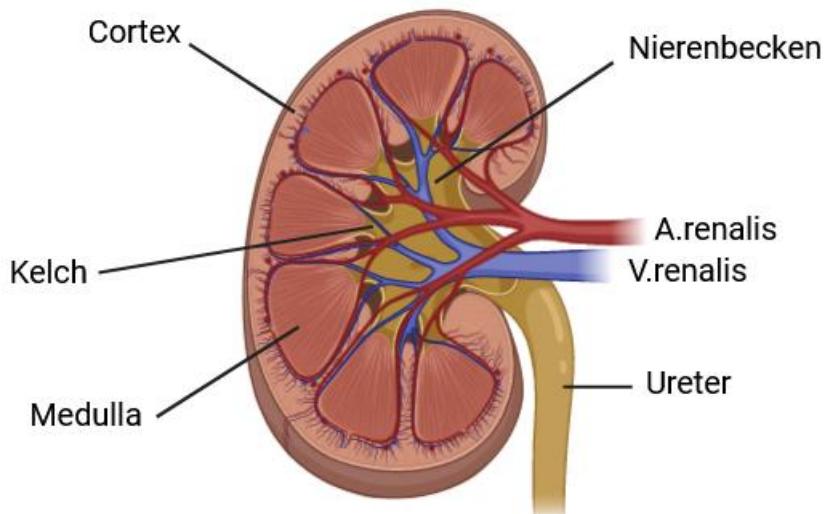


Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Niere im Querschnitt
Erstellt mit Biorender

Die Niere ist ein Hauptausscheidungsorgan im menschlichen Körper, das für die Elimination von überschüssigen und schädlichen Stoffen verantwortlich ist, einschließlich Stoffwechselendprodukten wie Harnsäure, Harnstoff, Ammoniumionen sowie wasserlöslichen Pharmaka und Toxinen. Eine ebenso bedeutende Funktion der Niere besteht in der Regulation des Blutdrucks, des Elektrolyt-, Wasser- und Mineralhaushalts [1–3]. Die Hormone Aldosteron, Angiotensin II und das antidiuretische Hormon (ADH) spielen hierbei eine entscheidende Rolle.

Die Niere fungiert aber nicht nur als Zielorgan für endokrine Wirkungen, sondern synthetisiert auch selbst eine Vielzahl von Hormonen, die eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Blutdruck, Blutbildung, Elektrolyt- Mineral- und Wasserhaushalt spielen. Neben dem Hormon Renin, das in meiner vorliegenden Arbeit ausführlich behandelt wird und im zweiten Punkt

meiner Einleitung genauer erläutert wird, produziert die Niere auch wichtige Hormone wie Erythropoetin (EPO), Calcitriol und Klotho [1–3].

1.1.2 Anatomie und Funktion des Nephrons

Das Nephron bildet die funktionelle Einheit der Niere, es besteht aus einem Gefäßknäuel (Glomerulus) und dem Tubulussystem (siehe Abbildung 2). Der Glomerulus, der aus einem verzweigten Netzwerk von Kapillaren besteht, wird über das Vas afferens mit Blut versorgt. Über das Vas efferens verlässt das Blut den Glomerulus wieder. In unmittelbarer Nähe des Glomerulus befindet sich der juxtaglomeruläre Apparat, der aus der Macula densa, den reninhaltigen granulierten Zellen (juxtaglomerulären Zellen) und den extraglomerulären Mesangiumzellen besteht.

Der Glomerulus ist von der Bowman-Kapsel umgeben. Zwischen dem Innenraum der Kapillarschlingen und der Bowman-Kapsel besteht eine hochselektive Filtrationsbarriere. Diese Barriere setzt sich aus einem fenestrierten Endothel, einer dreischichtigen Basalmembran und einer Schlitzmembran mit Podozyten zusammen. Das Blut in den Kapillaren wird an dieser Barriere filtriert und als resultierender Primärharn schließlich von der Bowman-Kapsel in den proximalen Tubulus geleitet. Die wichtigste Aufgabe des Tubulussystems besteht darin, den Primärharn so zu modifizieren, dass Substanzen, die nicht ausgeschieden werden sollen, wie z.B. Glukose, aus dem Primärharn rückresorbiert werden, während ausscheidungspflichtige Substanzen im Harn verbleiben und konzentriert werden. Zudem müssen etwa 99 % des filtrierten Wassers, etwa 180 Liter pro Tag, rückresorbiert werden, damit sie nicht mit dem Endharn verloren gehen. Diese Funktionen werden durch zahlreiche Transport- und Resorptionsprozesse an verschiedenen Tubulusabschnitten bewerkstelligt. Ausgehend von der Bowman-Kapsel bildet der proximale Tubulus den Anfang des Tubulussystems. Der größte Teil der Resorptionsvorgänge von Natriumchlorid (NaCl), Wasser (H_2O) und Glukose findet dort statt. Der mitochondrienreiche proximale Tubulus der Niere zeichnet sich durch einen Bürstensaum an seiner luminalen Seite aus, der es ihm ermöglicht, seine Zelloberfläche um das 30- bis 60-fache zu vergrößern. Diese Oberflächenvergrößerung steigert die Resorptionsrate des proximalen Tubulus, wodurch etwa 65 % des filtrierten Natriums (Na^+) und Wassers und nahezu 100 % der Glukose zurückgewonnen werden. Im proximalen Tubulus sind die meisten Transportprozesse mit der Na^+ -Resorption verbunden. Über eine Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran wird der dafür notwendige elektrochemische Gradient aufrechterhalten. Die Aufnahme von Glukose aus der Tubulusflüssigkeit in die Zelle wird durch die luminalen Natrium-Glukose-Symporter (SGLT1/SGLT2) vermittelt. Glukose verlässt die proximale Tubuluszelle wieder durch die basolateralen Uniporter Glut 2 und Glut 5. Ein weiterer bedeutender Na^+ -abhängiger Transportprozess an der luminalen Seite des proximalen Tubulus ist der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE3), der H^+ -Ionen gegen Na^+ aus der Zelle transportiert.

Dieser Austauschmechanismus ist wesentlich an dem Säure-Base-Gleichgewicht des Körpers beteiligt.

Die Henle-Schleife spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung osmotischer Gradienten, die für die Konzentrierung des Urins erforderlich sind. Sie besteht aus einem dünnen absteigenden Schenkel, der für Wasser durchlässig, aber undurchlässig für NaCl ist, wodurch der Harn in Richtung Nierenmark konzentriert wird. Der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife hingegen ist durch den Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter (NKCC2) an der apikalen Seite gekennzeichnet und somit ionendurchlässig. Er ist jedoch undurchlässig für Wasser, wodurch die Osmolarität der Tubulusflüssigkeit in Richtung Nierenkortex abnimmt. Nach der Henle-Schleife beginnt der nur sehr gering wasserdurchlässige distale Tubulus. Dieser trägt hauptsächlich zur Ionenresorption und damit zur weiteren Hypotonisierung des Harns bei. Ein wichtiger Transporter im distalen Tubulus ist der Natrium-Chlorid-Kotransporter (NCC). Dieser Transporter ist für die Rückresorption von Natrium- und Chloridionen aus der Tubulusflüssigkeit in das Blut verantwortlich. Der letzte Abschnitt des Nephrons ist das Sammelrohr. Im Sammelrohr sind die Hauptzellen maßgeblich an der Natriumresorption beteiligt, der epitheliale Na^+ (ENaC)-Kanal ist für diesen Prozess an der luminalen Seite verantwortlich. Gleichzeitig übernehmen die Hauptzellen die Kaliumsekretion durch den Kalium-Kanal (ROMK). Die Schaltzellen hingegen haben vorrangig die Aufgabe, den pH-Wert im Blut zu regulieren. Die Schaltzellen Typ A sezernieren Protonen in das Lumen über die H^+ -ATPase oder die H^+/K^+ -ATPase. Die Schaltzellen Typ B sezernieren Bicarbonat hauptsächlich über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (Pendrin). Die Rückresorption von Wasser im Sammelrohr kann weitgehend unabhängig von der Natriumresorption erfolgen und wird durch Wasserkanäle, insbesondere den Aquaporin-2 (AQP2)-Kanal, reguliert [1–4].

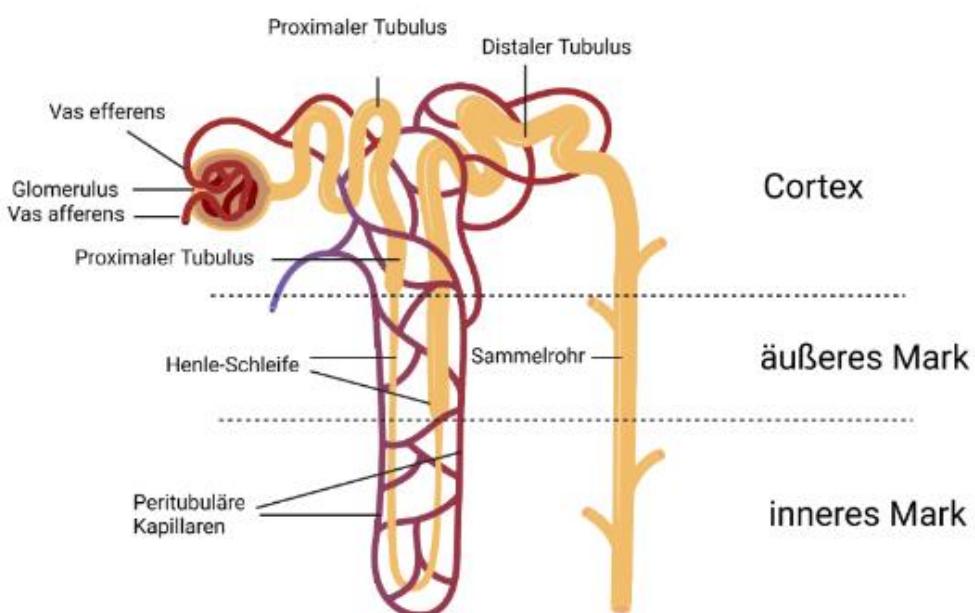


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Nephrons
Erstellt mit Biorender

1.2 Physiologische Bedeutung von Renin

Im Jahr 1898 wurde Renin erstmals durch den Physiologen Robert Tigerstedt und seinen Studenten Per Bergman am Karolinska-Institut entdeckt. Zu dieser Zeit ahnte noch niemand, dass diese Entdeckung in der medizinischen Wissenschaft so bedeutende Fortschritte ermöglichen würde, insbesondere im Hinblick auf die Behandlung von Patienten mit Bluthochdruck [5,6].

1.2.1 Juxtaglomeruläre Zelle

Juxtaglomeruläre Zellen sind modifizierte glatte Muskelzellen in der Niere. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass sie charakteristische Strukturen von glatten Muskelzellen, wie Myofilamente in ihrem Zytoskeletten aufweisen. Zusätzlich zu ihren myogenen Eigenschaften besitzen juxtaglomeruläre Zellen auch endokrine Merkmale und werden daher als myoendokrine Zellen bezeichnet [7]. Besonders hervorzuheben ist ihre Fähigkeit zur Synthese von Renin. Als Hauptproduzenten von Renin tragen die juxtaglomerulären Zellen maßgeblich zur Regulierung des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bei, welches entscheidend für die Regulation des Blutdrucks und des Wasser-Elektrolyt-Haushalts im menschlichen Körper ist [8].

Die juxtaglomerulären Zellen enthalten ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum sowie sekretorische Granula, die Renin enthalten und aus dem Golgi-Apparat stammen. Diese Granula lassen sich in zwei Haupttypen unterteilen: Während große elektronendichte Granula hauptsächlich aktives Renin enthalten, sind kleinere Progranula mit Prorenin beladen [7]. Am juxtaglomerulären Apparat befinden sich Epithelzellen des distalen Tubulus, die mit ihrer basolateralen Membran in Kontakt mit glomerulären Mesangiumzellen stehen, die wiederum an reninhaltige juxtaglomeruläre Zellen der afferenten Arteriole grenzen. Die Epithelzellen des distalen Tubulus werden an dieser Stelle als Macula densa bezeichnet [9]. Die Zellen der Macula densa messen mithilfe des luminalen NKCC2 die NaCl-Konzentration in der Tubulusflüssigkeit und geben diese Information an die juxtaglomerulären Zellen weiter. Der Mechanismus dahinter wird in Kapitel 1.2.4 genauer beschrieben. Wenn sich die tubuläre Chloridkonzentration an der Macula Densa erhöht, kommt es zu einer tubuloglomerulären Rückkopplung (TGF), die eine Konstriktion der afferenten Arteriole und folglich eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) des einzelnen Nephrons bewirkt [10]. Ausgehend von der Information der Macula densa regulieren die juxtaglomerulären Zellen aber auch die Reninsekretion [3,7]. Eine niedrige Konzentration von NaCl führt zu einer verstärkten Freisetzung von Renin und zur Aktivierung des RAAS. Die Aktivierung des RAAS bewirkt eine erhöhte Rückresorption von NaCl aus dem Harn, um die Elektrolytkonzentration im Körper aufrechtzuerhalten [11,12]. Bei einer hohen NaCl Konzentration in der Tubulusflüssigkeit hingegen wird die Renin-Freisetzung gehemmt [12]. Eine chronische Stimulation des RAAS durch beispielsweise Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Inhibitoren

kann die Anzahl und Verteilung von juxtaglomerulären Renin-produzierenden Zellen erhöhen. Dieser Vorgang wird „Rekrutierung“ von Renin-produzierenden Zellen genannt [13]. Angiotensin II (ANG II), der eigentliche Effektor des RAAS übt eine negative Rückkopplung auf die Renin-Freisetzung und die Renin-Genexpression aus. Die Aufhebung der negativen Rückkopplung infolge von verringriger ANG II-Konzentration durch ACE-Hemmer, kann zur Ausdehnung der Renin-produzierenden Zellen weit über die Grenzen des juxtaglomerulären Apparats hinaus bis zur Arteria interlobularis führen [14,15].

1.2.2 Synthese und Freisetzung von Renin

Die Freisetzung von Renin hängt zum größten Teil von der Aktivität des Renin-Synthesewegs ab, d. h. vom Grad der Genaktivierung und der Transkriptionseffizienz in der einzelnen Zelle und von der Gesamtzahl der Renin-produzierenden Zellen [16]. Im Gegensatz zum Menschen, der nur ein Renin-Gen besitzt, besitzen manche Mäusestämme auf dem Chromosom 1 zwei Renin-Gene (Ren-1 und Ren-2), die höchstwahrscheinlich durch Genduplikationen zwischen zwei Sequenzen entstanden sind. Allerdings weisen viele Inzuchtstämme von Mäusen, wie z.B. C57BL/6, nur einen Renin-Locus auf. Ren-1 ist in allen Mäusen vorhanden und kodiert für das klassische zirkulierende Renin. Das Genprodukt von Ren-2 wird hauptsächlich in den submandibulären und submaxillären Drüsen produziert [17–20].

Innerhalb der Promotorregion des Renin-Gens befinden sich verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die die Aktivierung oder Unterdrückung der Gen-Transkription steuern. Eine der Bindungsstellen, die für die Regulation der Renin mRNA-Transkription verantwortlich ist, ist das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-response Element (CRE). Dieses Element kann vom cAMP-bindenden Protein (CREB) erkannt und gebunden werden [21]. Sobald CREB an das cAMP-response Element bindet, wird die Transkription der Renin mRNA aktiviert [22,23].

Bei der Translation entsteht zunächst Präprorenin, welches beim Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum die „Prä“- Sequenz abgespalten wird. Das entstandene enzymatisch inaktive Prorenin wird in den Golgi-Apparat transferiert und kann nun auf zwei verschiedenen Wegen sezerniert werden. Beim konstitutiven Weg wird Prorenin im Golgi-Apparat in kleine, klare Vesikel verpackt und als Prorenin freigesetzt. Myoendokrine juxtaglomeruläre Zellen nutzen wie andere endokrine Zellen auch den Weg der regulierten Sekretion und sind in der Lage, Prorenin in dichte, sekretorische Vesikel zu sortieren und durch regulierte Exozytose freizusetzen. Bei diesem Weg wird Prorenin in den Granula proteolytisch durch Entfernung seiner „Pro“- Sequenz bspw. durch Prohormonkonvertasen [24] oder Cathepsin B [25] gespalten, und schließlich als aktives Renin sezerniert [16,26]. Es wird vermutet, dass die regulierte Exozytose bei Mäusen mit zwei Renin-Genen ausschließlich durch das Ren-1-Gen zustande

kommt, da dem Ren-2-Gen höchstwahrscheinlich die für den Transport in dichte sekretorische Kernvesikel erforderlichen Glykosylierungsstellen fehlen [16,27].

Die Freisetzung von Prorenin in den Kreislauf erfolgt beim Menschen hauptsächlich über den konstitutiven Weg, was zu einer deutlich höheren Konzentration an Prorenin im Vergleich zu aktivem Renin im Plasma führt. In Kombination mit Prorenin-Quellen aus extrarenalen Geweben macht die „Pro“-Form des Renins etwa 80-90% des gesamten Renins aus [16].

1.2.3 Systemisches Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (siehe Abbildung 3) ist eine enzymatische Kaskade, die hauptsächlich den Elektrolyt- und Wasserspiegel sowie den Blutdruck im menschlichen Körper reguliert. Neben dieser physiologischen Rolle spielt das RAAS auch eine entscheidende Rolle bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und der Nieren, wie arterielle Hypertonie und diabetische Nephropathie [28]. Aus diesem Grund gehören Arzneistoffe, die das RAAS inhibieren, wie ACE-Inhibitoren und Angiotensin-II-Rezeptor vom Typ 1 (AT1-R)-Blocker zur Standardtherapie bei diesen Erkrankungen [29]. Die Reaktionsgeschwindigkeit des RAAS hängt von der Konzentration des Hormons/Enzyms Renin ab. Aus diesem Grund wird die Enzymkonzentration oft als Maß für die Gesamtaktivität des RAAS verwendet. Den Anfang des RAAS bildet das Glykoprotein Angiotensinogen, das konstitutiv aus Leberzellen freigesetzt wird und dementsprechend im Überschuss im Blut vorliegt [30–33]. Renin ist eine Aspartylprotease, deren einziges bekanntes Substrat Angiotensinogen [32] ist und die von diesem das Decapeptid Angiotensin I (ANG I) abspaltet. ANG I hat keine biologische Wirkung und wird durch das ACE1, welches hauptsächlich auf der Oberfläche der Endothelzellen der Lunge exprimiert wird, durch Abspaltung von zwei Aminosäuren in ANG II umgewandelt. ANG II ist der zentrale Wirkstoff des RAAS und vermittelt seine Effekte überwiegend durch Bindung an den G_q-Protein-gekoppelten Angiotensin-II-Rezeptor vom Typ 1 (AT1-R). Die Aktivierung des AT1-R durch ANG II stimuliert die Phospholipase C-Aktivität, was zur Entstehung von Inositol-Trisphosphat und einem Anstieg des Calcium (Ca²⁺)-Spiegels führt [34]. Dies aktiviert mehrere Kinasen, einschließlich der Proteinkinase C [35]. Die Bindung von ANG II an den AT1-R führt zu einer gesteigerten Natriumresorption in der Niere (vgl. Abschnitt 1.2.3.2). Darüber hinaus induziert ANG II eine Vasokonstriktion, wie in Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, wobei die Vasokonstriktion hauptsächlich in der efferenten Arteriole und weniger in der afferenten Arteriole in der Niere auftritt. Zusätzlich zu diesen Effekten löst die Bindung von ANG II an den AT1-Rezeptor weitere physiologische Reaktionen aus, wie die Stimulation des Durstgefühls, die Erhöhung des Appetits nach salzhaltigen Nahrungsmitteln, die Aktivierung des Sympathikus und die Förderung der Freisetzung von Aldosteron, dem terminalen Hormon des RAAS, das in Abschnitt 1.2.3.2 genauer beschrieben wird. Im Gegensatz dazu bewirkt die Bindung von ANG II an den Angiotensin-II-Rezeptor vom Typ 2 (AT2-R) nicht die gleichen

Effekte wie an den AT1-Rezeptor, sondern eher entgegengesetzte Wirkungen. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass der AT2-R im Vergleich zum AT1-R eine untergeordnete Rolle beim Menschen spielt [36,37]. Zusätzlich zu den „klassischen“ Komponenten des RAAS wurden weitere Enzyme und ANG-Fragmente entdeckt, die in der RAAS-Kaskade involviert sind. Im Blutkreislauf kann ANG II durch verschiedene Aminopeptidasen in ANG III und ANG IV gespalten werden. ANG III zeigt ähnliche blutdrucksteigernde Wirkungen wie ANG II. Hingegen ist der Signalmechanismus und die renale Wirkung von ANG IV umstritten und nicht vollständig verstanden [35,38–40]. Neben ACE1 gibt es auch noch weitere Enzyme wie ACE2, die ANG I spalten können. ACE2 hydrolysiert den terminalen Carboxy-Rest von Leucin des ANG I und bildet dadurch ANG 1-9, was durch weitere Enzyme zu ANG 1-7 umgewandelt werden kann [41,42]. ANG 1-7 selbst wirkt auf den Rezeptor MAS und beeinflusst eine Reihe von Mechanismen in Herz, Niere, Gehirn und anderen Geweben [43]. Der Prorenin-Rezeptor (PRR) (vgl.1.3.1), der sowohl das enzymatisch inaktive Prorenin als auch Renin bindet, beschleunigt einerseits die Bildung von Angiotensin I, andererseits zeigt er auch RAAS unabhängige Wirkungen [44]. Dies unterstreicht die Tatsache, dass die RAAS-Kaskade viel komplexer ist und mehr biologische Wirkungen entfaltet, als ursprünglich angenommen und in den meisten Lehrbüchern dargestellt ist [45].

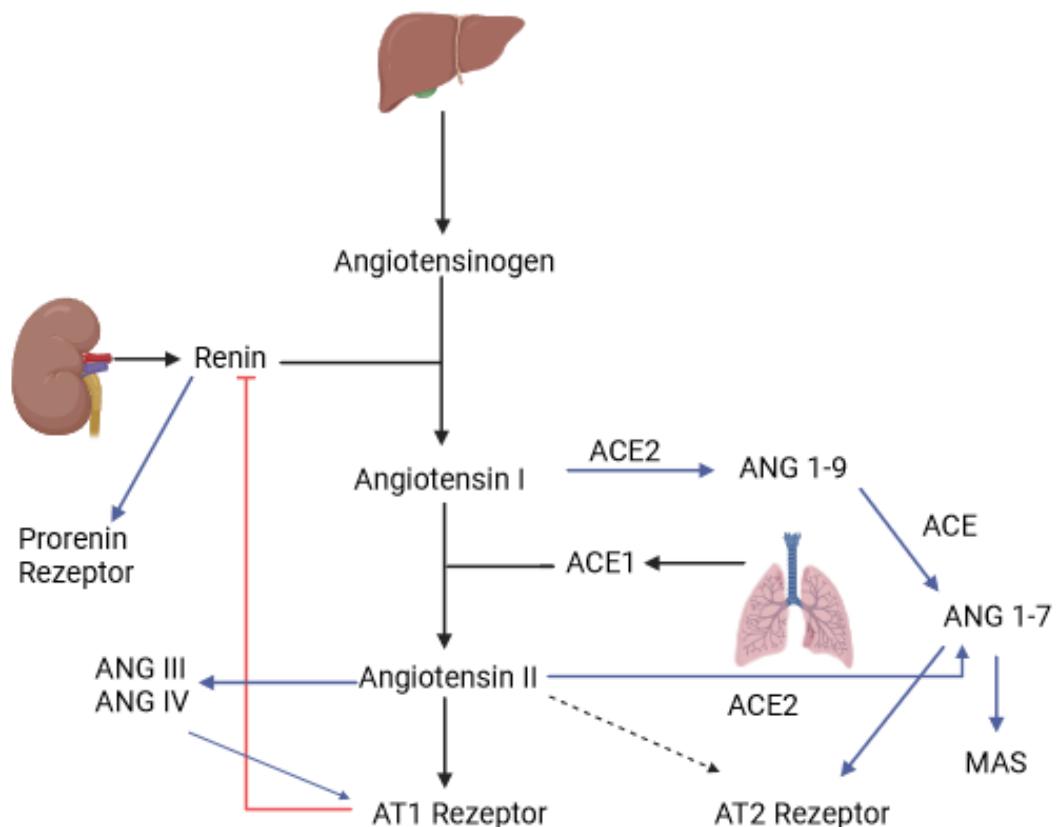


Abbildung 3 Schematische Darstellung des systemischen RAAS
Erstellt mit Biorender

1.2.3.1 Regulation des Blutdrucks

Das RAAS spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Die Bindung von ANG II an AT1-Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen führt einerseits zu einer systemischen Vasokonstriktion und erhöht dadurch den peripheren Widerstand [46]. Andererseits verstärkt ANG II die durch Endothelin-1 induzierte Vasokonstriktion an glatten Gefäßmuskelzellen. Die Bindung von ANG II an den AT1-Rezeptor bewirkt zum einen eine erhöhte Expression des Endothelin-A-Rezeptors und zum anderen eine Zunahme der Affinität von Endothelin-1 an seinen Rezeptor. Somit können ANG II und Endothelin-1 synergistisch den Blutdruck erhöhen [47].

Die blutdrucksteigernde Wirkung des RAAS wird zusätzlich durch die gesteigerte Bildung von Vasopressin, auch bekannt als antidiureisches Hormon (ADH) oder Arginin-Vasopressin (AVP), aus dem Hypophysenhinterlappen hervorgerufen. ADH wirkt über den Vasopressin Suptyp 1 (V1) -Rezeptor, welcher vorwiegend in den Gefäßwänden von Arterien, Arteriolen und Venen exprimiert wird. Die Bindung von ADH an den V1-Rezeptor führt zu einer vasokonstriktorischen Wirkung, die durch das Phosphatidylinositolsystem vermittelt wird. Dieser Mechanismus trägt zu einer erhöhten Vasokonstriktion und somit zu einer Steigerung des Blutdrucks bei [1,48].

Das Hormon ANG II entfaltet seine Wirkung nicht nur in peripheren Geweben, sondern auch im zentralen Nervensystem durch die Bindung an AT1-Rezeptoren in zirkumventrikulären Organen, was zu einer Erhöhung der sympathischen Nervenaktivität führt. Darüber hinaus bewirkt ANG II eine Steigerung der Aktivität der peripheren sympathischen Nerven, indem es sowohl die Freisetzung als auch die Synthese von Noradrenalin erhöht und die Aufnahme von Noradrenalin an den Nervenenden hemmt [49–51]. Durch die Sympathikusaktivierung und die damit verbundene verstärkte Freisetzung von Katecholaminen kommt es über Rezeptorwirkungen ebenfalls zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Die blutdrucksteigernde Wirkung des RAAS wird allerdings nicht nur durch die direkte Wirkung an den Gefäßen, sondern auch durch die verstärkte Salz- und Wasserretention herbeigeführt. Die gesteigerte Rückhaltung von Wasser und Salz führt zu einer Erhöhung des gesamten zirkulierenden Blutvolumens im Kreislaufsystem, was wiederum eine Erhöhung des Blutdrucks verursacht.

1.2.3.2 Regulation des Salz -und Wasserhaushalts

Das RAAS ist wesentlich an der Regulation des Wasser- und Salzhaushalts im Organismus beteiligt, wobei das „Salzhormon“ Aldosteron eine entscheidende Rolle spielt. Durch Bindung an AT1-Rezeptoren wird in der Zona glomerulosa der Nebenniere die Aldosteronsynthase stimuliert, die aus 11-Desoxykortikosteron Aldosteron produziert. Aldosteron bindet in den Hauptzellen der Sammelrohre an zytosolische Mineralokortikoidrezeptoren, wodurch die Anzahl der epithelialen Natriumkanäle (ENaC) an der apikalen Membran erhöht wird, was die

Natriumresorption in die interstitielle Nierenflüssigkeit verstärkt. Dies hat wiederum eine verstärkte Wasserresorption zur Folge. Gleichzeitig werden $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPasen an der basolateralen Membran aktiviert, K^+ wird aktiv in die Zelle transportiert. Die elektrochemische Antriebskraft für den Kaliumaustritt aus der Tubuluszelle an der apikalen Membran wird folglich erhöht. Dies führt zu einer erhöhten Kaliumsekretion durch den luminal exprimierten Kaliumkanal ROMK. Mineralokortikoidrezeptoren sind auch in verschiedenen Bereichen des Gehirns vorhanden, wodurch Aldosteron sowohl den Salzappetit als auch das Durstgefühl stimulieren kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Aldosteron eine bedeutende Rolle bei der Homöostase von Wasser und Salz im Körper spielt und das Flüssigkeitsvolumen in den Blutgefäßen erhöht, was zu einem Anstieg des Blutdrucks führt [1,52–55].

AT1-Rezeptoren sind auch an verschiedenen Stellen der luminalen und basolateralen Membran des proximalen und distalen Tubulus vorhanden. Durch die Bindung von ANG II an diese Rezeptoren wird die Natriumresorption direkt erhöht. In diesem Zusammenhang aktiviert ANG II den apikalen Natrium-Wasserstoff-Austauscher (NHE3) sowie den basolateralen Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (NBC1) im proximalen Tubulus. Des Weiteren kann ANG II die Aktivität des NaCl -Kotransporters (NCC) im distalen Nephron steigern [56].

Wie bereits beschrieben wurde, führt die Aktivierung des RAAS zu einer erhöhten Freisetzung des Hormons ADH. Die Wirkung von ADH auf den Wasserhaushalt und den Blutdruck wird hauptsächlich über die membranständigen G_s -gekoppelten V2-Rezeptoren der renalen Sammelrohre vermittelt. Bei der Bindung von ADH an den Rezeptor wird intrazelluläres cAMP gebildet, das die Permeabilitätssteigerung durch den Einbau von Wasserkanälen (AQP2) an der luminalen Seite der Zellmembran herbeiführt. Somit kann Wasser entlang seines osmotischen Gradienten in das hypertone Interstitium des Nierenmarks abfließen [53,57,58]. Schließlich kann ADH über V3-Rezeptoren die ACTH-Sekretion in der Hypophyse stimulieren [59]. ACTH stimuliert über den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) nicht nur die Synthese von Cortisol, sondern auch von Aldosteron in der Nebennierenrinde [60].

1.2.4 Regulation der Renin-Freisetzung

Aktives Renin wird in sekretorischen Granula der juxtaglomerulären Zellen gespeichert und durch vier Hauptreize freigesetzt: [54]

- Absinken des renalen Perfusionsdrucks
- $\beta 1$ -Rezeptor vermittelte Sympathikuswirkung
- Abnahme der Natriumchlorid-Konzentration an der Macula densa
- Verschiedene Hormone, Autakoide und lokal sezernierte Faktoren

1.2.4.1 Blutdruck

Wie bereits erwähnt, kann durch die Aktivierung des RAAS der Blutdruck erhöht werden. Feedbackmechanismen, die durch Änderungen des arteriellen Blutdrucks ausgelöst werden, können aber wiederum die Freisetzung von Renin beeinflussen. Ein Anstieg des Blutdrucks hemmt die Synthese und Sekretion von Renin, während eine Abnahme des Blutdrucks die Freisetzung von Renin stimuliert. Ein erhöhter Blutdruck lässt den renalen Perfusionsdruck steigen und beeinflusst damit den intrarenalen Barorezeptor-Mechanismus (siehe Abschnitt 1.2.4.5). Darüber hinaus führt ein erhöhter Blutdruck zu einer druckabhängigen Natriurese, die wiederum eine höhere NaCl-Konzentration an der Macula densa bewirkt (siehe 1.2.4.3) [61].

1.2.4.2 Sympathikus

Eine Erhöhung der Aktivität sympathischer Nervenfasern in der Niere führt unmittelbar zu einer Freisetzung von Renin. Das Vorhandensein von β_1 -adrenergen Rezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen wurde durch mehrere Rezeptorbindungs-Untersuchungen und in situ Hybridisierungen nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine selektive und direkte Stimulation der Renin-Sekretion durch eine erhöhte Aktivität des Nieren-Sympathikus induziert wird [61,62].

1.2.4.3 NaCl-Konzentration

Die Salzaufnahme stellt einen wichtigen Regulator der Aktivität des RAAS dar. Eine reduzierte Zufuhr von Salz führt zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion von Renin. Eine hohe Salzaufnahme hemmt die Freisetzung von Renin, was wiederum eine gesteigerte Ausscheidung von Salz bewirkt und somit zur Natriurese führt [63]. Es wurde festgestellt, dass die Gabe von Metoprolol die Reaktion der Renin-Sekretion auf die Salzaufnahme nicht beeinflusst. Dies legt nahe, dass die salzabhängige, regulatorische Hemmung der Renin-Sekretion nicht durch adrenerge Rezeptoren vermittelt wird [63]. Außerdem wurde gezeigt, dass das Fehlen der β_1 - und β_2 -Rezeptoren in Mäusen zu einer signifikanten Verringerung ihrer Plasma Renin-Konzentration führt. Interessanterweise blieben jedoch die Reaktionen der Plasma Renin-Konzentration auf natriumreiche und natriumarme Diäten bei diesen Knockout-Mäusen intakt. Daraus lässt sich ableiten, dass die β_1 - und β_2 -Rezeptoren zwar eine bedeutende Rolle bei der physiologischen Regulation der Renin-Freisetzung spielen, jedoch nicht entscheidend für die salzabhängige Anpassung der Renin-Sekretion sind [64]. Es werden verschiedene andere Mechanismen diskutiert. Es ist beispielsweise bekannt, dass in vitro juxtaglomeruläre Zellen empfindlich auf die extrazelluläre Osmolarität reagieren und bei Anstieg der Osmolarität eine Verringerung der Renin-Sekretion bewirken [65].

Die wichtigste Rolle bei der Regulation der Renin-Freisetzung infolge veränderter NaCl-Zufuhr spielt die Macula densa. Etwa die Hälfte einer bspw. 10 % igen Steigerung des filtrierten Natriumchlorids erreicht die Macula densa [63]. Die Wahrnehmung der tubulären Chloridkonzentration durch die Zellen der Macula densa erfolgt über die Transportaktivität von NKCC2. Die beiden Isoformen NKCC2A und NKCC2B werden in Macula densa Zellen exprimiert [45]. Die Funktion der Macula densa blieb bei Mäusen mit einem NKCC2B-Knockout weitgehend erhalten. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Mäusen mit einem NKCC2A-Knockout eine deutliche Abschwächung der Verringerung der Plasma-Renin-Konzentration als Reaktion auf eine akute intravenöse Verabreichung von Kochsalzlösung. Diese Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Rolle dieser spezifischen Spleißvariante bei der Kontrolle der Renin-Freisetzung durch die Macula densa hin [66]. Eine Abnahme der tubulären Chloridkonzentration, die durch die verringerte Transportrate des NKCC2 detektiert wird, führt zu einer Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie p38 und ERK1/2. Diese Signaltransduktion aktiviert die Enzyme Cyclooxygenase 2 (COX2) und mikrosomale Prostaglandin E2 Synthase 1 (mPGES1) in der Zelle. Dies führt zur Freisetzung des Autakoids PGE₂, das wiederum die Renin-Freisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen stimuliert [67–70]. Die Macula densa setzt bei hohen Salzkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit ATP frei. ATP bindet an vasokonstriktorische purinerge Rezeptoren an den afferenten Arteriolen oder wird in Adenosin umgewandelt, das die vasokonstriktorischen Adenosin-A1-Rezeptoren an den afferenten Arteriolen aktiviert. Der Mechanismus der Macula densa spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Renin-Ausschüttung als Reaktion auf akute Veränderungen der Salzbelastung. Für die langfristige Anpassung der Renin-Synthese und Renin-Freisetzung als Reaktion auf unterschiedliche Salzzufuhr scheinen die Salztransportrate von NKCC2A und die Aktivierung von A1-Adenosinrezeptoren, die in akuten Situationen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Renin-Freisetzung durch die Macula densa spielen, nicht erforderlich zu sein. Die genaue Funktion der Macula densa bei der langfristigen Anpassung der Renin-Synthese und Renin-Freisetzung aufgrund varierender Salzzufuhr bleibt jedoch weitgehend unklar. In dieser Situation scheint die Macula densa nicht als direkter Mediator zu fungieren, könnte jedoch die allgemeine Reaktionsfähigkeit der Renin-Freisetzung modulieren [45].

1.2.4.4 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg

Zyklische Nukleotide sind entscheidende Botenstoffe, die die Sekretionsrate von Renin bestimmen. Hormone, Neurotransmitter und Autakoide, die eine gesteigerte intrazelluläre Produktion von cAMP bewirken, stimulieren sowohl die Renin-Sekretion als auch die Konzentration der Renin mRNA [71,72]. Murine juxtaglomeruläre Zellen reagieren auf die Stimulation durch das Sympathomimetikum Isoproterenol mit einer Erhöhung der Renin mRNA

Konzentration und der Renin-Freisetzung [72]. Die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren, die an G_s -Proteine gekoppelt sind, bewirkt eine Stimulation der Adenylatcyclasen (AC), was zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den Renin-produzierenden Zellen führt. In Renin-produzierenden Zellen spielen insbesondere die AC 5 und AC 6 eine wichtige Rolle [73]. Der Anstieg der cAMP-Konzentration aktiviert höchstwahrscheinlich die Protein-kinase A und führt somit zu einer erhöhten Ausschüttung von Renin [74–77]. Darüber hinaus sind weitere Agonisten bekannt, die eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirken und dadurch die Renin-Synthese steigern. Ein solcher Agonist ist Forskolin, welches die Adenylatcyclasen direkt aktiviert und dadurch das intrazelluläre cAMP erhöht. Ferner führt auch das membrangängige cAMP-Analogon 8-Bromadenosin-cAMP zu einer Erhöhung der Renin-Sekretion in den juxtaglomerulären Zellen. [72]. Ebenfalls kann auch die Bindung von Prostaglandinen (PGE_2) an Prostaglandinrezeptoren (EP2+EP4) die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen und damit die Exozytose von Renin stimulieren [78]. Wie oben beschrieben wurde, wird die Renin-Freisetzung vermutlich durch die Proteinkinase A, die durch cAMP aktiviert wird, stimuliert [77]. Es wird vermutet, dass der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Epac ebenfalls eine wichtige Rolle bei der cAMP-induzierten Freisetzung von Renin spielen könnte. [79]. Darüber hinaus kann auch die Inhibition des Abbaus von cAMP die intrazelluläre Konzentration des Second Messengers erhöhen und somit die Renin-Sekretion stimulieren. Ein Beispiel hierfür ist 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), das zu einer Steigerung der Renin-Sekretion in isolierten, perfundierten Rattennieren führte [80]. Insbesondere die Phosphodiesterasen (PDE) 1, 3 und 4 spielen eine entscheidende Rolle in den juxtaglomerulären Zellen [71,75,81].

1.2.4.5 Calcium

Im Gegensatz zu vielen anderen sekretorischen Zellen hemmt intrazelluläres Ca^{2+} die Freisetzung von Renin in juxtaglomerulären Zellen - ein Phänomen, das als Calcium-Paradoxon bezeichnet wird. Hormone, die die zytosolische Calciumkonzentration erhöhen, wie z.B. ANG II, Vasopressin [82] und Endothelin [83] haben daher eine inhibitorische Wirkung auf die Renin-Sekretion [84]. Auch hämodynamische Faktoren wie der Perfusionsdruck in der Niere können über den intrarenalen Barorezeptor-Mechanismus den Calcium-Fluss in den juxtaglomerulären Zellen regulieren [85,86]. Eine Erhöhung des Nierenblutdrucks führt zu einer Dehnung der juxtaglomerulären Zellen, was letztendlich zu einer Depolarisation führt und den Calcium-Einstrom in diesen Zellen aktiviert. Eine Erhöhung des Calcium-Einstroms führt dabei zu einer Hemmung der Renin-Sekretion, wahrscheinlich durch die hemmende Wirkung auf die Adenylatcyclasen (AC) 5 und 6. [86,87] Adenylatcyclasen (AC) katalysieren die Umwandlung von 5'-AMP zu cAMP. Wie bereits erwähnt, führt die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Aktivierung der Renin-Freisetzung. Die Hemmung der AC bewirkt dementsprechend

niedrigere cAMP-Konzentrationen und inhibiert dadurch die Renin-Synthese. Folglich erhöht eine Abnahme des intrazellulären Calciums den cAMP-Spiegel, während eine Zunahme des intrazellulären Calciums die intrazelluläre cAMP-Konzentration verringert [16,73,88].

Aber nicht nur die intrazelluläre, sondern auch die extrazelluläre Calciumkonzentration reguliert die Renin-Freisetzung aus juxtaglomerulären Zellen. Eine gesteigerte Renin-Sekretion kann durch eine Verringerung der extrazellulären Calciumkonzentration hervorgerufen werden. Dies könnte auf die geringere Triebkraft für den transmembranen Calciumeintritt in die Zelle zurückzuführen sein, was wiederum zu einem Rückgang der zytosolischen Calciumkonzentration führt. Die Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration führt wiederum zu einer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher. Eine weitere Erklärung für die hemmende Wirkung von hohem extrazellulärem Calcium auf die Renin-Freisetzung könnte eine Aktivierung der extrazellulären Calcium-sensing Rezeptoren (CaSRs) in juxtaglomerulären Zellen sein. Über das G_q-gekoppelte Protein des CaSR führt die Aktivierung dieses Rezeptors zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration [89]. In einigen Fällen ist der CaSR G_i-gekoppelt. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt dann zu einer Hemmung der intrazellulären cAMP Synthese, was sich wiederum negativ auf die Renin-Freisetzung auswirkt [22,75,89,90].

1.2.4.6 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) kann einerseits die Renin-Sekretion stimulieren, andererseits aber auch inhibieren. Die in-vitro Ergebnisse zeigen, dass Hormone wie z.B. atriale natriuretische Peptide (ANP), die die partikuläre Guanylatzyklase aktivieren und so die cGMP Bildung stimulieren, eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Renin-Freisetzung ausüben. Niedrige Konzentrationen dieser Hormone hemmen die Renin-Freisetzung, während hohe Konzentrationen eine stimulierende Wirkung haben [75,91–93]. Auch NO-Donatoren können die Guanylatzyklase aktivieren, allerdings aktivieren sie die lösliche Form der Zykklase. Als Resultat wird cGMP produziert, das daraufhin in juxtaglomerulären Zellen die PDE3 hemmt. PDE3 hydrolysiert zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und wandelt es in 5'-AMP um. Die Hemmung des Enzyms führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, was schlussendlich zu einer Erhöhung der Renin-Freisetzung führen kann [80]. Die Hemmung der Renin-Sekretion durch hohe Konzentrationen von bspw. NO geht auf die Proteinkinase G II zurück [93], während hingegen für die stimulierende Wirkung von cGMP auf die Renin-Sekretion die Proteinkinase A - Aktivität verantwortlich ist [94]. Die hemmende Wirkung der Proteinkinase G kann durch die stimulierende Wirkung der A-Kinase auf die Renin-Sekretion überwunden werden [75]. Hierbei wurden hauptsächlich *in vitro* Ergebnisse betrachtet, da *in vivo* die Komplexität der cGMP-Wirkung auf die Renin-Sekretion durch zusätzliche Veränderungen des Blutdrucks weiter erhöht wird. Die Blutdruckveränderungen könnten indirekt auf die Renin-Freisetzung Einfluss nehmen.

1.2.4.7 Adenosintriphosphat/PGE₂ -Freisetzung durch Macula densa-Zellen

Eine Abnahme der tubulären Natriumchloridkonzentration an der Macula densa führt zu einer sofortigen Stimulation der Renin-Freisetzung [95]. Macula densa Zellen sind renale Biosensorzellen, die Veränderungen der luminalen NaCl-Konzentration erkennen. Sie übermitteln Signale, die einerseits zu Veränderungen des Tonus der afferenten Arteriole und damit zur Anpassung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führen (tubuloglomeruläres Feedback). Andererseits regulieren sie die Renin-Sekretion aus den juxtaglomerulären Zellen. Renin-produzierende juxtaglomeruläre Zellen befinden sich in der Media-Schicht der afferenten Arteriolen am Eingang zum Glomerulus und damit auch in der Nähe der Macula densa-Zellen. Die Kommunikation zwischen den Macula densa Zellen und juxtaglomerulären Zellen könnte über die Freisetzung von PGE₂ und Adenosintriphosphat (ATP) aus Macula densa Zellen erfolgen [9]. Macula densa Zellen setzen ATP frei, wenn sie hohen Chloridkonzentrationen ausgesetzt sind [9], und sie setzen PGE₂ frei, wenn die Chloridkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit niedrig ist [96]. Wie bereits zuvor beschrieben, bindet PGE₂ an Prostaglandinrezeptoren und erhöht dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel, was wiederum zu einer Stimulation der Renin-Freisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen führen kann. ATP, welches aus den Zellen der Macula densa stammt, kann entweder direkt über die Bindung an purinerge (P2) -Rezeptoren die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen auslösen oder im extraglomerulären Mesangium zu Adenosin hydrolysiert werden, welches dann durch die Bindung an Adenosin-1-Rezeptoren eine Vasokonstriktion des Vas afferens bewirkt [9,75]. Aber Adenosin ist nicht nur für die Vasokonstriktion verantwortlich, sondern auch für die Hemmung der Renin-Freisetzung in den juxtaglomerulären Zellen. Kim et al. konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass die Hemmung der Renin-Sekretion durch eine Erhöhung des NaCl-Gehalts an der Macula densa adenosinabhängig ist, während die Stimulation der Renin-Sekretion bei einer niedrigen NaCl-Konzentration in der Macula densa keine Abhängigkeit von Adenosinrezeptoren zeigt [97]. Vermutlich wird die Freisetzung von Renin durch Adenosin-1-Rezeptoren gehemmt, die die Öffnung von intrazellulären Calciumkanälen veranlassen und dadurch die Renin-Sekretion inhibieren [98].

1.3 Pathophysiologische Bedeutung des RAAS

Das RAAS ist nicht nur ein wesentlicher Regulator des Elektrolyt-/Wasserhaushalts und des Blutdrucks, sondern spielt auch eine große Rolle in der Pathophysiologie. Bei renalen und kardiovaskulären Erkrankungen bspw. ist das RAAS an Entzündungs- und Fibrosereaktionen beteiligt [99]. Insbesondere das lokale, gewebsspezifische RAAS (vgl. Abschnitt 1.3.2) spielt eine bedeutende Rolle in diesen Zusammenhängen. Die Bindung von ANG II an AT1-Rezeptoren aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, die die Bildung von freien Radikalen hervorrufen. Nennenswert sind vor allem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche eine

wachstumsfördernde, proinflammatorische und profibrotische Wirkung aufweisen. Die Anwesenheit von ROS führt zu Zellschäden in der Niere und löst entzündliche Prozesse im Gewebe aus. Die resultierende gesteigerte Produktion von Fibrose kann die Nierenfunktion beeinträchtigen. Die ROS sind maßgeblich an der Entwicklung von pathologischen Veränderungen in der Niere beteiligt, wie beispielsweise Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose, den Verlust peritubulärer Kapillaren und tubuläre Atrophie [99–101]. Das lokale RAAS rückt zunehmend in den Fokus der Forschung, wenn es um die Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen mit Entzündungen und Fibrose geht. Sowohl ACE-Hemmer als auch AT1-Rezeptorantagonisten zeigen sich als nephroprotektiv und werden bei Patienten mit renalen und kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt [99]. Allerdings ist nicht nur Angiotensin II, sondern auch Aldosteron für die negativen Auswirkungen bei chronischen Nierenerkrankungen verantwortlich. Die Aktivierung der Mineralokortikoid-Rezeptoren in Fibroblasten beispielsweise kann die Struktur und Funktion der Niere nachteilig beeinflussen. Mehrere klinische Studien haben belegt, dass in verschiedenen Modellen von Nierenerkrankungen Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten eine vielversprechende Wirkung zeigen und Nierenschäden sowie Funktionsstörungen verbessern oder sogar heilen können [102,103].

1.3.1 Prorenin und Proreninrezeptor (PRR)

Prorenin ist die inaktive Vorstufe von Renin, seine funktionelle Bedeutung wurde lange Zeit aufgrund seiner "Pro"-Sequenz unterschätzt. Es wurde angenommen, dass Prorenin nicht in der Lage sei, Angiotensinogen in ANG I zu spalten und daher keine funktionelle Relevanz habe [104]. Allerdings kann Prorenin durch die Bindung an den Proreninrezeptor (PRR) Aktivität erlangen. Die Bindung an den PRR führt zu einer Konformationsänderung des Prorenins, durch die das Prorenin enzymatische Aktivität erlangt, ohne gespalten zu werden. Damit erlangt Prorenin die Fähigkeit Angiotensinogen zu spalten [105].

Die Plasmakonzentrationen von Prorenin und Renin weisen beim Menschen in der Regel eine starke Korrelation auf, können jedoch gelegentlich unabhängig voneinander reguliert werden. Während ein akuter Renin-Stimulus in der Regel keinen Einfluss auf den Prorenin-Spiegel hat, können chronische Stimuli sowohl Renin als auch Prorenin erhöhen [104]. Es gibt jedoch Ausnahmen, wie zum Beispiel bei Diabetikern, bei denen vor allem die Plasmakonzentration von Prorenin und nicht diejenige von Renin erhöht ist. Der Grund für die erhöhten Prorenin-Werte im Plasma bei Diabetikern ist noch unbekannt [104,106].

Der PRR ist ein transmembraner Rezeptor und kann nicht nur Prorenin, sondern auch Renin binden. Verglichen mit ungebundenem Renin, führt die Bindung von Renin an diesen Rezeptor zu einer Vervielfachung seiner enzymatischen Aktivität. Der PRR wird in der Niere hauptsächlich in kortikalen Sammelrohrzellen exprimiert, daneben kommt er in Podozyten und Mesangiumzellen in der Niere vor. Man kann ihn allerdings auch in extrarenalen Geweben finden

[33,35-38]. Mäuse mit einer Deletion des PRR in Sammelrohrzellen, zeigten signifikant niedrigere systolische Blutdruckwerte, begleitet von einer erhöhten Na^+ -Ausscheidung und verringerten ANG II Konzentrationen im Urin. Diese Beobachtungen bestätigen eindeutig die Einbindung des PRR in das RAAS [107]. Andererseits können bei der Bindung von Prorenin und Renin an den Rezeptor auch intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt werden, die vom RAAS unabhängig sind. Die Interaktion des Rezeptors mit Renin/Prorenin kann die Kinasen ERK1/2 und p38 MAPK aktivieren, sodass profibrotische, proinflammatorisch und proliferative Faktoren produziert werden [44]. Es gibt Hinweise dafür, dass der PRR bei einer akuten oder chronischen Nierenerkrankung, wie zum Beispiel bei einer diabetischen Nephropathie höher exprimiert wird, bzw. auch das Fortschreiten einer solchen Krankheit beschleunigt [105,108,109]. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Expression des PRR die Aktivität der NF- κ B-Signalwege sowie die Produktion von Kollagen Typ 1 und Fibronectin in Sammelrohrzellen anregt. Dieser stimulierende Effekt in den Zellen konnte jedoch durch gezieltes "Silencing"- der PRR-Expression abgemildert werden [110,111]. Eine weitere Studie zeigt, dass die Überexpression des humanen PRR in transgenen Ratten zu einer gesteigerten Aktivierung von TGF β führt und die Entwicklung von Glomerulosklerose induziert [112].

Der PRR besitzt nicht nur die Funktionen als Rezeptor, sondern agiert auch als akzessorische Untereinheit der vakuolären Protonenpumpe H^+ -ATPase. Diese ist maßgeblich an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, wie beispielsweise der Ansäuerung von Zellorganellen und der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung [105,113,114]. In Mausmodellen führten verschiedene chronische Nierenerkrankungen über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu einer Hochregulierung der PRR-Expression in Tubuluszellen der Niere. Die Überexpression von PRR verstärkte die Wnt1-vermittelte β -Catenin-Aktivierung und führte zu einer gesteigerten Expression nachgeschalteter Zielgene wie Fibronectin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 und α -SMA. Interessanterweise verbesserte sich die Nierenfunktion nach der gezielten Ausschaltung des PRR, was mit einer Reduktion der Wnt/ β -Catenin-Aktivität einherging [115]. In der Studie von Li et al. wurde gezeigt, dass die Behandlung von proximalen Tubuluszellen mit Bafilomycin A1, einem Inhibitor der V-ATPase, zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der Wnt1/PRR-vermittelten β -Catenin-Aktivierung und der Expression von Fibronectin, α -SMA und PAI-1 führte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der PRR die V-ATPase benötigt, um den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren [105]. Allerdings verstärkt der PRR den Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch einen reninunabhängigen Mechanismus und steht im Gegensatz zur PRR-vermittelten RAS- und MAPK-Aktivierung, die eine Renin/Prorenin-Bindung erfordert [115].

Der Prorenin-Antagonist PRO20 blockiert die Bindung von Prorenin an seinen Rezeptor, wobei er jedoch die Expression des PRR nicht beeinflusst. Diese Untersuchung ermöglichte eine wichtige Verknüpfung zwischen der Bindung von (Pro)-Renin an den Proreninrezeptor und dem intrarenalen RAAS (siehe 1.3.2). In einer durch Albumin-Überschuss induzierten

Nephropathie bei Ratten wurde festgestellt, dass die Plasma-Renin-Konzentration durch die Verabreichung von PRO20 unverändert blieb. Allerdings verringerte sich die Renin-mRNA im Nierenkortex sowie die renale Renin-Konzentration im Urin. Ebenso blieb die Plasma-Angiotensin-II-Konzentration unverändert, während die Angiotensin-II-Konzentration im Urin abnahm. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass PRO20 hauptsächlich das intrarenale RAAS hemmt und dadurch einen nephroprotektiven Effekt erzielt. Außerdem kann geschlussfolgert werden, dass nicht Renin, sondern vermutlich Prorenin die entscheidende treibende Kraft für das intrarenale RAAS darstellt, da sich die Renin-Plasma-Konzentration bei den Ratten, die mit PRO20 behandelt wurden, nicht verändert hat, sich jedoch die kortikale Renin mRNA verringert hat [116]. In neuerer Zeit hat der Proreninrezeptor (PRR) viel Beachtung gefunden, da er ein vielversprechendes neues therapeutisches Ziel für Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen darstellen könnte. Die Anwendung des PRO20-Inhibitors bspw. bei einer Adrimycin-induzierten Nephropathie, zeigt eine schützende Wirkung gegen Podozytenschäden. Dieser protektive Effekt basiert auf der Unterdrückung der intrarenalen RAAS-Aktivierung und der Verhinderung der Hochregulierung der Expression von Nox4 und TRPC6 [117].

1.3.2 Lokales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Neben dem klassischen, zirkulierenden RAAS, existieren in unterschiedlichen Geweben auch lokale RAAS [118], unter anderem in der Nebenniere [119], im Herz [120], im Gehirn [121], im Pankreas [122], in den Fortpflanzungsorganen [123,124], im Fettgewebe [125] und in der Niere [126]. Dabei liegt der Fokus aber nicht auf dem Vorhandensein aller einzelnen Komponenten des RAAS in diesen Geweben, sondern vielmehr auf der funktionellen Bedeutung der lokalen ANG II-Synthese und ihrer Wirkung [118]. Die lokalen RAAS üben in den einzelnen Organen unterschiedliche Funktionen aus. In manchen Geweben wird das lokale RAAS unabhängig vom systemischen RAAS reguliert. Dies lässt sich daran erkennen, dass beispielsweise eine Nephrektomie keinen Einfluss auf die Konzentrationen von ANG II in den Nebennieren und im Gehirn hat, sondern dass die ANG II Konzentration dort gleich bleibt oder sogar ansteigen könnte [118,127,128]. In manchen anderen Organen dagegen scheint es eine enge Wechselwirkung zwischen dem lokalen und dem systemischen RAAS zu geben, wie zum Beispiel im Herz. Dort wird Renin oder Angiotensinogen aus dem Blutkreislauf aufgenommen und lokal gespeichert, um für die lokale ANG II-Synthese zur Verfügung zu stehen [118].

Die Tatsache, dass die Gewebekonzentration von ANG II in der Niere höher ist als die Konzentration, die durch den arteriellen Blutfluss geliefert wird, deutet darauf hin, dass die Niere ein eigenständiges lokales RAAS besitzt [129,130]. In der Niere sind alle Komponenten vorhanden, die zur Bildung von ANG II erforderlich sind. Während die Angiotensinogen-Bildung im systemischen RAAS hauptsächlich der Leber zugeschrieben wird, wurde festgestellt, dass auch proximale Tubuluszellen in der Niere Angiotensinogen produzieren und ins

Tubuluslumen abgeben können [130,131]. Angiotensinogen wird daraufhin von (Pro)-Renin enzymatisch zu ANG I gespalten. Die juxtaglomerulären Zellen stellen eine Quelle von (Pro)-Renin dar, das intrarenal wirkt [130]. (Pro)-Renin wird von den juxtaglomerulären Zellen freigesetzt und an das Niereninterstitium abgegeben. Dort findet die intrarenale Bildung von ANG I statt [33,62]. Die Renin mRNA und Proteinexpression wurde auch in proximalen und distalen Nephronsegmenten nachgewiesen [130,132,133]. Allerdings wird dort die Renin-Freisetzung höchstwahrscheinlich gegensätzlich zum systemischen RAAS reguliert. Gonzalez et al. haben in ihren Studien gezeigt, dass Vasopressin und ANG II keine hemmende Wirkung auf die Renin-Sekretion in Sammelrohrzellen haben, sondern stattdessen zu einer Stimulation der Renin-Freisetzung führen [134]. Neben ANG II gibt es auch Anzeichen dafür, dass Signalwege von PGE₂/EP4 den PRR und die lokale Produktion von (Pro)-Renin in den Sammelrohrzellen aktivieren können [126]. Auch renale interstitielle Zellen, wie Perizyten [135] und Fibroblasten [136,137] exprimieren Renin mRNA. Es ist noch unklar, ob es eine Verbindung zwischen der Renin-Produktion in den interstitiellen Zellen und den Renin-produzierenden Zellen im Tubulus gibt und welchen Einfluss dies auf das lokale RAAS hat.

Das Angiotensin-I-Konversions-Enzym (ACE) ist in der menschlichen Niere vorwiegend im proximalen Tubulus lokalisiert. Bei Ratten hingegen wurde das Enzym hauptsächlich in den vaskulären Endothelzellen der Niere nachgewiesen [130]. Es katalysiert die Spaltung von ANG I zu ANG II. Ein Teil des ANG II kann durch eine AT1-Rezeptor vermittelte Endozytose internalisieren und dadurch in Zellen akkumulieren, was dazu führt, dass es vor einem raschen Abbau durch endotheliale Peptidasen geschützt ist [138]. Der weitere Teil des ANG II befindet sich hauptsächlich in der interstitiellen und tubulären Flüssigkeit [139]. Die AT1-Rezeptor-Expression wurde in allen tubulären und vaskulären Segmenten der Rattenniere identifiziert, wobei die höchste Expression im Gefäßsystem der Nierenrinde und in den proximalen Tubuli der äußeren Medulla zu finden war [140]. Viele der pathophysiologischen Wirkungen der AT1-R-Aktivierung werden durch lokal erzeugtes und nicht durch zirkulierendes ANG II ausgelöst [35]. Es wird angenommen, dass die Aktivierung des intrarenalen RAAS bei der Progression von Nierenerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Eine starke Aktivierung des intrarenalen RAAS ist ein Risikofaktor bei der Entstehung von Bluthochdruck und Nierenschäden [33]. Das intrarenale RAAS wird unter chronischen Nierenerkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus stärker aktiviert [141]. Ein hoher Glukosegehalt erhöht den intrarenalen Angiotensinogen-Spiegel [33,133] und die Prorenin-Produktion der Tubuluszellen [142]. Beides führt zur verstärkten Bildung von ANG II in der Niere. Eine höhere ANG II Konzentration kann die lokale Expression von Angiotensinogen und die Bildung von (Pro)-Renin aus Sammelrohrzellen begünstigen [133]. Dadurch wird die Bildung von ANG II in der Niere weiter stimuliert, was im Gegensatz zur normalen Rückkopplungsreaktion steht [126]. Tatsächlich haben mehrere klinische Studien gezeigt, dass Arzneistoffe, die das RAAS blockieren, im Vergleich zu anderen

blutdrucksenkenden Medikamenten eine nephroprotektive Wirkung zeigen [130,143,144]. Allerdings erlauben diese Studien keine Unterscheidung zwischen den Effekten des zirkulierenden und des lokalen RAAS, da RAAS Inhibitoren beide Systeme blockieren, so dass weiterführende Untersuchungen zum besseren Verständnis der Bedeutung beider RAAS notwendig sind.

1.4 Interstitium und interstitielle Zelle

Das renale Interstitium befindet sich im Nierenparenchym zwischen den vaskulären und tubulären Basalmembranen. Es umfasst sowohl extrazelluläre fibrilläre Strukturen, Proteoglykane, Glykoproteine und interstitielle Flüssigkeit, als auch zelluläre Verbände. Dabei erfüllt das Interstitium in der Niere jedoch nicht nur eine passive Stützfunktion für die tubulären und vaskulären Kompartimente, sondern nimmt auch eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation und dem Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Strukturen ein [145]. Seine Verteilung innerhalb der Niere variiert: in der Rinde macht es etwa 8 % des gesamten Parenchymvolumens aus, in der inneren Medulla bis zu 40 % [146].

Die interstitiellen Zellen in der Niere können in zwei Gruppen unterteilt werden: die residenten und die nicht-residenten Zellen, welche aus dem Knochenmark stammen. Zur ersten Gruppe gehören hauptsächlich Fibroblasten und Perizyten. Diese Zellen sind unter anderem die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix in der Niere und stehen somit in engem Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Fibrose bei chronischen Nierenerkrankungen. Die nicht-residenten Zellen, wie dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten, bilden die zweite Gruppe. Diese Zellen tragen entscheidend zur Immunabwehr in der Niere bei [146,147]. Fibroblasten weisen ein sternförmiges Aussehen auf und ihre Ausläufer suchen Kontakt zu den Tubuluszellen. Im Gegensatz dazu bilden Perizyten, die sich hauptsächlich im Nierenmark entlang den Vasa recta befinden, zwar auch Fortsätze aus, teilen jedoch mit den Kapillarendothelzellen eine gemeinsame Basalmembran, wodurch sie sich von den Fibroblasten unterscheiden. Untersuchungen zur Ultrastruktur haben gezeigt, dass sich kortikale von medullären Fibroblasten unterscheiden, da medulläre Fibroblasten ein feineres Netzwerk mit den Tubuluszellen bilden. Fibroblastenpopulationen der Niere wurden anhand von Fibroblastenmarkern definiert, um sie hinsichtlich ihrer Funktion differenzieren zu können. Neben vielen anderen Fibroblastenmarkern ist einer dieser Marker der PDGF-Rezeptor β [146]. Es ist bekannt, dass die renalen Zellen, die den PDGFR β exprimieren, die Hauptquelle für die Erythropoietin (EPO) Produktion im menschlichen Körper darstellen und zwar in einem Ausmaß von etwa 90 % [146,148]. Die Expression von renalem EPO wird hauptsächlich durch einen verringerten Sauerstoffgehalt im Blut stimuliert. Eine enge Verbindung besteht zu dem membrangebundenen Enzym Ekto-5'-Nukleotidase (CD73), welches vor allem in kortikalen Fibroblasten exprimiert wird und ebenfalls durch Hypoxie stimuliert wird [149]. Dieses Enzym spaltet

Adenosinmonophosphat (AMP) in Adenosin und Phosphat auf. In der Niere fungiert Adenosin als Autakoid, welches die afferente Arteriole kontrahiert und die Renin-Ausschüttung hemmt (siehe 1.2.4.7) [150]. Durch diese Funktion verringert das Enzym intrarenal die Arbeitsbelastung der Niere und schützt sie vor Schäden durch Hypoxie. Zusätzlich haben verschiedene Studien gezeigt, dass Adenosin die Produktion von Erythropoetin stimuliert [151]. Des Weiteren ist bekannt, dass die PDGFR β positiven Zellen auch Renin produzieren können [136,137]. Wie die juxtaglomerulären Renin-produzierenden Zellen stammen auch die interstitiellen Fibroblasten und Perizyten der Niere aus der FoxD1+ stromalen Vorläuferzellpopulation ab [152]. Diese Zellen weisen einen hohen Grad an Plastizität auf, sie können sowohl Renin als auch EPO unter verschiedenen Bedingungen exprimieren. Dies könnte der Grund dafür sein, dass einige Renin-bildende interstitielle Zellen im anämischen Hypotonie-Mausmodell EPO mitexprimieren [153]. Jedoch wurde auch beobachtet, dass die EPO-Produktion bei chronischen Nierenerkrankungen, welche mit einer chronischen Hypoxie einhergehen, abnimmt [146,154]. Dagegen steigt die Anzahl von interstitiellen Renin-exprimierenden Myofibroblasten, wie in einem experimentellen Fibrosemodell beobachtet wurde [136]. Die Ursachen für die Induktion von Renin in den interstitiellen Zellen sind bislang nur unzureichend erforscht und sollen im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.5 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Eine chronische Nierenerkrankung (CKD), die als Zustand eines voranschreitenden Nierenfunktionsverlusts definiert wird, betrifft weltweit etwa 8-16 % der Bevölkerung. Zu den Hauptmerkmalen gehören eine verminderte Filtrationsrate der Niere und eine erhöhte Albuminausscheidung, die mit erhöhter Gesamtmortalität und dem Risiko für terminales Nierenversagen einhergehen [155]. Die Fibrose spielt bei der CKD auf verschiedenen Ebenen eine Schlüsselrolle. Bei einer fibrotischen Erkrankung handelt es sich um einen dynamischen und komplexen Prozess, der durch eine überschüssige Ansammlung von extrazellulärer Matrix gekennzeichnet ist. Dieser Vorgang führt zur Ausbildung von Vernarbungen, einer Verkleinerung des funktionellen Nierengewebes und letztendlich zu einem Funktionsverlust der Niere [156]. Die Fibrose ist bei der CKD ein fortschreitender Prozess, der nicht reversibel ist und nicht nur die Niere, sondern auch das Herz schädigen kann [157]. Bei einer Schädigung der Niere erfolgt zunächst eine akute Entzündungsreaktion, die durch die Freisetzung von Zytokinen und das Eindringen von Immunzellen gekennzeichnet ist. Diese Immunantwort dient dazu, auf die Entzündung zu reagieren und bildet den Auslöser für den nachfolgenden Fibroseprozess. Infolgedessen versucht die Niere durch weitere Reparaturmechanismen wie zum Beispiel die Aktivierung des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) der Nierenschädigung entgegenzuwirken. Obwohl seine akute Aktivierung in den frühen Stadien der Nierenschädigung von Vorteil ist, führt seine chronische Aktivierung zur Nierenfibrose [157]. Ein bedeutendes

Ziel der Nephrologie-Forschung besteht darin, die Mechanismen, die das Fortschreiten der Fibrose verursachen, besser zu verstehen, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

1.5.1 Chronische Nierenerkrankung im Mausmodell: Adenin-nephropathie

Der Mangel an dem Enzym Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Störung, die zu 2,8-Dihydroxyadenin-Steinen und Nierenversagen infolge einer intratubulären kristallinen Ausfällung führt. APRT bewirkt, dass Adenin über den sog. Purin-Salvage Pathway zu Adenosinmonophosphat umgewandelt wird. Ein Mangel an diesem Enzym führt zu einer Akkumulation von Adenin im Körper. Adenin wird stattdessen durch die Xanthinhydrogenase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert, welches über die Nieren ausgeschieden wird und dort aufgrund seiner geringen Löslichkeit präzipitiert [158]. Dies führt zum Influx inflammatorischer Zellen, Tubulusobstruktionen und interstitieller Fibrose, verbunden mit einer Einschränkung der Nierenfunktion. Bei Mäusen führt eine übermäßige Fütterung von adeninhaltiger Nahrung auch zu einem Überschuss an Adenin im Körper und zu einer Ansammlung von 2,8-Dihydroxyadenin in der Niere, welches schließlich als Mausmodell einer chronischen Nierenerkrankung verwendet werden kann [159].

1.5.2 Chronische Nierenerkrankung im Mausmodell: Diabetische Nephropathie

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die in zwei Gruppen unterteilt wird: Typ-1-Diabetes und Typ-2-Diabetes. Typ-1-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer T-Zell-vermittelten Zerstörung der β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse kommt. Die β -Zellen verlieren dadurch die Fähigkeit zur Insulinproduktion, was letztendlich zu einem absoluten Insulinmangel im Körper führt. Die Entstehung dieser Erkrankung wird durch genetische Veranlagungen und Umweltfaktoren begünstigt [160]. Typ 2- Diabetes ist eine Kombination aus Insulinresistenz und Insulinmangel. Die Insulinresistenz entwickelt sich durch verschiedene Faktoren wie Adipositas, Bewegungsmangel und metabolische Störungen. Bei einer Insulinresistenz reagieren die Körperzellen nicht mehr ausreichend auf Insulin. Die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse erhöhen daraufhin die Insulinproduktion, um einen Ausgleich zu schaffen und den Blutzuckerspiegel in dem engen Bereich zu halten, der für normale Körperfunktionen erforderlich ist. Wenn die Insulinresistenz anhält, beginnen die β -Zellen entweder aufgrund eines Gendefekts, einer Glukose- und/oder Fetttoxizität oder einer Erschöpfung zu versagen [161,162]. Durch die Hyperglykämie können makrovaskuläre, mikrovaskuläre und neurologische Komplikationen auftreten [162]. Zu den makrovaskulären Komplikationen zählen vor allem Arterienerkrankungen der großen und mittleren Arterien [163]. Die Mikroangiopathie hingegen betrifft eher kleinere Blutgefäße und zeigt hauptsächlich Auswirkungen auf

Retina und Niere. Die Mechanismen, durch die sich die diabetische Mikroangiopathie entwickelt, sind nicht bekannt. Höchstwahrscheinlich führen Hyperglykämie, Insulinmangel und eine genetische Disposition zu einer solchen Erkrankung. Die diabetische Nephropathie, eine Form der Mikroangiopathie ist die häufigste Ursache für chronische Nierenerkrankungen in westlichen Ländern und mit einer sehr hohen Sterblichkeit verbunden [28]. Ein Kennzeichen der diabetischen Mikroangiopathie ist unter anderem die Verdickung der Kapillarbasalmembran [164]. Therapeutisch behandelt man die diabetische Nephropathie neben der Einstellung des Blutzuckers mit Wirkstoffen, die das RAAS inhibieren. Bei Patienten, die unter einer diabetischen Nephropathie leiden, findet man eher niedrige Renin-Konzentrationen im Blut, dagegen steigt die Prorenin-Konzentrationen im Plasma deutlich an [165]. Obwohl die Renin-Konzentration bei Diabetikern nicht erhöht ist, sprechen sie dennoch gut auf ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor-Antagonisten an. Möglicherweise wird durch diese RAAS-Blockade vor allem die schädliche Wirkung des Prorenins an seinem Rezeptor inhibiert [166,167]. Die verstärkte Produktion von Prorenin wird vor allem durch die Hyperglykämie hervorgerufen. Infolgedessen wird die Aktivität des intrarenalen RAAS gesteigert, das eine entscheidende Rolle bei der Progression der Nierenfibrose spielt [142].

Um eine diabetische Nephropathie im Mausmodell zu induzieren, wurde Streptozotocin (STZ) verwendet. Dies führt zur Schädigung der β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse und verursacht dadurch bei den Mäusen eine ähnliche Form des Typ-1-Diabetes wie beim Menschen [168].

2 Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der Renin-Synthese und Renin-Sekretion in den interstitiellen Zellen der Niere untersucht. Die interstitiellen Zellen befinden sich zwischen den Funktionseinheiten der Niere wie den glomerulären Filtern, den Nierenblutgefäßen und den Tubuluszellen. Ein großer Teil dieser Zellen exprimiert den PDGFR β [169,170]. Ein Zusammenhang zwischen der PDGFR β -Expression und der Expression von Renin in interstitiellen Zellen besteht [137]. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass interstitielle Zellen unter diabetischen Bedingungen (STZ-diabetisches Mausmodell) im Vergleich zu physiologischen Bedingungen vermehrt Renin mRNA exprimieren [142]. Die Renin-Expression in interstitiellen Zellen ist in Bereichen, die von Nierenfibrose betroffen sind, deutlich ausgeprägt. Die fortschreitende Fibrose, wie sie bei einigen Nierenerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie beobachtet wird, ist auf die gesteigerte Aktivität des intrarenalen RAAS zurückzuführen [167]. Es ist daher eine plausible Erklärung, dass die gesteigerte Renin-Produktion in interstitiellen Zellen bei Nierenerkrankungen auf die Einbindung in das intrarenale RAAS zurückzuführen ist.

Ausgehend von der Tatsache, dass interstitielle Zellen unter pathologischen Bedingungen vermehrt Renin exprimieren, zielt mein Projekt darauf ab, die funktionelle Rolle des interstitiellen Renins, insbesondere bei Nierenerkrankungen, zu klären [136].

Die drei zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten wie folgt:

- 1.) Welche Bedeutung hat das interstitielle Renin unter physiologischen Bedingungen?
- 2.) Welcher Auslöser führt in Nierenerkrankungen zu einer gesteigerten Expression von Renin in interstitiellen Zellen?
- 3.) Trägt die Renin-Expression in den interstitiellen Zellen direkt zur Entstehung und dem Fortschreiten der Fibrose bei oder ist sie lediglich eine unbedeutende Folge der Fibrose?

Ob das interstitielle Renin einen bislang unbekannten Einfluss auf das intrarenale RAAS ausübt und somit eine potentiell krankheitsfördernde Wirkung besitzt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Knockout-Mäuse mit einer zellspezifischen Deletion von Renin in interstitiellen Zellen (PDGFR β -Cre/Ren KO) erzeugt.

Ich werde in dieser Arbeit funktionelle, histologische und molekulare Veränderungen zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen miteinander vergleichen [18].

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Haltung der Versuchstiere

Alle für diese Arbeit erforderlichen Tierversuche wurden gemäß den „*Guidelines for the care and use of animals in research*“ des National Institutes of Health (NIH) durchgeführt und von den örtlichen Tierschutzbehörden genehmigt. Alle Mäuse wurden unter optimalen Bedingungen gehalten, d. h. bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % und einem 12-Stunden-Dunkel-Licht-Zyklus. Standard-Nagerfutter (0,6% NaCl, Ssniff, Deutschland) und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Mäuse wurden auf einem C57/BL6-Hintergrund gezüchtet.

3.1.2 Verwendete Mauslinien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet und miteinander verpaart:

- PDGFR-β-Cre: PDGFR-β tm1.1 (cre/ER^{T2}), Csln, Jackson Laboratory, Stock #: 030201 [171]
- mTmG-Reporter: Gt(ROSA)26Sor^{tm4(CTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J} Jackson Laboratory, Stock #: 007576 [172]
- Renin1^{flox/flox}: generiert in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr. Vladimir Todorov, Nephrologie, Universitätsklinikum Dresden

3.1.3 Generierung der Ren 1 flox Mäuse

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

Das Einbringen der mutanten JM8A1.N3 Zellen in C57BL/6NCrl Embryos im 8-Zell-Stadium erfolgte mittels Laser-Mikroinjektion (XY-Clone Hamilton Thorne) am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG) in Dresden. Die so entstandenen chimären Mäuse wurden mit C57BL/6NCrl-Mäusen zurückgekreuzt. Um die Anwesenheit des Targeting-Konstrukts zu überprüfen, wurde eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

Ren1-5'arm: 5'-CAG CCT CCT TGGCAG CTT CTA GCC-3 '

Ren1-3'arm: 5'-ACT GTC AAC ACC TCT ATG CTT GGG-3 '

Die PCR-Produktgrößen betrugen 519 bp für das Wildtyp-Allel und 392 bp für das mutierte Zielallel. Heterozygote Mäuse, die das Targeting-Konstrukt in sich trugen, wurden mit einem Flippase-Deleterstamm (flpo, verbesserte Flippase [173]) gekreuzt, um die FRT-flankierte Targeting-Kassette auszuschneiden. Die Flpo-Rekombination wurde mittels PCR, unter Verwendung der oben gelisteten Primer Ren1-5'arm und Ren1-3'arm, überprüft. Dabei ergaben sich Produktgrößen von 519 bp für das Wildtyp-Allel und 667 bp für das gefloxe Allel. Nach globaler Deletion der Targeting-Kassette wurde das Flpo-Transgen durch weitere Kreuzungsschritte entfernt. Die resultierende Mauslinie (Renin1^{flox/flox}) besitzt zwei LoxP-Erkennungssequenzen, die die Exons 5-8 des Ren1^c-Gens flankieren. Durch Cre-induzierte Rekombination werden die geflochtenen Exons ausgeschnitten und das Reninmolekül verliert einen wichtigen Bestandteil seines aktiven Zentrums, was in Folge zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führt [142].

3.1.4 Generierung von PDGFR β Cre Ren 1^{flox/flox} Mäuse (im Folgenden: PDGFR β Ren KO)

Die Generierung von Mäusen, denen das Ren 1 Gen in interstitiellen Zellen fehlt, erfolgte anhand des Cre-LoxP-Systems. Hierzu wurden gefloxe Ren 1 Mäuse mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter dem PDGFR β -Promotor exprimieren. Die PDGFR β Cre-Mäuse exprimieren ein Cre-ER^{T2}-Protein in PDGFR β positiven Zellen. Das Cre-ER^{T2}-Protein befindet sich im Zytoplasma und kann erst nach Exposition gegenüber Tamoxifen in das Kernkompartiment gelangen. Nach der Verpaarung von PDGFR β Cre Mäusen mit Mäusen, die eine loxP-flankierte Sequenz tragen, kann durch Induktion mit Tamoxifen die Deletion der floxierten Sequenzen erfolgen. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht darauf, dass die Cre-Rekombinase die LoxP-Markierungen (in diesem Fall das Reningen) erkennt und das dazwischenliegende DNA-Fragment herauslöst. Anschließend wird das herausgelöste Produkt abgebaut. Da die Cre-Rekombinase in den interstitiellen Zellen der Niere unter der Kontrolle des PDGFR β -Promoters exprimiert wird, bleibt die Genexpression von Renin in den juxtaglomerulären Zellen und Tubuluszellen der Niere unverändert [174].

3.1.5 Generierung von PDGFR β Cre Reporter Mäuse (im Folgenden: PDGFR β tomato)

PDGFR β Cre Reporter Mäuse (im Folgenden PDGFR β tomato Mäuse) wurden einerseits in Zellkultur-Experimenten eingesetzt und ermöglichen andererseits die Überprüfung der Effizienz und Lokalisation der Rekombination der PDGFR β -Cre-Mäuse. Sie wurden durch

Kreuzung von PDGFR β Cre Mäusen und mTmG Mäusen generiert. Die PDGFR β tomato Maus ist eine doppelt fluoreszierende Cre Reportermaus. Vor der Induktion mit Tamoxifen exprimiert sie in allen Zellen das membranständige Tandem-DimerTomato (mT), während sie nach der Rekombination ausschließlich in den PDGFR β -positiven Zellen das membranständige grün fluoreszierende Protein (mG) exprimiert. Alle anderen Zellen behalten die Expression des rot fluoreszierenden Tomato-Gens bei [175,176].

3.1.6 Genotypisierung der Mäuse

Im Alter von drei bis vier Wochen wurden die Versuchstiere von den Elterntieren abgesetzt und mit Löchern oder Kerben am Ohr markiert. Aus diesen Gewebsproben wurde genomische DNA isoliert und mithilfe der PCR Analyse der Genotyp bestimmt. Nachdem die Tiere getötet wurden, wurde von der Schwanzspitze eine Biopsie entnommen und eine Kontrollgenotypisierung durchgeführt.

3.1.7 Induktion der PDGFR β Ren1 WT/KO und PDGFR β tomato Mäuse

Die Aktivierung der Cre-Rekombinase wurde in den PDGFR β Ren KO/WT und den PDGFR β tomato Mäusen über Tamoxifen (TMX), einen selektiven Östrogenrezeptormodulator [177], initiiert. Die Cre-ER-Rekombinasen der Versuchstiere sind mit mutierten hormonbindenden Domänen des Östrogenrezeptors kombiniert. Die Aktivierung durch 4-OH-Tamoxifen der Cre-Rekombinase kann zeitlich reguliert werden [178]. Ab einem Alter von 8 Wochen wurde den Versuchstieren über 4 Wochen TMX-haltiges Futter (400 mg/kg Tamoxifen-Citrat) (ssniff-Spezialdiäten) verabreicht. Das Futter wurde in dieser Zeit *ad libitum* angeboten. Danach folgte eine mindestens 2-wöchige „TMX-Auswaschphase“ mit Standard-Nagerfutter, um mögliche akute Auswirkungen oder Nebenwirkungen von Tamoxifen auf die Versuchstiere auszuschließen.

3.1.8 Behandlung mit Adeninfutter (0,2 %)

Nach der Tamoxifen-Induktion und der mind. 2-wöchigen Auswaschphase wurden die PDGFR β Ren WT/KO Mäuse (Männchen) 3 Wochen lang mit adeninhaltiger Nahrung (0,2 % Adenin) (Altromin Spezialfutter) *ad libitum* gefüttert und unmittelbar danach getötet, Organe entnommen und perfusionsfixiert (siehe 3.1.16).

3.1.9 Behandlung mit Streptozotocin (STZ) (low-dose)

Nach der Induktion mit Tamoxifen und der mind. 2-wöchigen Auswaschphase wurde den PDGFR β Ren WT/KO Mäusen (Männchen) intraperitoneal STZ gemäß dem Protokoll des

AMDCC (Animal Models of Diabetic Complications Consortium) [179] verabreicht. Die Mäuse waren für mindestens vier Stunden vor jeder intraperitonealer Gabe mit STZ nüchtern. 15 mg/ml STZ wurden im Citratpuffer gelöst und innerhalb von 10-15 min in einer Dosis von 55 mg/kg KG mit Hilfe einer Insulinspritze intraperitoneal appliziert. Die Injektion der STZ-Lösung erfolgte an 5 aufeinander folgenden Tagen. Nach 5 Tagen wurde der Plasmaglukosespiegel mithilfe eines Blutzuckermessgeräts bestimmt. Bei einem Plasmaglukosespiegel über 300 mg/dl (bzw. 16,65 mmol/l) wurde das Tier als diabetisch klassifiziert. 12 Wochen nach Injektionsbeginn wurden die Tiere getötet, die Organe perfusionsfixiert (siehe 3.1.16) und entnommen.

3.1.10 Behandlung mit Isoproterenol [180]

Nach der ersten Blutentnahme erhielten die induzierten PDGFR β Ren WT und KO Mäuse eine einmalige Injektion von Isoproterenol (10 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal verabreicht, in isotonischer NaCl Lösung). Genau 50 Minuten nach der Injektion wurde von jeder Maus Blut durch Punktion der Vena facialis entnommen. Das Blut wurde weiterverarbeitet (siehe Kapitel 3.1.12).

3.1.11 Behandlung mit Enalapril und Niedrigsalz-Diät

Die induzierten PDGFR β Ren WT/KO Mäuse erhielten eine Woche nach der Isoproterenol-Injektion eine salzarme Diät (ssniff-Spezialdiäten GmbH) mit einem Natriumchloridgehalt von $\leq 0,03\%$. Nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Tagen wurden sie für weitere 7 Tage sowohl mit der salzarmen Diät als auch mit dem ACE-Inhibitor Enalapril behandelt. Die Dosierung von Enalapril betrug 50 mg/l im Trinkwasser. Anschließend wurden die Tiere getötet und perfusionsfixiert (siehe 3.1.16).

3.1.12 Blutabnahme

Bei den wachen Mäusen wurde vor, während und am Ende des Tierversuchs Blut aus der Vena facialis unter Verwendung einer 22 G Kanüle entnommen. Anschließend wurde das Vollblut in eine EDTA-Kapillare überführt, die mit Critoseal verschlossen wurde. Daraufhin wurden die Kapillaren in einer Zentrifuge bei 8000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert, um das Plasma von den Blutzellen zu trennen. Nach der Zentrifugation wurde der Hämatokritwert gemessen, das gewonnene Plasma in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei einer Temperatur von -20°C zur weiteren Analyse aufbewahrt.

3.1.13 Spontanurin

Die Mäuse wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen vormittags, sowie nachmittags in eine saubere Plastikbox mit Deckel gesetzt. Wenn die Mäuse nach 15 Minuten in der Box nicht spontan urinierten, wurden sie zurück in den Käfig gesetzt und der Vorgang wurde am nächsten Tag wiederholt. Der Spontanurin wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C für weitere Analysen aufbewahrt.

3.1.14 GFR-Messung

Die glomeruläre Filtrationsrate-(GFR)-Messungen wurden von Dr. Anna Federlein und Dr. Philipp Tauber durchgeführt. Dazu wurden die Tiere am Vortag unter Narkose (3 % iges Isofluran-Sauerstoffgemisch) am Rücken rasiert. Noch verbliebene Haare wurden mithilfe einer Enthaarungscreme (Veet) (Einwirkzeit 3 min) und warmen Wasser entfernt. Die GFR-Messungen am nächsten Tag erfolgten mit der transdermalen GFR-Technologie (MediBeacon Inc., Mannheim, Deutschland). Dazu wurde unter 2 %iger Isofluran- Sauerstoffgemisch-Narkose der GFR-Monitor auf der rasierten Haut installiert und das Hintergrundfluoreszenzsignal zunächst 5 Minuten lang gemessen, bevor Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Sinistrin (15 mg/100 g KG in NaCl 0,9 %) in die Schwanzvene injiziert wurde. Nach der Injektion wurden die Tiere einzeln in Käfige gesetzt und das Fluoreszenzsignal für 90 Minuten gemessen. Die Mäuse waren dabei wach und in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkt. Die aufgezeichnete Clearance von FITC-Sinistrin wurde zur Berechnung der Ausscheidungshalbwertszeit $t_{1/2}$ von FITC-Sinistrin gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet (MPD Studio2 Software; Filter zur Entfernung von Artefakten; 3-Kompartiment-Modell mit linearer Korrektur). FITC-Sinistrin $t_{1/2}$ wurde mit einem mausspezifischen Umrechnungsfaktor in die GFR umgerechnet: $GFR [\mu\text{l}/\text{min}/100 \text{ g KG}] = 14616,8 [\mu\text{l}/100 \text{ g KG}]/t_{1/2} [\text{min}]$ [181,182].

3.1.15 Blutdruck-Messung mithilfe Tail Cuff Plethysmographie

Diese nicht-invasiven Blutdruckmessungen wurden an Mäusen mittels Schwanzmanschette durchgeführt (“tail-cuff Methode“). Hierfür wurden die Mäuse in einer Kammer fixiert, die zuvor auf eine Temperatur von 37°C aufgewärmt wurde. Die Blutdruckmanschette wurde in der Nähe von der Schwanzwurzel der Maus angelegt, distal davon wurde die Messsonde platziert. Die Messsonde besteht aus einem Infrarot-Leuchtdioden-Pulssensor, der gleichzeitig auch die Lichtdurchlässigkeit des Schwanzes der Maus messen kann. Durch Druckschwankungen aufgrund des Blutvolumenstroms ändert sich die Lichtdurchlässigkeit der Schwanzarterie der Maus. Die Lichtdurchlässigkeit wird durch einen Optosensor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt [183]. Die Schwanzmanschette wird aufgeblasen und kann damit den Blutfluss sperren. Wenn die Messsonde kein Signal mehr detektieren kann, wird der Wert des

systolischen Blutdrucks in mmHg mithilfe eines Barometers abgelesen. Dieser Barometer wurde zuvor an das Gerät kalibriert. Die Herzfrequenz wurde aus dem gemittelten Pulssignal berechnet. Zur Eingewöhnung wurden die Versuchstiere zuvor über den Zeitraum von einer Woche täglich in die Blutdruckkammern gesetzt, die gemessenen Werte jedoch nicht verwendet. Daraufhin wurde zweimal an 5 aufeinander folgenden Tagen pro Maus 8 Messungen durchgeführt und ein Mittelwert dieser Messungen für die Auswertung der Ergebnisse verwendet.

3.1.16 Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Im Rahmen der histochemischen Untersuchung wurden sowohl beide Nieren als auch nur eine Niere der Versuchstiere unter Verwendung einer 4 %igen PFA-Lösung perfusionsfixiert. Diese Fixierung erfolgte mit der Unterstützung von Robert Götz. Die nicht perfundierte Niere wurde für die mRNA Messungen aufbewahrt. Die Nieren der Versuchstiere, die unter physiologischen Bedingungen miteinander verglichen wurden, wurden für Protein und mRNA Messungen verwendet. Dabei erfolgte keine Perfusionsfixierung, sondern lediglich eine Durchspülung der Nieren mit einer 0,9 %igen Kochsalzlösung. PFA ist ein kurzkettiges Polymer des Formaldehyds und wirkt über eine Quervernetzung von Proteinen. Dies bewirkt nicht nur eine Inaktivierung von autolytischen Enzymen, sondern auch eine Stabilisierung der zellulären Strukturen in der Niere.

Für die Perfusionsfixierung wurden die Versuchstiere zunächst mit einer Kombination aus Ketamin (80 mg/kg KG i.p.) und Xylazin (10 mg/kg KG i.p.) anästhesiert. Die analgetische Komponente der Narkose wurde durch Buprenorphin (0,05 mg/kg KG s.c. 1 h prä-op) verstärkt. Anschließend wurde die Bauchdecke der Maus geöffnet und ein Katheter in die Aorta abdominalis gelegt. Mesenterialarterie und Aorta oberhalb der Nierenarterie wurden abgebunden. Das Öffnen der Vena cava dient dazu, dass das Perfusat abfließen kann. Zunächst wird mit einer 0,9 %igen 37°C warmen NaCl-Lösung infundiert, um die Erythrozyten aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde mit 37°C warmen PBS nachgespült. Daraufhin erfolgt die Perfusionsfixierung bei einem konstanten Druck von 100 mmHg mit einer 37°C warmen PFA-Lösung. Nach der Perfusion wurde die Niere entnommen, Nierenkapsel entfernt, transversal halbiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht in 4 %iges PFA zum Nachhärten gelegt.

3.1.17 Isoliert perfundierte Niere mit Brefeldin A

Die isolierte Nierenperfusion mit Brefeldin A wurde mithilfe von Robert Götz durchgeführt. Für die isolierte Nierenperfusion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Es wurde die Bauchdecke geöffnet, die Aorta mit einem kleinen Einschnitt versehen und eine stumpfe

Perfusionskanüle bis zur Abzweigung der Nierenarterie vorgeschoben und mit einer Einbindeligatur fest eingebunden. Die Abbindeligaturen (4) und (2) wurden geschlossen und der Perfusionsfluss gestartet. Aorta und Vena cava oberhalb der Leber bzw. unterhalb des Zwerchfells wurden durchtrennt. Perfusionsfluss wurde auf 100 mmHg eingestellt und die perfundierte Niere herausgeschnitten. Danach wurde ca. 2/3 der Leber entfernt und die Einbindeligatur (6) Vena cava unterhalb der Leber wurde gelegt. Innerhalb der Leber wurde ein Katheter in die Vena cava eingeführt und bis zur Nierenvene vorgeschoben. Die Abbindeligatur (5) wurde geschlossen. Perfusat fließt nun mit 100 mmHg durch die Niere und kann über den Katheter in der Vena cava gesammelt werden.

Nun konnte die ex vivo Perfusion mit einer Brefeldin A-Lösung für 3,5 Std. in der thermostatisierten feuchten Kammer stattfinden. Anschließend wurde die Niere mit einer 37 °C warmen 0,9 % igen NaCl-Lösung durchspült und 3 Minuten mit einer warmen 4% igen PFA-Lösung fixiert. Nach der Perfusion wurde die Niere entnommen, Nierenkapsel entfernt, transversal halbiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht in 4 %igem PFA zum Nachhärteten gelegt [184].

3.2 Histologie

3.2.1 Paraffineinbettung

Die perfundierten Nieren, die über Nacht in 4 % iger PFA-Lösung nachfixiert worden waren, wurden am nächsten Tag durch eine Alkoholreihe mit steigender Konzentration schrittweise entwässert und gleichzeitig gehärtet (siehe Anhang Protokolle).

Im Anschluss daran wurden die Nierenhälften in Paraffin 24 Stunden lang bei einer Temperatur von 60°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden sie in frisches Paraffin transferiert und erneut über Nacht bei 60°C gelagert. Schließlich wurden sie in Silikon-Kautschuk-Einbettformen gelegt, die mit warmem Paraffin gefüllt waren. Innerhalb weniger Stunden wurde das Paraffin bei Raumtemperatur ausgehärtet, so dass die Paraffinblöcke mit den eingebetteten Nieren für Schnitte am Mikrotom verwendet werden konnten. Die Gewebeschnitte wurden mit einer Schnittdicke von 5 µm von einem 37°C warmen Wasserbad auf einen Objektträger aufgebracht und über Nacht getrocknet.

3.2.2 Immunofluoreszenz- Färbungen- Paraffinschnitte

Die getrockneten Objektträger wurden im ersten Schritt entparaffiniert und rehydriert.

- Roti-Histol 2x 10 min
- Isopropanol abs. 1x 5 min
- 96 % Isopropanol 1x 5 min

- 80 % Isopropanol 1x 5 min
- 70 % Isopropanol 1x 5 min

Anschließend wurden die Gewebeschnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht, 3-mal für 5 min mit PBS Otto gewaschen und in einer feuchten Kammer platziert, wobei sie mit einem Fettstift umrandet wurden. Um unspezifische Bindungsstellen von Proteinen zu minimieren, wurden die Nierenschnitte 45 Minuten in einer Lösung aus 1 % BSA und 10 % Pferdeserum in PBS Otto blockiert. Nachdem die Blockierungslösung entfernt wurde, wurde der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in die Blockierungslösung pipettiert und auf die Schnitte gegeben. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit der Antikörperlösung inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger nach 3-maligem 5-minütigem Waschen mit einer 1 % igen BSA-Lösung bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper und DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:400 in 1 % BSA für 90 Minuten im Dunkeln inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde zuvor in einer gekühlten Zentrifuge (4°C) zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min). Danach wurden die Gewebeschnitte 3-mal je 5 Minuten mit PBS Otto gewaschen und mit vorgewärmtem Eindeckmedium (DAKO Mounting Medium) und einem Deckgläschen konserviert (primäre und sekundäre Antikörper-Verdünnungen siehe Anhang).

3.2.3 Immunofluoreszenz- Färbungen Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Nieren von PDGFR β tomato Mäusen durch Perfusion mit einer 4 % igen PFA-Lösung fixiert und transversal halbiert, (siehe Abschnitt 3.1.16). Anschließend wurden die Organe in einer Lösung aus 1 % PFA und 18 % Saccharose, die als Kryoprotektivum diente, in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und so lange nachfixiert, bis sie zu Boden sanken. Danach wurden die Nierenhälften in vorgekühltem Methylbutan bei -40°C kurz angefroren, anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Nierenhälften wurden in Tissue-Tek eingebettet und auf Objektträger mit einer Schnittdicke von 5-10 µm aufgezogen. Es wurde stets darauf geachtet, die Schnitte abzudunkeln, da ansonsten die Eigenfluoreszenz der Nierenschnitte der Reportermäuse verloren gehen könnten (Protokoll der Immunofluoreszenz-Färbung der Gefrierschnitte siehe Anhang).

3.2.4 Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit

Um Fibrose im Nierengewebe der Versuchstiere nachzuweisen, wurde das Masson-Goldner Trichrom Färbekit verwendet. Am ersten Tag wurden die getrockneten Objektträger bei Raumtemperatur (RT) entparaffiniert und rehydriert:

- Roti-Histol 2 x 10 min
- Ethanol 100 % 2 x 5 min
- Ethanol 96 % 2 x 5 min
- Ethanol 80 % 2 x 5 min
- Ethanol 70 % 1 x 5 min
- VE-Wasser 1 x 5 min

Die Objektträger wurden daraufhin in eine lichtgeschützte und fest verschlossene Küvette, die mit Bouin'scher Lösung gefüllt ist, überführt. Sie wurden dort über Nacht bei RT gelagert. Die Bouin'scher Lösung ist ein Fixiermittel, das aus Pikrinsäure, Formaldehyd und Essigsäure besteht. Die Bouin'scher Lösung wirkt als Beizmittel und stärkt die Bindung des Farbstoffs der Fibrosefärbung an das Gewebe. Die Fibrose-Färbung erfolgte mit dem Masson-Goldner staining Kit (Sigma-Aldrich) am nächsten Tag (siehe Protokoll im Anhang).

3.3 In-situ Hybridisierung: RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit (brown)/RNAscope® Multiplex Fluorescent Assay

Mithilfe dieser Technologie kann die mRNA im Gewebe erkannt und genau lokalisiert werden. Gegenüber der Realtime PCR besitzt sie den Vorteil, dass man deutlich erkennen kann, in welchem Bereich des Gewebes und in welchen Zellen die mRNA exprimiert wird [185]. Die in situ Hybridisierung wurde gemäß dem Protokoll von ACD durchgeführt (siehe Protokoll Anhang).

3.4 Mikroskopie: Licht-/Fluoreszenzmikroskopie

Die Nierenschnitte wurden mittels eines Axiovert 200M-Mikroskops mit motorisierter Objekt- auflage zusammen mit der Software ZEN 3.0 (blue edition) 2019 von Zeiss untersucht und aufgenommen. Für immunfluoreszenzgefärbte Schnitte wurde eine Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam 506 mono) verwendet, während immunhistochemisch gefärbte Schnitte mithilfe einer Farbkamera (AxioCam 305 color) erfasst wurden. Um die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper anzuregen, wurden Fluoreszenzfilter bei ihrer jeweiligen optimalen Wellenlänge eingesetzt. Das entstandene Emissionslicht wurde anschließend im entsprechenden Spektralbereich erfasst.

Fluorophor	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy2	450 – 490	500 – 550
Cy3	533 - 558	570 - 640
Cy5	625 – 655	665 – 715
DAPI	345	455

3.5 RNA-Isolation und -Analyse

3.5.1 RNA-Isolation aus dem Nierengewebe

Eine Niere der getöteten Versuchstiere wurde entnommen, gewogen und in Cortex, Medulla und Papille zoniert. Die einzelnen Zonen der Niere wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C bis zum Tag der mRNA Isolation gelagert. Die mRNA Isolation beginnt mit der Zelllyse durch TRIsure-Reagenz von Bioline. Dieses Reagenz hat den Vorteil, dass es neben Phenol, das die Zellen lysiert, auch gleichzeitig Chaotropie wie Guanidiniumthiocyanat besitzt und damit die RNAasen und andere Enzyme inaktivieren kann. Zunächst wurden Cortex und Medulla in 1 ml TRIsure in einem Hochleistungs-Dispergiergerät für ca. 30 s homogenisiert, sodass keine Gewebsstücke mehr sichtbar waren. Die Papille wurde in 250 µl TRIsure-Reagenz mithilfe eines Mikro-Stößels zerkleinert. Danach wurde die RNA-Isolation durchgeführt (siehe Protokoll im Anhang).

3.5.2 RNA-Isolation aus PDGFR β -Zellen (Primärkultur)

Unmittelbar nach den Stimulationsexperimenten wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium entnommen und 300 µl Lyse-Puffer (Quick-RNA Microprep ®) in jedes Well der 24-Well Platte hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend mit einer Pipettenspitze abgeschabt und zusammen mit dem Lysepuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Isolation der Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll des Quick-RNA Microprep Kits (Zymo Research®) bei Raumtemperatur (siehe Protokoll im Anhang).

3.5.3 Quantifizierung der mRNA und Umschreiben in cDNA

Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA-Proben wurden unter Verwendung eines NanoDrop-ND-1000-Spektralphotometers bestimmt. Dabei wurde 1 µl jeder Probe für die Messung verwendet. Der Spektralphotometer misst die Lichtintensität, die die Probe bei einer bestimmten Wellenlänge durchdringt und berechnet daraus die Absorption der Probe. Damit kann letztendlich über die Beer-Lambert-Gleichung die Konzentration der RNA in ng/µl bestimmt werden. Durch den Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm lässt sich Rückschluss auf die Reinheit der mRNA in der Lösung ziehen. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde eine definierte Menge der isolierten RNA (Mark + Cortex: 2 µg, Papille: 1 µg) in cDNA umgeschrieben. Da die gewonnene RNA-Konzentration aus den Primärzellen deutlich geringer ausfiel, wurde hierfür die komplette RNA in 9 µl Lösung in cDNA umgeschrieben. Die Umschreibung erfolgte durch das Enzym Reverse Transkriptase und mit Oligo (dT)₁₅ Primern (siehe Protokoll im Anhang).

3.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mithilfe der PCR kann man sehr kleine Mengen an DNA spezifisch vermehren und die Konzentration bestimmen. In dieser Arbeit wurde mithilfe der PCR indirekt die mRNA Konzentration durch die umgeschriebene cDNA in der Probe gemessen. Das zu untersuchende Gen wird dabei mithilfe von 2 spezifischen Primern amplifiziert.

Mittels folgendem PCR-Ansatz wurde die cDNA amplifiziert und die Konzentration des zu untersuchenden Gens bestimmt:

PCR-Ansatz:

- 5 µl SYBR Green Master Mix
- 0,5 µl Primer sense
- 0,5 µl Primer antisense
- 3 µl Wasser
- 1 µl cDNA

Amplifizierungsprotokoll (Light Cycler® 480 von Roche)

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	5 min	Aktivierung
	95°C	10 s	Denaturierung
45	60°C	20 s	Anlagerung
	72°C	20 s	Elongation
1	72°C	1 min	Schmelzen
1	4°C	∞	Abkühlen

Zur Quantifizierung der DNA wird ein Schwellenwert des Fluoreszenzsignals festgelegt und die Zyklenzahl bis zum Erreichen dieses Wertes abgelesen=C_t-Wert. Dieser Wert wird in Bezug eines internen Standards gesetzt (Housekeeper) und damit relativ quantifiziert.

3.6 Blutanalysen

3.6.1 Bestimmung der Plasmakonzentration von Renin bzw. Prorenin

Die Quantifizierung der Plasma-Renin-Konzentration erfolgte durch den Einsatz eines Angiotensin I Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) der Firma IBL International GmbH. Der ELISA nutzt das Prinzip der enzymatischen Reaktion von Renin, die zur Bildung von ANG I führt, welches dann gemessen wird. Dadurch lässt sich indirekt die Enzymaktivität von Renin in der Probe ableiten. Bei der Vorbehandlung der Proben wurde Angiotensinogen im Überschuss zugesetzt, sodass die Renin-Aktivität in Gegenwart von überschüssigem

Angiotensinogen bestimmt werden konnte, was für die vorliegende Studie von besonderem Interesse war. Bei der Probenvorbehandlung wird ferner der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) hinzugegeben, um den Abbau von Angiotensin I in der Probe zu verhindern. Um nur das durch Renin gebildete ANG I in der Plasmaprobe zu bestimmen, wird zusätzlich ein Probenansatz auf Eis gestellt. Damit konnte die anfängliche ANG I Konzentration im Plasma ermittelt werden. Dieser Wert wird von der aktivierte Probe subtrahiert. Die Aktivierung der Probe erfolgt durch eine Inkubation der Probe für 90 min bei 37 °C.

Um die Prorenin-Konzentration im Plasma zu quantifizieren, wurde ein Probenansatz verwendet, bei dem Trypsin (2,5 mg/ml, 5 min, 37°C) eingesetzt wurde. Trypsin spaltet die "Pro"-Sequenz von Prorenin in der Probe, sodass das in dieser Probe vorhandene Prorenin in Renin umgewandelt wird. Aus der Differenz zwischen der mit Trypsin behandelten Probe und dem unbehandelten Probenansatz, bei dem das Prorenin nicht in Renin umgewandelt wurde, kann auf die Prorenin-Konzentration in der Probe geschlossen werden (Protokoll: siehe Anhang).

3.6.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von Aldosteron

Die Messung der Aldosteron-Konzentration im Plasma wurde mit Unterstützung von Katharina Krieger gemäß der Anleitung des Aldosteron-ELISAs IBL international durchgeführt:

Der Aldosteron-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Die unbekannte Menge an Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen (E-Ag) konkurrieren um die Bindungsstellen des an den Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden. Das Protokoll wurde gemäß der Anleitung des Aldosteron-ELISAs IBL durchgeführt (siehe Anhang).

3.7 Urinanalysen-Spontanurin

3.7.1 Osmolarität

Zur Bestimmung der Osmolarität wurde der Osmometer Osmomat 030 (Gonotec) verwendet. Die Messung erfolgte nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung. Vor der Messung wurden die Urinproben im Verhältnis 1:10 mit MQ-Wasser verdünnt. Hierfür wurden 0,5 ml Reaktionsgefäß verwendet, die mit 50 µl der Probenmenge gefüllt wurden. Zur Erstellung eines Leerwertes wurde eine Messung mit ausschließlich MQ-Wasser durchgeführt.

3.7.2 Kreatinin-Konzentration

Die Ausscheidung von Kreatinin mit dem Harn erfolgt bei gesunden Menschen bzw. bei gesunden Mäusen mit einer relativ konstanten Rate, die weitgehend unabhängig von der Ernährung ist. Aufgrund dieser Konstante eignet sich Kreatinin gut als Referenzwert für renal

ausgeschiedene Stoffe. Die Konzentration von Substanzen im Urin kann variieren, je nachdem wie konzentriert oder verdünnt der Urin ist. Ein Referenzwert hilft, die gemessenen Werte im Urin zu standardisieren und zu vergleichen. Zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentration wurde das QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit von BioAssaySystems verwendet. Dieser Assay basiert auf der sogenannten "Jaffe-Reaktion", Pikrat reagiert mit Kreatinin zu einem orangefarbenen Komplex. Dieser kann durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 490-530 nm zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins herangezogen werden. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration. Für die Durchführung wurden 5 µl unverdünnter Spontanurin, Standard und Negativkontrolle (MQ-Wasser) gemäß den Vorgaben des Herstellerprotokolls auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 gemischt, und 200 µl der Mischung wurden zügig in die Wells pipettiert. Die Absorption wurde unmittelbar nach dem Pipettieren, sowie 5 Minuten später bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

3.7.3 Elektrolytkonzentration

Die Bestimmung der Natrium- und Kalium-Ionen-Konzentration im Spontanurin der Versuchstiere erfolgte mithilfe eines Flammenphotometers (BWB-XP). Die Flammenphotometrie ist eine emissions-spektroskopische Methode zur quantitativen Analyse von Ionen der Alkali- und Erdalkali-Gruppe. Die Hitzeinwirkung der Flamme hebt die Valenzelektronen der Atome kurzzeitig auf ein höheres Niveau an. Kurz darauf kehren sie jedoch in den Grundzustand zurück und emittieren dabei Licht mit einer spezifischen Wellenlänge. Die Intensität des emittierten Lichts steht in direktem Zusammenhang zur Stoffmenge des Ions. Für die Messungen wurden die Urinproben am Vortag im Verhältnis 1:1000 mit entionisiertem Wasser verdünnt. Vor der Messung wurde das Photometer mithilfe von Standard-Lösungen, die eine definierte Natrium und Kalium-Konzentrationen aufweisen, kalibriert. Die Elektrolytkonzentration wurde auf die Kreatinin-Konzentration im Urin bezogen.

3.7.4 Albumin-Konzentration im Urin

Für die Bestimmung des Albumingehalts im Spontanurin wurde ein ELISA der Firma ICL verwendet. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Bei diesem ELISA reagiert das in den Proben vorhandene Albumin mit Antikörpern, die an die Oberfläche der Wellplatte haften. Nach der Entfernung ungebundener Proteine durch Waschen, werden HRP konjugierte Anti-Albumin-Antikörper hinzugefügt. Diese enzymmarkierten Antikörper bilden Komplexe mit dem zuvor gebundenen Albumin. Nach einem weiteren Waschschritt wird dieser enzymmarkierte Antikörper durch Zugabe eines chromogenen TMB-Substrats bestimmt. Die Intensität der Absorption des entstandenen Chromophors ist direkt proportional zur

Albuminkonzentration in der Urinprobe. Die Albuminmenge in der Probe kann anhand der aus den Standards erstellten Standardkurve interpoliert und unter Berücksichtigung der Probenverdünnung bestimmt werden. Die Durchführung der Albuminbestimmung im Urin erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Hierfür wurde der Spontanurin im Verhältnis 1:500 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung gemischt (Protokoll siehe Anhang).

3.7.5 Renin-Konzentration im Urin

Die Reninausscheidung wurde mit Hilfe des kompetitiven Angiotensin I ELISAs der Firma IBL International GmbH bestimmt. Das genaue Prinzip der Messung wurde bereits in Abschnitt 3.6.1 beschrieben (Probenvorbereitung siehe Anhang).

3.8 Renin-Konzentration im Gewebe

Für die Bestimmung der Konzentration von aktiven Renin im renalen Gewebe wurden die Nieren der Versuchstiere zunächst in Cortex, Medulla und Papille zoniert und gewogen. Die Papille und die Medulla wurden vollständig verwendet, während nur ein kleinerer Gewebeanteil des Cortex verwendet wurde, der dem Gewicht der Medulla angepasst wurde (46-56 mg). Die einzelnen Nierenzonen wurden auf Eis gestellt und anschließend in frisch hergestelltem Homogenisierungspuffer (siehe Anhang) zerkleinert. Der Cortex und die Medulla wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax in 1 ml Puffer homogenisiert, während die Papille mit einem elektronischen Stößel in 100 µl Homogenisierungspuffer zerkleinert wurde. Nach dem Homogenisierungsschritt wurden die Proben bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den ELISA wurde der Cortex und die Medulla mit Maleatpuffer 1:100 verdünnt, die Papille wurde unverdünnt eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration von aktivem Renin wurde die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I mithilfe des Angiotensin I ELISAs der Firma IBL International GmbH gemessen.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Isolation von PDGFR β-Zellen (Primärkultur) aus der Mausniere

Das Protokoll für die Zellisolation der PDGFR β-Zellen aus der Mausniere wurde mit Unterstützung von Dr. Anna Federlein und Katharina Fremter im Rahmen dieser Arbeit etabliert:

- Töten von 4-5 induzierten PDGFR β-Cre/tomato-Mäuse durch Genickbruch, Nieren entnehmen, Kapsel entfernen und in Cortex/Mark zonieren, auf Eis stellen
- Die weiteren Schritte erfolgten unter der Sterilbank

- Cortex und Mark jeweils in eine Petrischale überführen, mit dem Skalpell zerkleinern bis keine größeren Stücke mehr zu erkennen sind, auf Eis stellen
- Cortex und Mark jeweils mit 4 ml Verdaulösung (Kollagenase II 0,58 mg/ml, Pronase E 0,58 mg/ml und DNase I (15.000 IU/ml in 40 mM Tris pH 7,5 und 2 mM MgCl₂) in HBSS vermengen und in jeweils ein 15 ml Falcon Tube überführen
- Verdaulösung vortexen
- Rotation der Verdaulösung bei 37°C, 30 rpm 15 min
- Nach 15 min vortexen
- Erneute Rotation der Verdaulösung bei 37°C, 30 rpm 15 min
- Nach dem Verdau beide Falcon Tubes für 2 min auf Eis abkühlen lassen
- Filtration der Verdaulösung von Cortex und Mark durch 100 µm Siebe, mit eisgekühltem HBSS nachspülen
- Zentrifugation: 600 g, 4°C, 5 min
- Überstandsabnahme, Cortex und Mark jeweils in weitere 4 ml Verdaulösung resuspendieren und vortexen
- Rotation 30 rpm, 30 min:
 - 1.) nach 10 min: vortexen
 - 2.) nach 20 min: vortexen
 - 3.) nach 30 min: mit 5 ml Spritze und 27 G Kanüle Verdaulösung aufziehen und ablassen (2x)
- Zentrifugation: 600 g, 4°C, 5 min
- Überstandsabnahme, in jeweils 5 ml Blutlysepuffer (NH₄Cl: 8,03 mg/ml; Tris Base: 20,59 mg/ml, in autoklaviertem Wasser im Verhältnis 10:1) resuspendieren
- 4 min, bei 37°C inkubieren
- Lyse der Blutzellen mit jeweils 5 ml 10 % FCS in PBS (eisgekühlt) abstoppen
- Zentrifugation 600 g, 5 min, 4°C
- Überstandsabnahme und Zellpellet mit eisgekühltem PBS resuspendieren
- Durch 40 µm Sieb filtrieren
- Zentrifugation: 600 g, 5 min, 4°C
- Überstandsabnahme und resuspendieren in 2,5 ml eisgekühltem FACS Puffer (0,1 % FCS + 0,1 % Propidiumiodid (1 mg/ml in autoklaviertem Wasser) in PBS)
- Zellsuspension von Cortex und Mark in jeweils ein FACS Röhrchen überführen

Die Zellsuspension wurde nachfolgend auf Eis zum Klinikum transportiert. Dort wurden die PDGFR β-positiven Zellen anhand ihrer GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie von den rot-fluoreszierenden Zellen separiert. Nach dem 2,5-stündigen Sortieren wurden die kortikalen und medullären PDGFR β-positiven, GFP-exprimierenden Zellen abzentrifugiert (1.500 rpm, 37°C, 10 min) und in jeweils ein Well einer 24 Wellplatte ausgesät. Das Well wurde zuvor mit

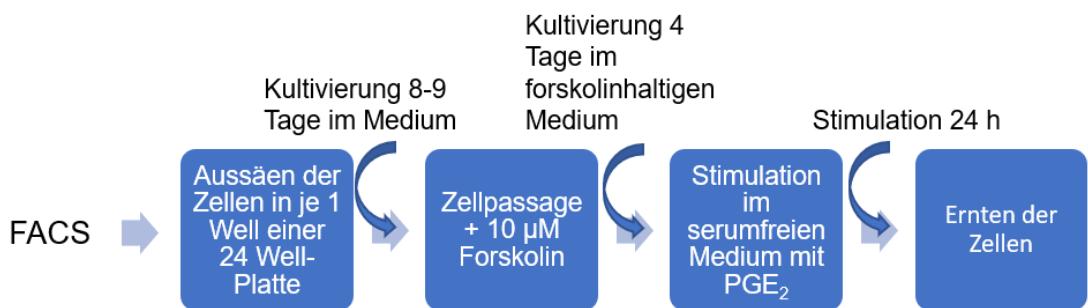
Coating-Medium (siehe Anhang) überschichtet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ mit einem DMEM/GlutaMAX (low Glucose) Medium, supplementiert mit 15 % FCS, 1 % Penizillin / Streptomycin, 1 % Insulin / Transferrin / Selenium, 0,1 % Amphotericin B.

3.9.2 Stimulation der PDGFR β -Zellen mit PGE₂

Die PDGFR β -Zellen verlieren in Kultur nach einer bestimmten Zeit die Eigenschaft Renin zu exprimieren. Aus diesem Grund wurden die Zellen möglichst bald (ungefähr 8-9 Tage) nach dem Aussäen (siehe 3.9.1) von der Oberfläche der 24-Well- Platte mit Hilfe von 10-fachem Trypsin gelöst, in 6 Wells aufgeteilt und für 4-5 weitere Tage mit dem Zusatz von Forskolin oder 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) kultiviert. Der Zusatz von Forskolin oder IBMX führt zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und dadurch zur Förderung der Renin-Produktion in den Zellen. Um dies zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt. Alle Zellen wurden mit 10 μ M Forskolin bzw. 100 μ M IBMX für 4 bzw. 6 Tage stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend für einen zusätzlichen Tag mit Forskolin bzw. IBMX stimuliert. Die Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel von Forskolin/IBMX behandelt. Nach den Stimulationsexperimenten mit Forskolin und IBMX wurden weitere Stimulationsexperimente mit 1 μ M PGE₂ durchgeführt.

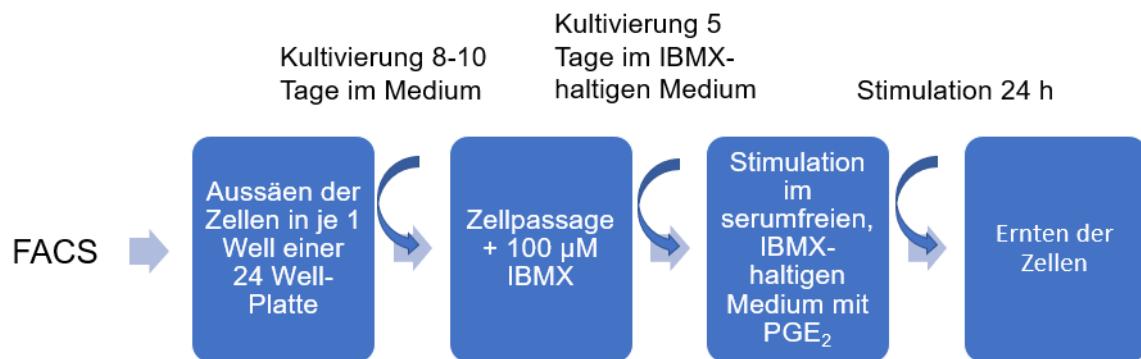
1. Protokoll:

Dabei wurden 3 Wells mit 1 μ M PGE₂ stimuliert; im gleichen Ansatz wurden 3 Wells als Kontrolle mit dem Vehikel ETOH (1 μ M) (Lösungsmittel von PGE₂) behandelt.



2. Protokoll:

Dabei wurden 3 Wells mit 1 μ M PGE₂ und 100 μ M IBMX stimuliert; im gleichen Ansatz wurden 3 Wells als Kontrolle mit dem Vehikel ETOH (1 μ M) (Lösungsmittel von PGE₂) und 100 μ M IBMX behandelt.



3.10 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert (MW) der Einzelmessungen + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 6. Die Werte wurden auf Normalverteilung überprüft und abhängig von den gegebenen Versuchsbedingungen wurde der entsprechende T-Test durchgeführt (gepaarter/ungepaarter T-Test). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Charakterisierung der PDGFR β -Cre Renin Knockout/PDGFR β -Cre mTmG Maus

Durch das Cre-LoxP-System wurden Mäuse erzeugt, in denen die Expression des Reningens in den PDGFR β positiven Zellen herunterreguliert ist. Dies erfolgte durch eine Kreuzung von Ren 1^{flox/flox}-Mäusen mit PDGFR β Cre Mäusen (vgl. Methoden 3.1.4). Um zu überprüfen, ob die Cre in den PDGFR β -Zellen und nicht in anderen Zellen aktiv ist, wurden PDGFR β Cre Mäuse mit Reportermäusen (mTmG) gekreuzt. Nach der Induktion mit Tamoxifen (siehe 3.1.7) exprimieren PDGFR β Cre Tomato Mäuse in den PDGFR β -Zellen das membranständige grün fluoreszierende Protein (GFP), während alle anderen Zellen ihre rote Fluoreszenz behalten (siehe Abbildung 4).

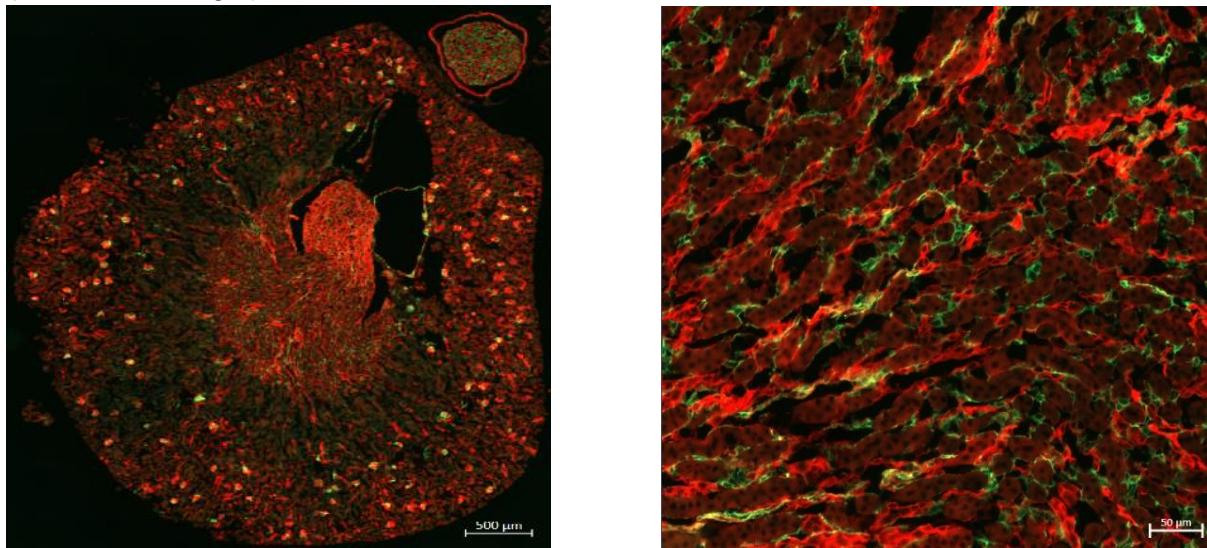


Abbildung 4 Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines Nierengefrierschnitts einer PDGFR β Cre / mTmG Maus

Zellen mit Cre-Aktivität exprimieren das grün fluoreszierende Protein (GFP). Alle anderen Zellen exprimieren das rot fluoreszierendes Protein mT

Links: Übersichtsaufnahme eines Nierenschnittes, Maßstab Balken: 500 μ m; Rechts: Ausschnitt: Nierenmark, dort befinden sich die meisten Renin-bildenden PDGFR β positiven Zellen, Maßstab Balken: 50 μ m

Die PDGFR β -positiven Zellen befinden sich über alle Nierenzonen verteilt. Zusätzlich zu den „klassischen“ renalen interstitiellen Zellen, exprimieren auch Mesangiumzellen und Perizyten den PDGFR β [186]. Es ist bekannt, dass im kortikalen Bereich der Niere die perivaskulären Zellen um die afferente Arteriole auch den PDGFR β exprimieren und unter bestimmten Voraussetzungen Renin produzieren können [187]. Um zu überprüfen, dass es sich bei diesen Zellen nicht um die klassischen juxtaglomerulären Zellen handelt, wurde auf den Gefrierschnitten von Reportermäusen eine Renin-Färbung angefertigt, auf der man die Abgrenzung der

PDGFR β Zellen und die Renin-Expression der klassischen juxtaglomerulären Zellen größtenteils erkennen kann (siehe Abbildung 5).

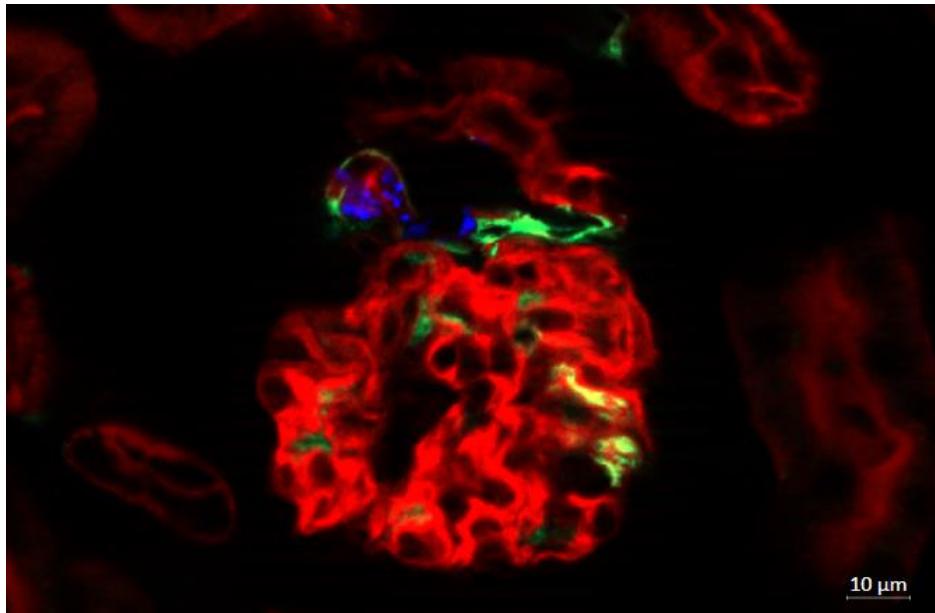
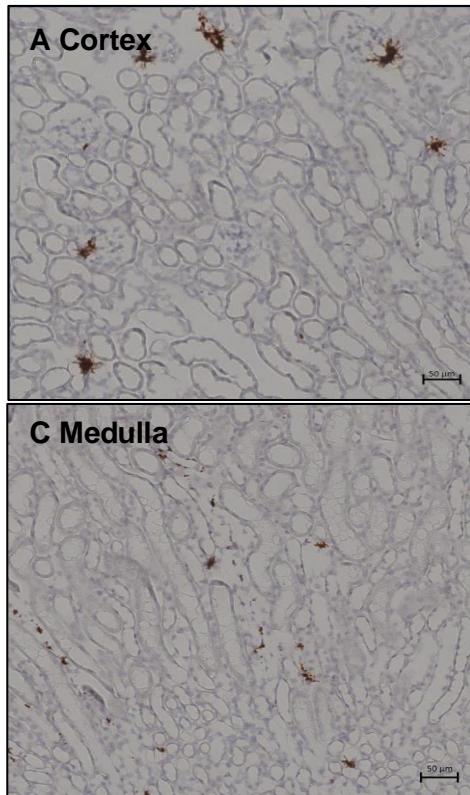


Abbildung 5 Glomerulus: Reninprotein-Färbung auf einem Gefrierschnitt einer PDGFR β /mTmG Maus
Renin-Signal (blau) der juxtaglomerulären Zellen überlagert sich nicht mit dem GFP-Signal der perivaskulären
PDGFR β -Zellen (grün), Maßstabsbalken 10 μ m

Bei der PDGFR β Cre Ren $^{flox/flox}$ Maus (im Folgenden: PDGFR β Ren KO) handelt es sich um eine induzierbare Cre-Mauslinie, deren PDGFR β -positiven interstitiellen Zellen die Fähigkeit zur Produktion von Renin theoretisch verlieren sollten. Durch die Anwendung der In Situ Hybridisierungs-Technologie war es möglich, die Präsenz beziehungsweise das Fehlen von Renin mRNA in Nierenschnitten nachzuweisen. Die dunkelbraunen Markierungen, die auf den Nierenschnitten in Abbildung 6 zu sehen sind, stellen Signale für Renin mRNA dar. Die deutlichen punktuellen Färbungen im kortikalen Bereich der Niere zeigen die Renin mRNA Expression der juxtaglomerulären Zellen (vgl. Abbildung 6 A und B), während das feinere punktartige Renin-Signal in der Medulla den interstitiellen Zellen zugeschrieben werden kann (vgl. Abbildung 6 C und D). Wie man deutlich erkennen kann, besitzen PDGFR β Ren KO Mäuse, genauso wie PDGFR β Ren WT Mäuse die Fähigkeit zur Renin-Produktion in den juxtaglomerulären Zellen (vgl. Abbildung 6 A und B). Bei der PDGFR β Ren WT Maus erkennt man auch Renin mRNA in medullären interstitiellen Zellen (vgl. Abbildung 6 C). In Abbildung 6 D ist erkennbar, dass die PDGFR β Ren KO Maus hingegen nur wenige Renin-produzierende Zellen im Interstitium aufweist. Diese Beobachtungen bestätigen die korrekte und effektive Rekombination der genetisch veränderten PDGFR β Ren KO Mäuse.

PDGFR β Ren WT



PDGFR β Ren KO

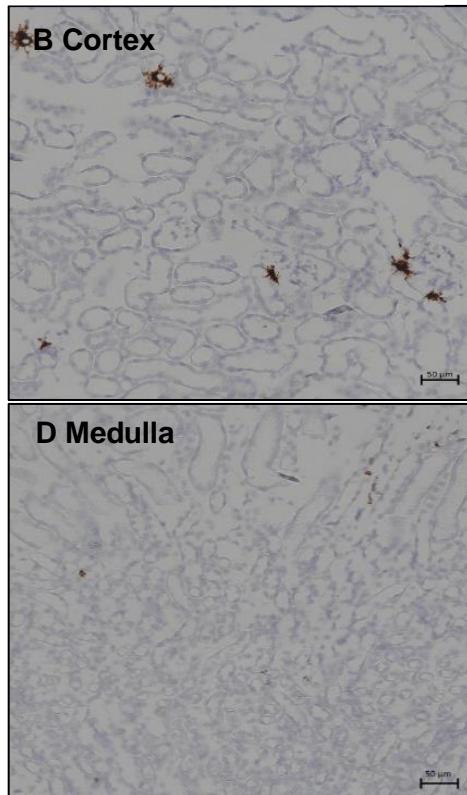


Abbildung 6 ISH Renin mRNA, Renin mRNA (braun), Maßstabbalken 50 μ m

- A. PDGFR β Ren WT, Ausschnitt Cortex: juxtaglomeruläres Renin mRNA Signal
- B. PDGFR β Ren KO, Ausschnitt Cortex: juxtaglomeruläres Renin mRNA Signal
- C. PDGFR β Ren WT, Ausschnitt Medulla: einige interstitielle Zellen exprimieren Renin
- D. PDGFR β Ren KO, Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin mRNA Signal kaum sichtbar

Die Tatsache, dass das interstitielle Renin-Signal bei PDGFR β Ren KO Mäusen fast vollständig fehlt, spricht dafür, dass es sich bei den PDGFR β -Zellen um die primären Renin produzierenden interstitiellen Zellen in der Niere handelt. Durch die Verwendung des Multiplex RNA Scopes können gleichzeitig zwei Ziel mRNAs nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob die interstitiellen Zellen nicht nur Renin mRNA, sondern auch (Pro)-Renin-Protein bilden, wurde anschließend auf diesen Schnitten eine (Pro)-Renin-Färbung angefertigt. Die Kolokalisation von Renin mRNA, (Pro)-Renin-Protein und PDGFR β mRNA bekräftigt die vorherige Beobachtung, dass PDGFR β -positive Zellen die interstitiellen Zellen sind, die Renin produzieren (siehe Abbildung 7). Diese Methode belegt zudem, dass die PDGFR β positiven Zellen nicht nur Renin mRNA herstellen, sondern gleichzeitig auch das zugehörige Protein bilden. Zu erwähnen ist, dass für diese Untersuchungen diabetische Mäuse verwendet wurden, da bei den Kontrolltieren kaum bis gar keine (Pro)-Renin-Färbung in den interstitiellen Zellen nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu zeigen Tiere mit diabetischer Nephropathie eine höhere Renin-Expression in interstitiellen Zellen.

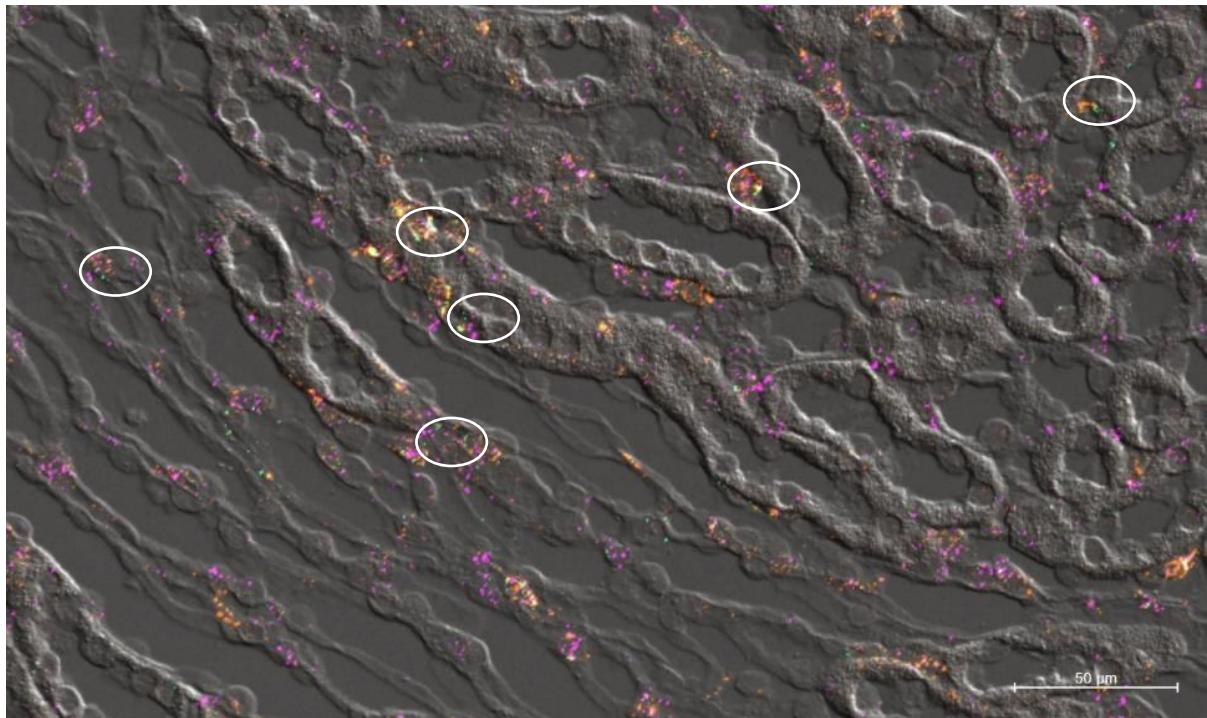


Abbildung 7 Ausschnitt: Nierenmark Fluoreszenz-mRNA Scope: Renin mRNA, PDGFR β mRNA und anschließende Fluoreszenzfärbung (Pro)-Renin einer diabetischen Maus (WT), Maßstabbalken: 50 μ m
 Weißer Kreis: Kolokalisation von Renin mRNA, PDGFR β mRNA und Renin (Protein) in den interstitiellen Zellen, Renin mRNA (orange), PDGFR β mRNA (violett), (Pro)-Renin (Protein) (grün)

Die dennoch schwache (Pro)-Renin-Färbung im Interstitium der diabetischen Mäuse könnte darauf zurückzuführen sein, dass PDGFR β -Zellen (Pro)-Renin unmittelbar nach der Translation freisetzen und die intrazelluläre Konzentration daher unterhalb der Nachweigrenze liegt. Diese Hypothese konnte durch den Einsatz von Brefeldin A bestätigt werden. Durch Brefeldin A werden Proteine gehemmt, die die Aktivierung von ADP-Ribosylierungsfaktoren fördern. Die Ribosylierungsfaktoren sind für die Rekrutierung und Assemblierung von Proteinkomplexen ("Hüllen") verantwortlich, welche die Reifung kleiner Membranvesikel vorantreiben, die ihrerseits Voraussetzung für die Sekretion der Vesikel sind [188]. Brefeldin A inhibiert daher die Sekretion von Exozytosevesikeln aus den Zellen. Um eine *in vivo* Toxizität von Brefeldin A zu vermeiden, wurde es unter kontrollierten Bedingungen an isoliert perfundierten Nieren angewendet. Wie in Abbildung 8 gezeigt, war nach Anwendung von Brefeldin A eine deutlichere Reninfärbung in interstitiellen Zellen erkennbar. Damit sprechen diese Ergebnisse für die Hypothese, dass interstitielle Zellen (Pro)-Renin als Protein nicht lange speichern, sondern unmittelbar freisetzen (vgl. Abbildung 8).

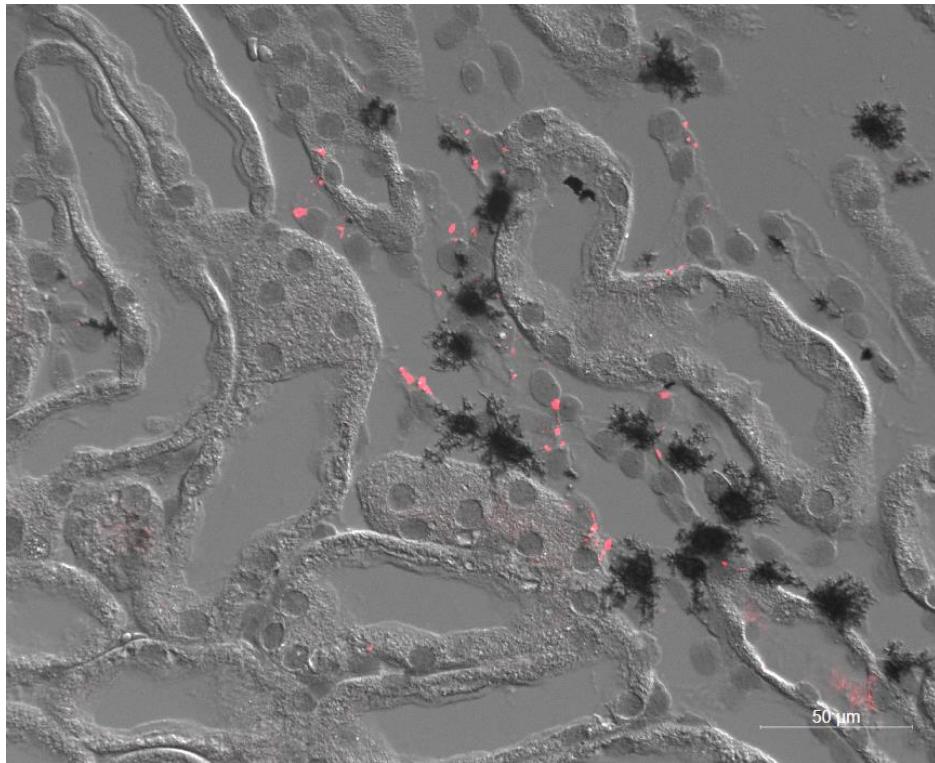


Abbildung 8 Ausschnitt: Nierenmark, ISH Renin mRNA und anschließende Färbung mit Renin (isoliert perfundierte Niere mit Brefeldin A), Maßstabbalken: 50 μ m
Deutliche (Pro)-Reninfärbung durch Brefeldin A-Perfusion; Renin mRNA (schwarz), (Pro)-Renin-Protein (rot)

4.2 Physiologische Parameter der PDGFR β Ren KO und WT Mäuse

Um die physiologischen Unterschiede der PDGFR β Ren WT und KO Mäuse zu bestimmen, wurden jeweils sieben männliche PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse im Alter von 26-29 Wochen induziert und miteinander verglichen.

4.2.1 Körper- und Organgewichte

Die Körpergewichte der Tiere wurden vor der Tamoxifen (TMX)-Induktion sowie am Ende des Versuchs erfasst und miteinander verglichen. Die Gewichte der Nieren und Herzen wurden auf das Gehirngewicht bezogen. Unter physiologischen Bedingungen zeigen die beiden Genotypen keine Unterschiede hinsichtlich Körpergewicht, Gehirngewicht und relativem Nierengewicht (siehe Abbildung 9 A-C). Aufgrund des Lebensalters der Mäuse kam es im Beobachtungszeitraum zu keiner Veränderung des Körpergewichtes (Abb. 9 A). Lediglich das relative Herzgewicht der PDGFR β Ren KO Mäuse im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen ist geringer (Abb. 9 D).

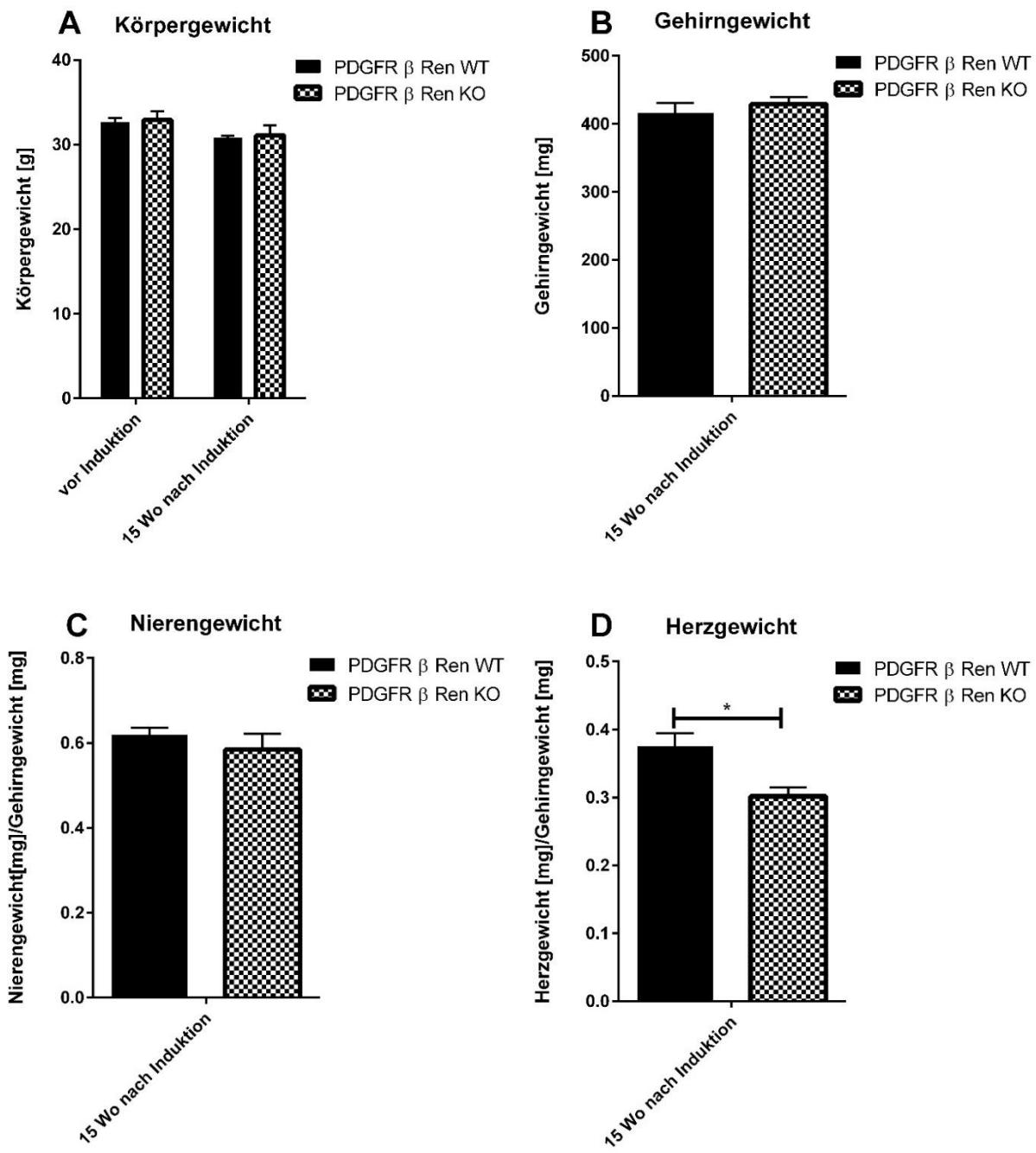


Abbildung 9 Gewichte: Körpergewicht, Gehirngewicht, Nierengewicht, Herzgewicht

- A. Körpergewicht: vor der Induktion: PDGFR β Ren WT (n=7): $32,6 \pm 0,5$ g vs. PDGFR β Ren (n=7) KO $32,9 \pm 1,0$ g; nach der Induktion: PDGFR β Ren WT (n=7): $30,8 \pm 0,2$ g vs. PDGFR β Ren KO (n=7) $31,1 \pm 1,2$ g
- B. Gehirngewicht: PDGFR β Ren WT (n=7): $415,7 \pm 14,6$ mg vs. PDGFR β Ren KO (n=7) $428,9 \pm 10,6$ mg
- C. Relatives Nierengewicht (in Bezug auf Gehirngewicht): PDGFR β Ren WT (n=6): $0,62 \pm 0,02$ vs. PDGFR β Ren KO (n=7): $0,58 \pm 0,04$
- D. Relatives Herzgewicht (in Bezug auf Gehirngewicht): PDGFR β Ren WT (n=7): $0,38 \pm 0,02$ vs. PDGFR β Ren KO (n=6): $0,30 \pm 0,01$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

4.2.2 Renin-Expression im Nierengewebe

Mithilfe der In Situ Hybridisierungs-Technologie (vergleiche Abbildung 6) konnte man bereits die unterschiedliche Renin-Expression zwischen den beiden Genotypen visuell erfassen. Die

Quantifizierung der Renin mRNA mittels qPCR (Abbildung 10) stimmen mit den visuellen Beobachtungen überein. Die renale Renin mRNA Konzentration der PDGFR β Ren KO Mäuse ist im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen niedriger (siehe Abbildung 10 A). Es ist allgemein bekannt, dass nicht nur die Niere, sondern auch andere Organe wie beispielsweise die Nebenniere ein autonomes, lokales RAAS aufweisen. Sowohl in der Niere als auch in der Nebenniere sind alle Bestandteile des RAAS vorhanden [119]. Die PDGFR β Ren KO Mäuse weisen in der Nebenniere tendenziell niedrigere Renin mRNA Konzentrationen auf als die PDGFR β Ren WT Mäuse (siehe Abbildung 10 B). Man kann daher nicht ausschließen, dass PDGFR β positive Zellen möglicherweise in der Lage sind, nicht nur in der Niere, sondern auch in anderen Organen, wie der Nebenniere, Renin zu produzieren. Die durchschnittliche Zyklenzahl von Renin in der Niere von PDGFR β Ren WT Mäusen beträgt 20, verglichen mit 28 bei PDGFR β Ren WT Mäusen in der Nebenniere (ähnliche RPL 32-Zyklenzahl der beiden Organe). Dies zeigt deutlich, dass in der Nebenniere viel weniger Renin mRNA exprimiert wird als in der Niere.

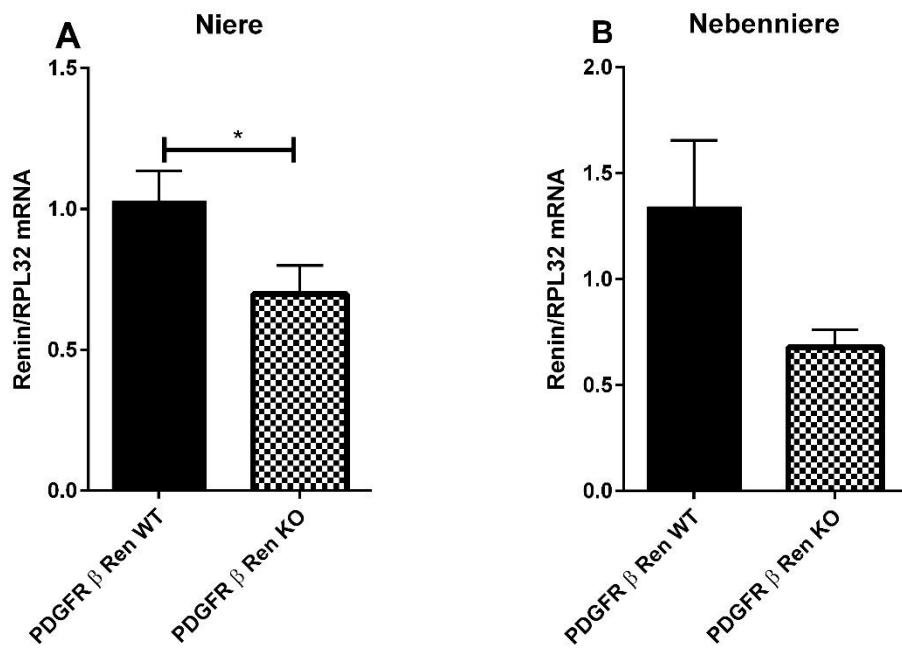


Abbildung 10 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, gesamte Niere

A. PDGFR β Ren WT (n=6): 1,03 \pm 0,11 vs. PDGFR β Ren KO (n=7): 0,70 \pm 0,101, Signifikanzniveau: * p < 0,05
B. PDGFR β Ren WT (n=7): 1,34 \pm 0,31 vs. PDGFR β Ren KO (n=6): 0,68 \pm 0,08

Anschließend wurde untersucht, ob neben der niedrigeren Renin mRNA Expression auch eine verringerte Reninaktivität im Nierengewebe der PDGFR β Ren KO Mäuse festzustellen ist. Zur Bestimmung der Reninaktivität im Gewebe wurde der ANG-I-ELISA verwendet (vgl. Methodenteil). Die gemessene ANG-I-Konzentration des ELISA's lässt auf die Renin-Aktivität in der Probe schließen. Die Nieren wurden zuvor in Cortex, Medulla und Papille zoniert. Wie in Abbildung 11 dargestellt ist, weist aktives Renin einen deutlichen kortikal-papillären Gradienten

auf, wobei die Renin-Aktivität vom Cortex zur Papille hin abnimmt. Die Renin-Aktivität im Cortex ist bei den PDGFR β Ren KO Mäusen im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen signifikant niedriger. Auch in der Medulla und der Papille liegen tendenziell niedrigere Renin-Konzentrationen bei den PDGFR β Ren KO Tieren vor (Abb.11 B-C).

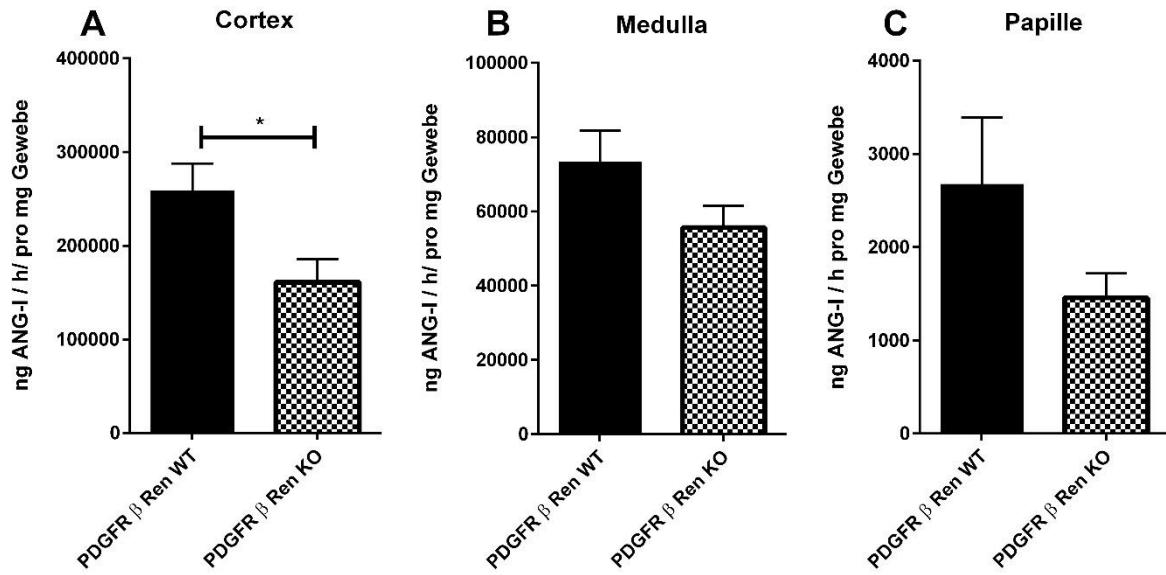


Abbildung 11 Renin-Aktivität im Nierengewebe

- A. Renin-Aktivität im Cortex: PDGFR β Ren WT (n=6): 258.614 ± 29.262 ng ANG I/h pro mg Gewebe vs. PDGFR β Ren KO (n=7) 160.906 ± 24.711 ng ANG I/h pro mg Gewebe; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$
- B. Renin-Aktivität in der Medulla: PDGFR β Ren WT (n=6): 73.278 ± 8.434 ng ANG I/h pro mg Gewebe vs. PDGFR β Ren KO (n=7): 55.667 ± 5.908 ng ANG I/h pro mg Gewebe
- C. Renin-Aktivität in der Papille: PDGFR β Ren WT (n=6): 2.676 ± 713 ng ANG I/h pro mg Gewebe vs. PDGFR β Ren KO (n=7): 1.459 ± 260 ng ANG I/h pro mg Gewebe

4.2.3 Renin-, Prorenin-, und Aldosteron-Konzentration im Plasma

Wie oben gezeigt, scheinen interstitielle Zellen direkt nach der Translation Renin und/oder Prorenin extrazellulär abzugeben. Es wurde daher untersucht, ob der interstitielle Renin KO die systemische (Pro)-Renin-Konzentration beeinflusst. Um die Stichprobengröße der Analyse zu erhöhen, wurde auch Plasma von Kontrolltieren und von Adenin- und STZ-Versuchstieren (s.u.) unter Basalbedingungen einbezogen. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Tierkohorten fand sich nicht. Allerdings ist sowohl die Renin- als auch die Prorenin-Plasma-Konzentration der PDGFR β Ren KO Tiere im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen geringer (siehe Abbildung 12 A und B). Diese Ergebnisse zeigen, dass der interstitielle Renin KO zu einer Verringerung der Renin- und Prorenin-Konzentration im Plasma führt. Man kann erkennen, dass sich der interstitielle Renin KO stärker auf die Prorenin-, als auf die Renin-Plasma-Konzentration auswirkt. Die Prorenin-Plasma-Konzentration ist bei den PDGFR β Ren KO Mäusen stärker reduziert als die Renin-Plasma-Konzentration. Es sei an dieser Stelle nochmal darauf hingewiesen, dass es sich bei dem Begriff „Konzentration“ in diesem Zusammenhang nicht um eine Konzentration im eigentlichen Sinne handelt, sondern um die Reninaktivität in

Anwesenheit eines Überschusses von Reninsubstrat. Diese Ungenauigkeit hat sich in der Literatur zum Renin-System durchgesetzt, wird dort durchgängig verwendet und wird daher auch hier gebraucht. Anschließend wurde geprüft, ob durch die verringerte Renin-/Prorenin-Konzentration der PDGFR β Ren KO Tiere auch weitere Bestandteile des RAAS und damit seine Wirkung abgeschwächt wird. Hierzu wurde die Aldosteron-Konzentration im Plasma der Tiere gemessen. Auch die Aldosteron-Plasma-Konzentration der PDGFR β Ren KO Tiere ist geringer (vgl. Abbildung 12 C). Dies deutet darauf hin, dass die geringere (Pro)-Renin-Konzentration bei den PDGFR β Ren KO Tieren zur verringerten Aldosteron-Konzentration im Plasma führt.

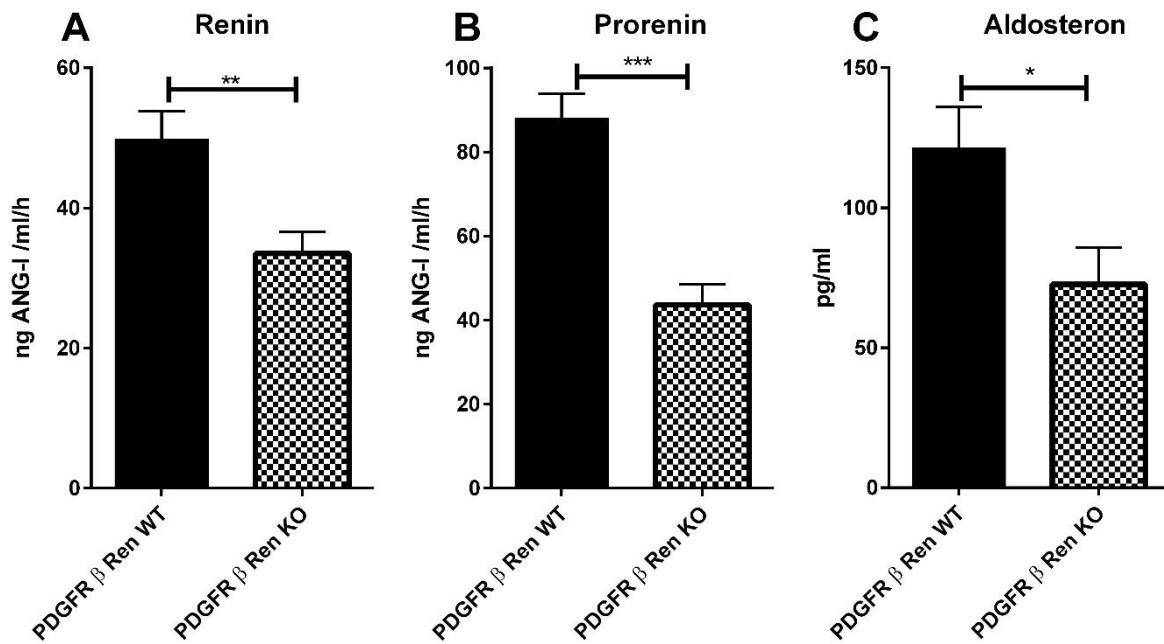


Abbildung 12 Renin-, Prorenin-, Aldosteron-Konzentration im Plasma

A. Renin-Konzentration im Plasma: PDGFR β Ren WT (n=31): $49,88 \pm 3,99$ ng ANG I/h/ml vs. PDGFR β Ren KO (n=32): $33,53 \pm 3,05$ ng ANG I/h/ml; Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$

B. Prorenin-Konzentration im Plasma: PDGFR β Ren WT (n=29): $88,05 \pm 5,84$ ng ANG I/h/ml vs. PDGFR β Ren KO (n=33): $43,59 \pm 4,92$ ng ANG I/h/ml; Signifikanzniveau: *** $p < 0,001$

C. Aldosteron-Konzentration im Plasma: PDGFR β Ren WT (n=21): $121,5 \pm 14,51$ pg/ml vs. PDGFR β Ren KO (n=18): $72,63 \pm 13,21$ pg/ml; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

4.2.4 Osmolarität, Elektrolytkonzentration im Urin

Im Hinblick auf die Osmolarität, die Kreatinin- und Kaliumkonzentration im Urin wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt (siehe Abbildung 13 A, B und D). Allerdings weisen die PDGFR β Ren KO Mäuse eine erhöhte Ausscheidung von Natrium auf (vergleiche Abbildung 13 C).

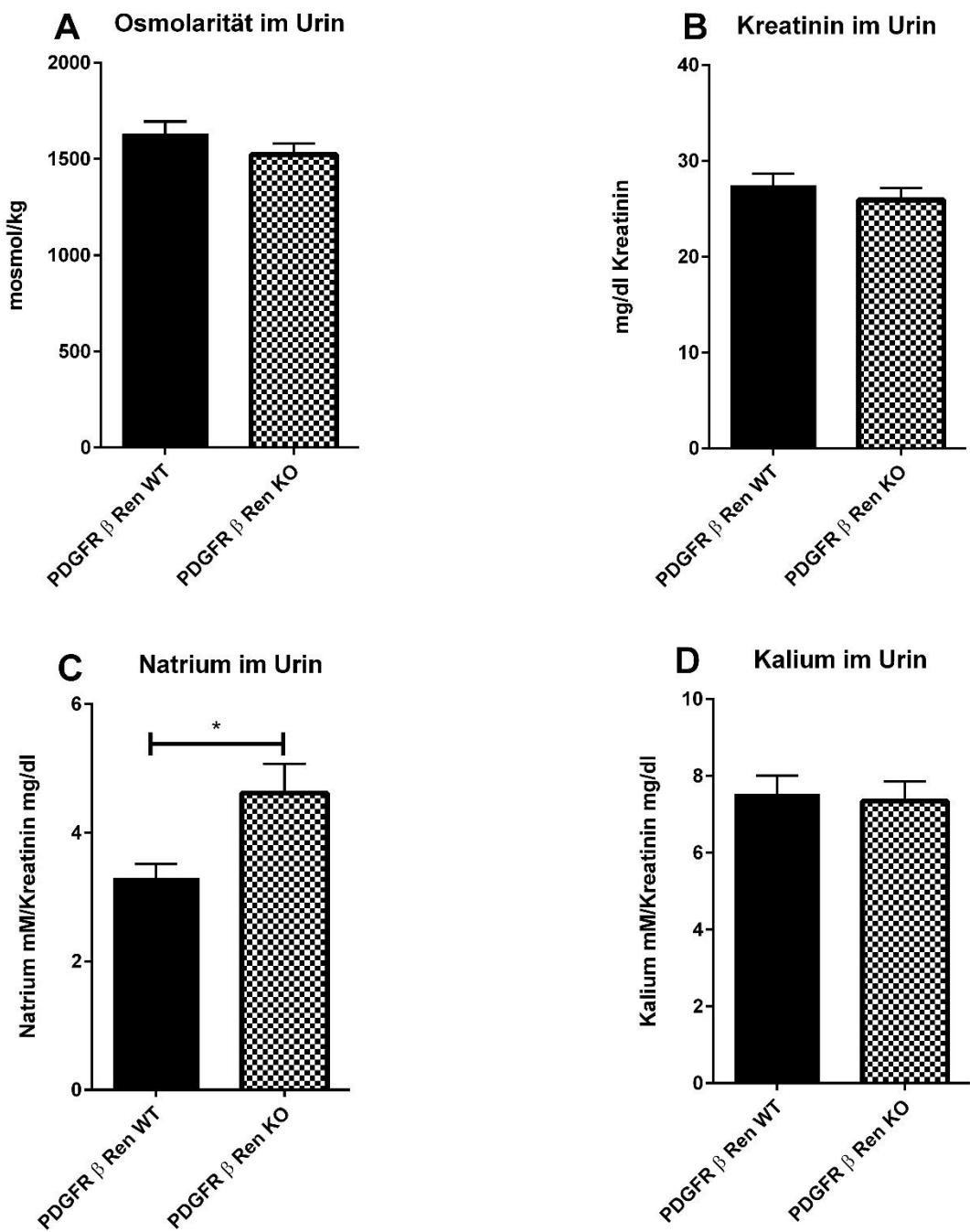


Abbildung 13 Urin: Osmolarität, Elektrolyt-Konzentration

- A. Osmolarität im Urin: PDGFR β Ren WT (n=35): $1630 \pm 64,9$ mosmol/kg vs. PDGFR β Ren KO (n=34): $1522 \pm 57,7$ mosmol/kg
- B. Kreatinin im Urin: PDGFR β Ren WT (n=29): $27,4 \pm 1,2$ mg/dl vs. PDGFR β Ren KO (n=29): $25,9 \pm 1,2$ mg/dl
- C. Natriumkonzentration im Urin: PDGFR β Ren WT (n=26): $3,3 \pm 0,2$ Na mM/Kreatinin mg/dl vs. PDGFR β Ren KO (n=29): $4,6 \pm 0,5$ Na mM/Kreatinin mg/dl, Signifikanzniveau: * $p < 0,05$
- D. Kaliumkonzentration im Urin: PDGFR β Ren WT (n=29): $7,5 \pm 0,5$ K mM/Kreatinin mg/dl vs. PDGFR β Ren KO (n=27): $7,3 \pm 0,5$ K mM/Kreatinin mg/dl

4.2.5 Albumin-Konzentration

Unter physiologischen Bedingungen zeigen die PDGFR β Renin KO Mäuse eine geringfügig erhöhte Albumin-Konzentration im Urin.

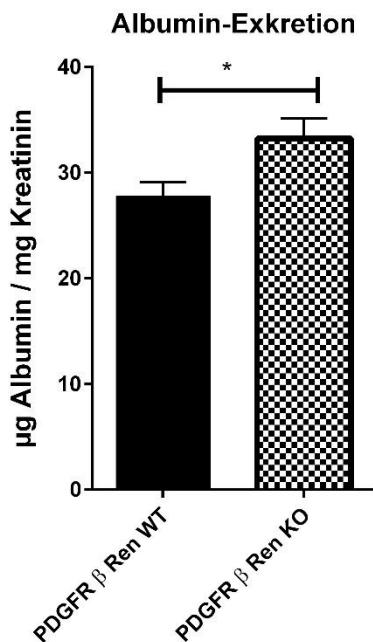


Abbildung 14 Albumin-Konzentration im Urin,
PDGFR β Ren WT (n=26): $27,80 \pm 1,303$ µg Albumin/mg Kreatinin vs. PDGFR β Ren KO (n=24): $33,2 \pm 1,9$ µg Albumin/mg Kreatinin; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

4.2.6 Blutdruck

Um mögliche Auswirkungen der reduzierten Renin-Aktivität der PDGFR β Ren KO Mäuse auf den Blutdruck zu untersuchen, wurde dieser bei den Tieren mittels Tail Cuff Plethysmographie bestimmt. Der Blutdruck wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen gemessen, wobei täglich 8 Messungen an jedem Tier durchgeführt wurden.

Die PDGFR β Ren KO Tiere weisen einen niedrigeren Blutdruck als die PDGFR β Ren WT Mäuse auf (siehe Abbildung 15).

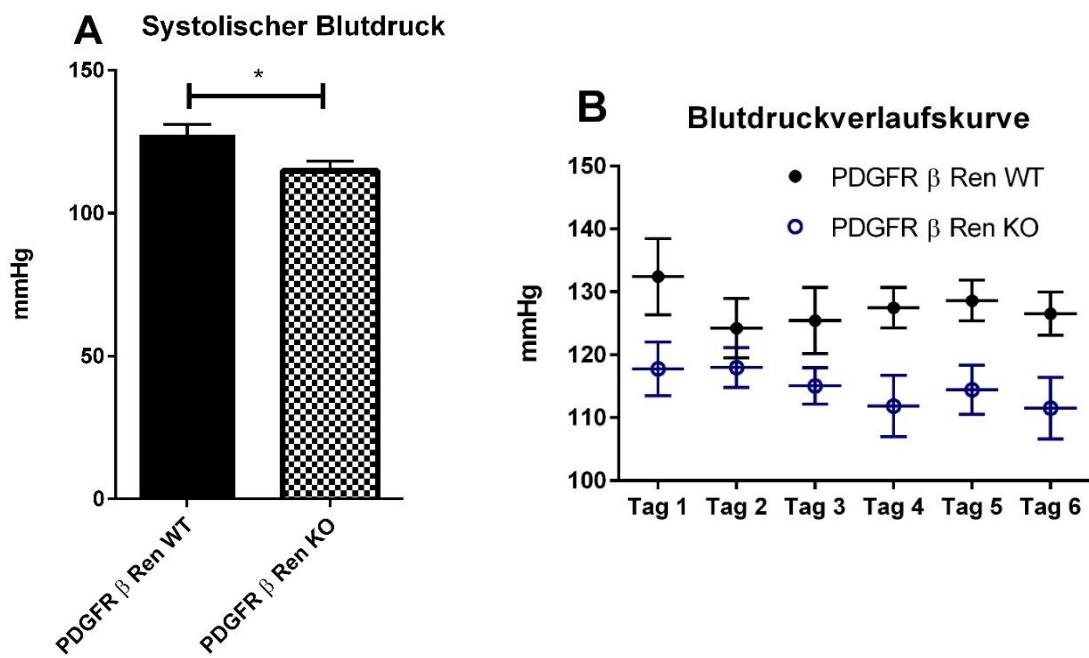


Abbildung 15 systolischer Blutdruck

A. gemittelter Blutdruck von 6 Tagen PDGFR β Ren WT (n=7): 127,5 \pm 3,6 mmHg vs. PDGFR β Ren KO (n=7):

114,8 \pm 3,3 mmHg

B. Blutdrucksverlaufskurve gemittelte Werte pro Tag und pro Genotyp

4.2.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits unter physiologischen Bedingungen deutlich erkennbare Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bestehen. Die Produktion von Renin durch PDGFR β -positive Zellen trägt sowohl zum zirkulierenden Renin, als auch zum zirkulierenden Prorenin bei und wirkt sich somit auf den Aldosteronspiegel und den Blutdruck aus. Im nachfolgenden Teil wird untersucht, ob das interstitielle Renin auch in die pathophysiologischen Veränderungen bei Nierenschädigungen eingebunden ist.

4.3 Funktionelle Bedeutung von Renin aus interstitiellen Zellen der Niere im Krankheitsmodell

Der 2. Teil der Arbeit befasst sich mit der funktionellen Bedeutung von Renin aus interstitiellen Zellen der Niere in den Nierenschädigungsmodellen Adeninnephropathie und diabetische Nephropathie. Durch die In Situ Hybridisierung-Technologie habe ich in Vorversuchen festgestellt, dass sowohl bei einer Adenin-induzierten Nephropathie als auch bei einer diabetischen Nephropathie die Renin mRNA Expression in den interstitiellen Zellen zunimmt. Um die Auswirkung und die Bedeutung dieser erhöhten Renin-Expression in den interstitiellen Zellen zu untersuchen, wurden die beiden Genotypen unter einer Adeninnephropathie und einer diabetischen Nephropathie hinsichtlich Nierenfunktion und Nierenschädigungsmarkern miteinander verglichen.

4.3.1 Blutzuckerspiegel

Hyperglykämie und arterielle Hypertonie sind die stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie [189,190]. Durch die STZ-Behandlung entwickelten PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse eine Hyperglykämie, ihr Blutzuckerspiegel stieg um das 3-fache (siehe Abbildung 16). Es wurden alle Mäuse als diabetisch angesehen, die einen Blutzuckerspiegel über 300 mg/dl aufweisen. Hinsichtlich des Blutzuckerspiegels gibt es keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

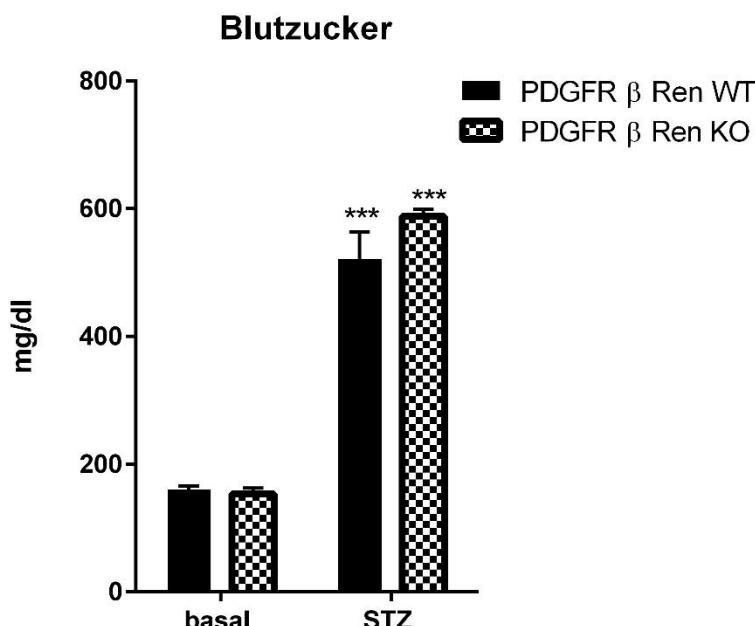


Abbildung 16 Blutzuckerspiegel
PDGFR β Ren WT basal (n= 7): $160,0 \pm 5,6$ mg/dl vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $153,6 \pm 8,7$ mg/dl;
PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $520,4 \pm 42,7$ mg/dl vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $587,8 \pm 11,0$ mg/dl
Signifikanzniveau: *** p < 0,001

4.3.2 Körpermengen, Nieren- und Herzgewicht

Die Körpermengen der PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse unterscheiden sich sowohl unter physiologischen, als auch unter einer Adeninnephropathie nicht. Beide Genotypen nahmen unter Schädigungsbedingungen ab (siehe Abbildung 17 A). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, sind die Körpermengen der Adenin-behandelten Mäuse deutlich niedriger, daher wird das Nieren- und Herzgewicht auf das Gehirngewicht bezogen. Die Gehirngewichte der beiden Genotypen unterscheiden sich nicht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es bei den PDGFR β Ren WT Mäusen in Bezug auf das Nieren- und Herzgewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe gibt. Im Gegensatz dazu lässt sich bei den mit Adenin behandelten PDGFR β Ren KO Tieren eine Reduktion des Nieren- und Herzgewichts im Vergleich zur PDGFR β Ren KO Kontrollgruppe feststellen (siehe Abbildung 17 B und C). Demzufolge ist das relative Herzgewicht der behandelten PDGFR β Ren KO Tiere signifikant geringer als das Herzgewicht der PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse.

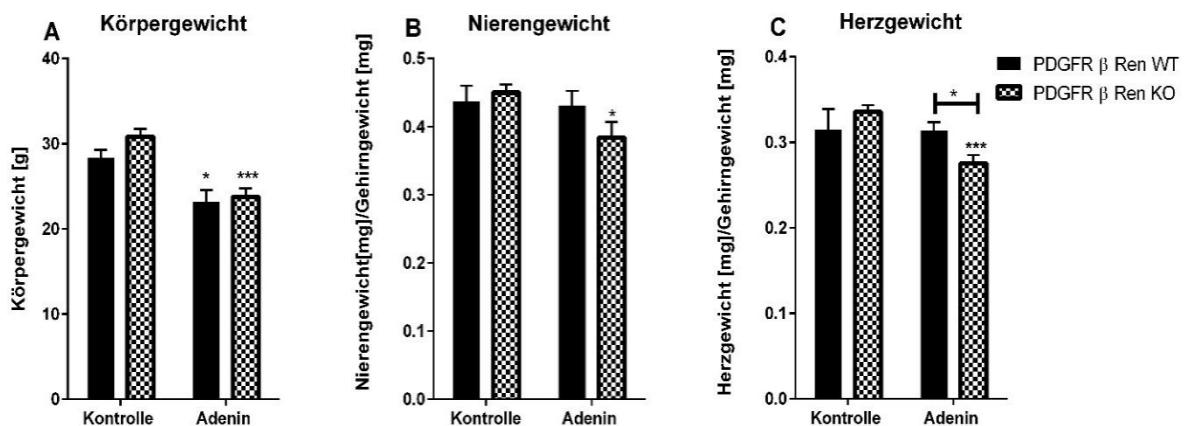


Abbildung 17 Körpermengen, relatives Nieren- und Herzgewicht, Adeninnephropathie

A. Körpermengen:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $28,3 \pm 0,93$ g vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $30,9 \pm 0,87$ g;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $23,2 \pm 1,38$ g vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $23,8 \pm 0,96$ g

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

B. Nieren- und Herzgewicht/Gehirngewicht:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,431 \pm 0,022$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,450 \pm 0,012$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $0,437 \pm 0,023$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,384 \pm 0,022$

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

C. Herzgewicht/Gehirngewicht

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,315 \pm 0,024$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,336 \pm 0,008$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,313 \pm 0,010$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,276 \pm 0,010$

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

Unter diabetischen Bedingungen nahmen die Versuchstiere ebenfalls ab. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind die Körpermengen der STZ Mäuse signifikant niedriger. Zwischen den Genotypen gibt es keine Unterschiede. Hinsichtlich des Nieren Gewichts zeigt sich eine Zunahme bei den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen (siehe Abbildung 18 B). Vermutlich entwickelten die Mäuse nach 12 Wochen Hyperglykämie eine renale Hypertrophie [189]. Das Herzgewicht der PDGFR β Ren WT Tiere bleibt durch dieses Schädigungsmodell

unverändert. Interessanterweise zeigt sich unter einer diabetischen Nephropathie, genauso wie unter einer Adenin-Behandlung bei den PDGFR β Ren KO Tieren eine Reduktion des relativen Herzgewichts im Vergleich zu PDGFR β Ren KO Kontrolltieren. Das Herzgewicht der PDGFR β Ren KO STZ Tiere ist signifikant geringer als bei den behandelten PDGFR β Ren WT STZ Tiere (vgl. Abbildung 18 C).

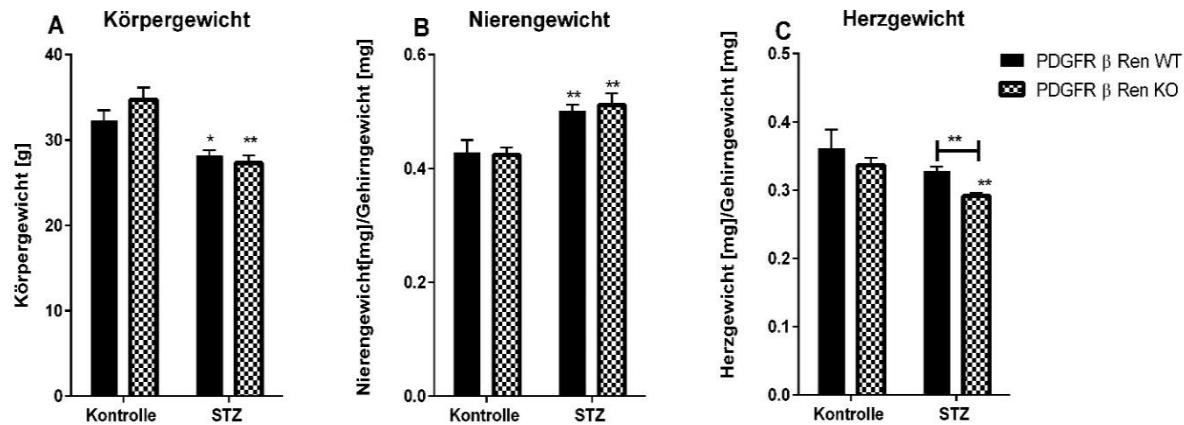


Abbildung 18 Körpergewicht, relatives Nieren- und Herzgewicht: diabetische Nephropathie

A. Körpergewicht:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $32,27 \pm 1,23$ g vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5) $34,72 \pm 1,45$ g;

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $28,15 \pm 0,66$ g vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $27,30 \pm 0,89$ g

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

B. Nierengewicht/Gehirngewicht:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,428 \pm 0,022$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5) $0,424 \pm 0,013$;

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $0,501 \pm 0,011$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $0,511 \pm 0,021$

Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$

C. Herzgewicht/Gehirngewicht:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,361 \pm 0,028$ vs. KO Kontrolle (n=5) $0,336 \pm 0,011$

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $0,328 \pm 0,007$, PDGFR β Ren KO STZ (n=5): $0,292 \pm 0,004$

Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$

4.3.3 Untersuchung der Renin mRNA bei einer Adeninnephropathie

Um die Renin mRNA in der Niere zu detektieren und spezifischen Zellen zuzuordnen, wurde auf Nierenschnitten von PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen die Renin mRNA mittels In Situ Hybridisierungs-Technologie (RNA Scope) sichtbar gemacht.

Neben den Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen der Niere, exprimieren PDGFR β Ren WT Mäuse Renin mRNA auch in interstitiellen Zellen der Niere (vgl. Abbildung 19 A rechts). Unter Schädigungsbedingungen, wie einer Adeninnephropathie kommt es bei PDGFR β Ren WT Tieren zu einer starken Zunahme der Zahl Renin-produzierender interstitieller Zellen und zu einem Anstieg der Renin mRNA in interstitiellen Zellen der Niere (siehe Abb. 19 C rechts). Bei den PDGFR β Ren KO Mäusen scheint das juxtaglomeruläre Renin mRNA Signal im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Tieren unverändert zu sein. Allerdings sind bei diesem Genotyp unter Kontrollbedingungen kaum Renin-bildende interstitielle Zellen zu erkennen (vgl.

Abbildung 19 B rechts). Unter Schädigungsbedingungen ist keine Zunahme des interstitiellen Renins bei PDGFR β Ren KO Tieren zu beobachten (Abbildung 19 D). Es sind auch unter Schädigungsbedingungen bei diesem Genotyp kaum Renin-bildende Zellen im Interstitium zu erkennen.

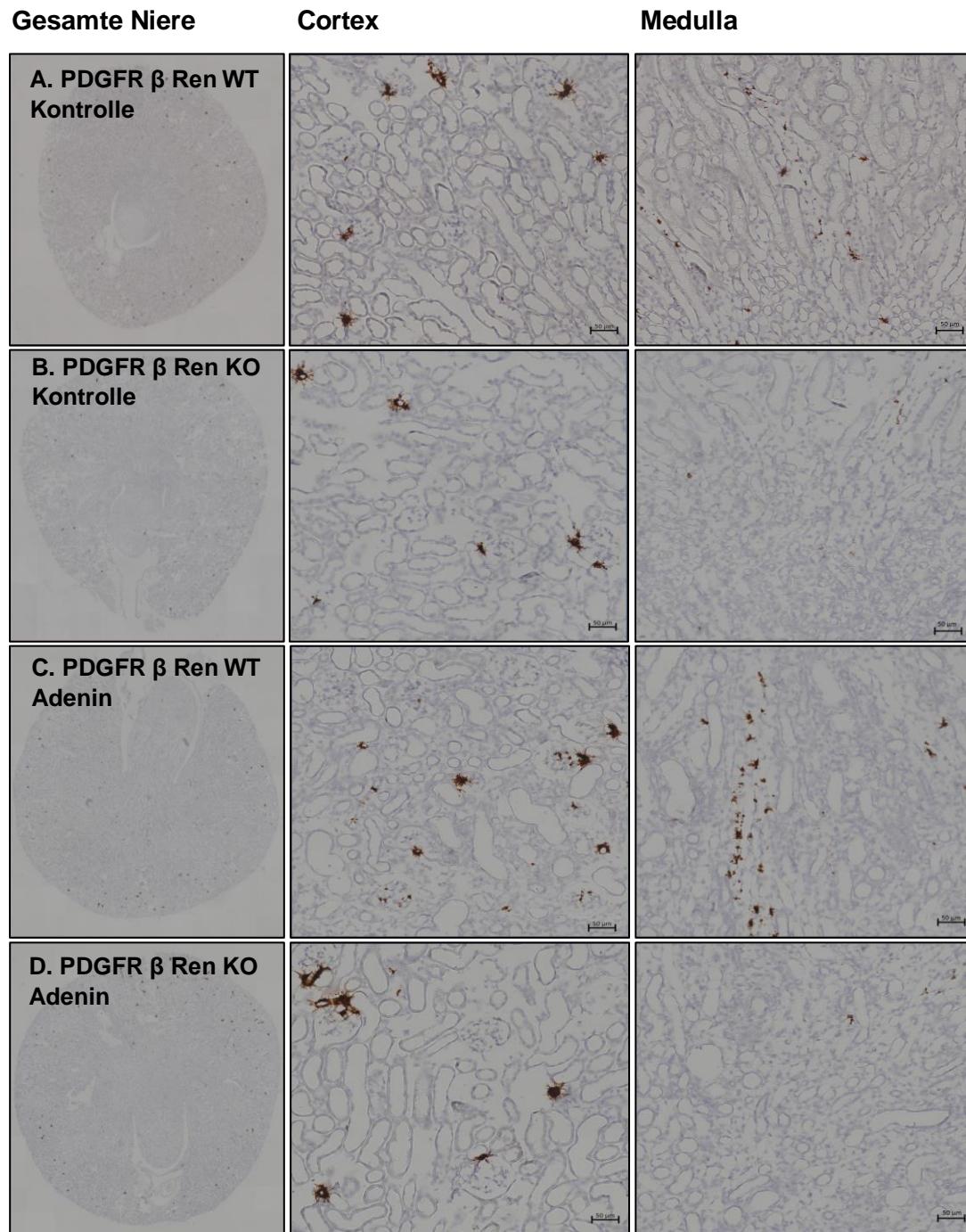


Abbildung 19 ISH Renin mRNA (braun), Maßstabbalken 50 µm, Adenin

A. PDGFR β Ren WT Kontrolle: links: Gesamtniere, Mitte: Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Medulla: interstitielles Renin mRNA Signal: einige, wenige interstitielle Zellen exprimieren Renin mRNA

B. PDGFR β Ren KO Kontrolle: links: Gesamtniere, Mitte: Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Medulla: keine Renin-bildenden interstitiellen Zellen (bis auf vereinzelte Ausnahmen)

C. PDGFR β Ren WT Adenin: links: Gesamtniere, Mitte: Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Medulla: interstitielles Renin mRNA Signal: starke Zunahme der Renin-bildenden interstitiellen Zellen unter Adeninnephropathie

D. PDGFR β Ren KO Adenin: links: Gesamtniere, Mitte: Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Medulla: keine Renin-bildenden interstitiellen Zellen (bis auf vereinzelte Ausnahmen)

Die quantitativen Unterschiede der renalen Renin mRNA zwischen den beiden Genotypen wurden mithilfe einer qPCR bestimmt. Dafür wurden die Nieren der Kontroll- und Adenin-behandelten-Tiere in Cortex, Medulla und Papille zoniert. Die PDGFR β Ren KO Kontrolltiere weisen geringere Renin mRNA Konzentrationen im Cortex und der Medulla auf als die PDGFR β Ren WT Kontrolltiere (Abbildung 20 A, B). In der Papille ist ein deutlicher Trend zur geringeren Renin mRNA Konzentration der PDGFR β Ren KO Kontrolltiere erkennbar (Abbildung 20 C). Unter einer Adeninnephropathie nimmt die Renin mRNA Konzentration im Cortex bei PDGFR β Ren WT Mäusen (tendenziell) und bei PDGFR β Ren KO Mäusen (signifikant) im Vergleich zu Kontrolltieren ab (Abbildung 20 A). Da im Cortex hauptsächlich juxtapaglomeruläre Zellen Renin produzieren [8,191], könnte man durch diese Ergebnisse darauf schließen, dass unter einer Adeninnephropathie möglicherweise die Renin-Produktion aus den juxtapaglomerulären Zellen abnimmt. Auf den Nierenschnitten zeigt das juxtapaglomeruläre Renin mRNA-Signal, das mithilfe des RNA-Scopes gefärbt wurde, keinen Unterschied zwischen Behandlung und Kontrolle (siehe Abbildung 19). Der Grund, warum auf den mit RNA-Scope gefärbten Schnitten kein Unterschied zu erkennen ist, könnte die starke Färbung der juxtapaglomerulären Renin mRNA sein, die es nicht möglich macht, feine Unterschiede in der Renin mRNA Konzentration zu erkennen. Die qPCR-Daten zeigen, dass bei PDGFR β Ren WT Tieren die Renin mRNA Konzentration in der Medulla durch die Adeninbehandlung abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigen die RNA Scope-Befunde (siehe Abbildung 19 C) deutlich, dass die Renin-Expression in der Medulla bei den PDGFR β Ren WT Adenin Mäusen zunimmt. Diese Diskrepanz deutet möglicherweise auf einen Fehler beim Zonieren der Nieren hin, bei dem die Medulla fälschlicherweise mit Teilen des Cortex verunreinigt sein könnte. Bei den PDGFR β Ren KO Tieren zeigt sich bei der qPCR eine Zunahme der Renin mRNA Konzentration in der Medulla unter einer Adeninnephropathie (Abbildung 20 B). Dies wirft weitere Fragen auf. Der Anstieg der Renin mRNA Konzentration in der Medulla könnte auf Verunreinigungen durch kortikale Bereiche in der Niere zurückzuführen sein. Betrachtet man die Papille der PDGFR β Ren WT Mäuse, kann man erkennen, dass die Renin mRNA Konzentrationen dort unter Schädigungsbedingungen ansteigt (Abbildung 20 C). Diese Ergebnisse spiegeln die Befunde des RNA Scopes wider. Beim Zonieren der Papille kann ausgeschlossen werden, dass diese mit Teilen des Cortex verunreinigt wurde. Daher könnten die qPCR-Daten der Papille die genauesten

Ergebnisse bezüglich der Renin mRNA außerhalb des Cortex liefern. Kongruent mit den Ergebnissen aus dem RNA-Scope kann man bei den PDGFR β Ren KO Tieren keinen Anstieg der Renin mRNA Konzentration in der inneren Medulla feststellen.

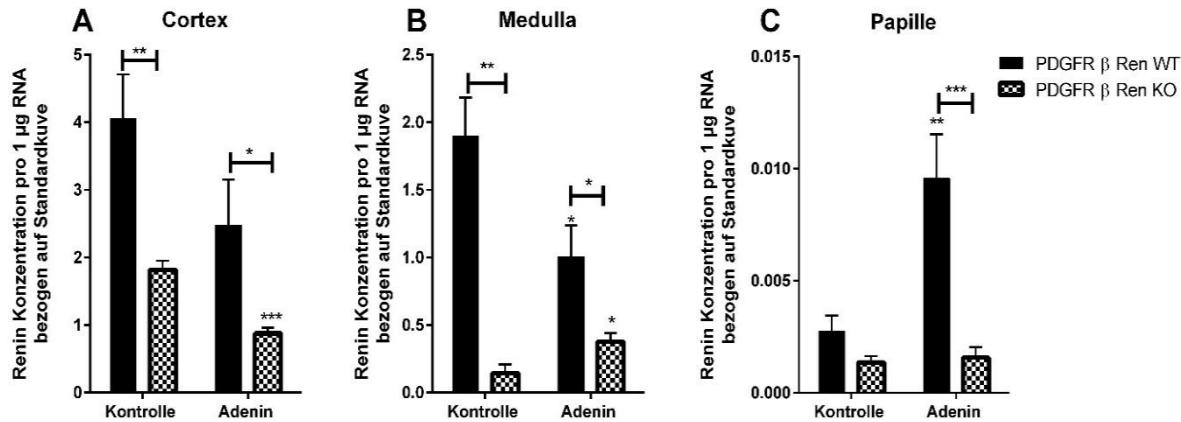


Abbildung 20 qPCR Renin mRNA, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $4,06 \pm 0,65$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $1,82 \pm 0,13$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $2,48 \pm 0,67$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,88 \pm 0,08$

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $1,90 \pm 0,28$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $0,14 \pm 0,07$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $1,01 \pm 0,23$, PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,38 \pm 0,06$

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,0028 \pm 0,0007$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $0,0014 \pm 0,0003$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $0,0096 \pm 0,0020$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,0016 \pm 0,0005$

Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.4 Untersuchung von juxtaglomerulärem (Pro)-Renin (Protein) bei einer Adeninnephropathie

Um die Unterschiede hinsichtlich juxtaglomerulären Renins zwischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter einer Adeninnephropathie zu erfassen, wurde auf Nierenschnitten dieser Tiere eine Renin-Immunfluoreszenzfärbung angefertigt (siehe Abb. 21 B und C). Um die Anzahl der Glomeruli auf einem Nierenschnitt zu berücksichtigen, wurde die Fläche des Renin-Signals pro Glomerulus berechnet. Überraschenderweise zeigt sich bereits unter Kontrollbedingungen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Renin Signals am Glomerulus zwischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen (vgl. Abbildung 21 A). PDGFR β -Zellen wurden nicht nur in der Medulla, sondern auch im Cortex in den perivaskulären Reninzellfeldern des juxtaglomerulären Apparats identifiziert [187]. Inwieweit die Renin-Produktion dieser Zellen mit der Renin-Sekretion, die aus den „klassischen“ juxtaglomerulären Zellen hervorgeht, zusammenhängt, ist noch völlig unklar. Die Auswertung zeigt außerdem, dass die Fläche der Renin-Färbung am juxtaglomerulären

Apparat unter einer Adeninnephropathie bei beiden Genotypen signifikant abnimmt. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass unter einer Adeninnephropathie möglicherweise die Renin mRNA Produktion in den juxtaglomerulären Zellen abnimmt.

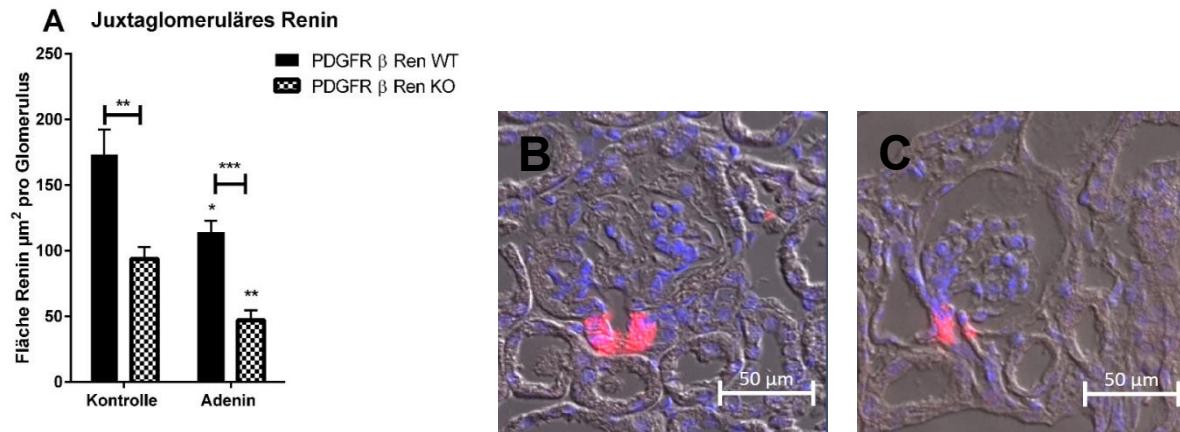


Abbildung 21 Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung von Renin, Maßstab Balken 50 μm

A. Auswertung des Renin-Signals am Glomerulus:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $173,1 \pm 18,99 \mu\text{m}^2$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $93,61 \pm 9,26 \mu\text{m}^2$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $114,2 \pm 8,71 \mu\text{m}^2$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin: $46,94 \pm 7,74 \mu\text{m}^2$

Signifikanzniveau* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

B. PDGFR β Ren WT Kontrolle, Ausschnitt Cortex, Renin (rot), DAPI (blau)

C. PDGFR β Ren WT Adenin, Ausschnitt Cortex, Renin (rot), DAPI (blau)

4.3.5 Untersuchung der Renin mRNA bei einer diabetischen Nephropathie

Wie in Abbildung 22 C deutlich zu sehen ist, zeigt sich bei PDGFR β Ren WT Mäusen unter einer diabetischen Nephropathie eine Zunahme des interstitiellen Renin-Signals im Vergleich zu den Tieren unter Kontrollbedingungen. Die PDGFR β Ren KO Mäuse besitzen unter Kontrollbedingungen kaum Renin-bildende interstitielle Zellen (siehe Abb. 19 B). Auch unter einer diabetischen Nephropathie kommt es bei diesen Mäusen nicht zu einem Anstieg des interstitiellen Renin Signals (vgl. Abb. 22 D). Im Gegensatz zur Adenin-induzierten Nephropathie, kann man auf den Nierenschnitten der Diabetes-Mäuse auch Renin mRNA erkennen, die von Tubuluszellen produziert wird. Sowohl in der PDGFR β Ren WT STZ, als auch in der PDGFR β Ren KO STZ Maus, kann in der Medulla Renin mRNA nachgewiesen werden, die aus Tubuluszellen stammt (siehe Abbildung 22 C und D). Mithilfe der qPCR wurde bei den STZ und Kontroll- Tieren die Renin mRNA in Cortex, Medulla und Papille gemessen. Dabei ist ersichtlich, dass die PDGFR β Ren KO Kontrolltiere tendenziell geringere Mengen an Renin mRNA Konzentration aufweisen als die PDGFR β Ren WT Kontrolltiere. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des RNA-Sscopes zeigt sich bei beiden Genotypen unter der STZ-Behandlung kein Anstieg der Renin mRNA Konzentration in der Medulla (siehe Abbildung 23 B). Diese Diskrepanz könnte auf Verunreinigungen bei der Zonierung durch kortikale und medulläre Bereiche in der Niere zurückzuführen sein. Bei der Renin-Expression in der Papille fällt auf, dass der

Fehlerbalken bei den PDGFR β Ren WT Kontrolltieren sehr groß ist. Möglicherweise wurde bei der Zonierung der Papille fälschlicherweise Stücke der Medulla mit einbezogen. Daher ist es wichtig, bei nachfolgenden qPCR-Analysen diese Verunreinigungen im Hinterkopf zu behalten.

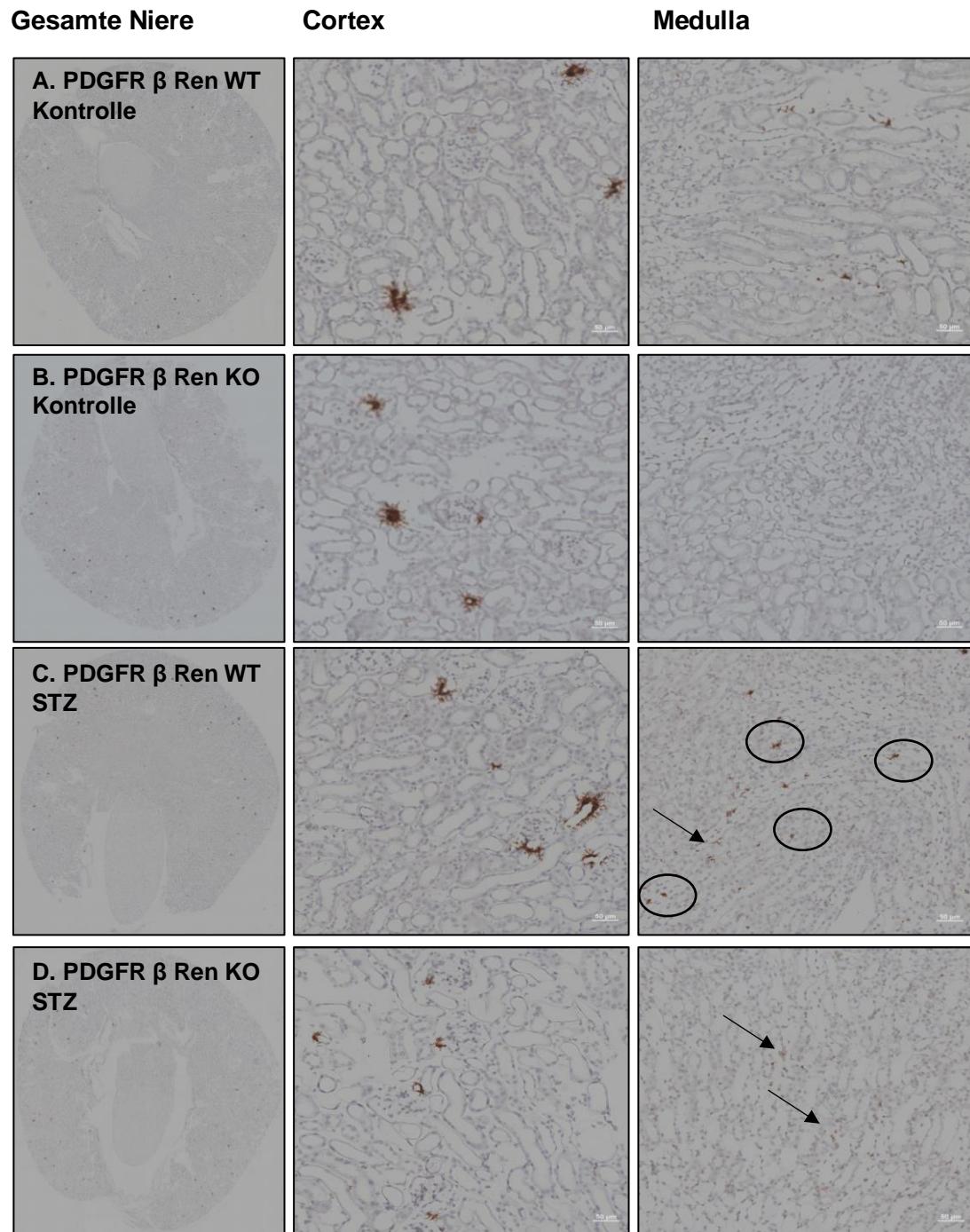


Abbildung 22 ISH Renin mRNA (braun), Maßstabbalken 50 μ m, STZ

- A. PDGFR β Ren WT Kontrolle:** links: Gesamtniere, Mitte: Ausschnitt Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin mRNA Signal: einige, wenige Zellen exprimieren Renin
- B. PDGFR β Ren KO Kontrolle:** links: Gesamtniere, Mitte: Ausschnitt Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Ausschnitt Medulla: keine Renin-bildende interstitielle Zellen (bis auf vereinzelte Ausnahmen)
- C. PDGFR β Ren WT STZ:** links: Gesamtniere, Mitte: Ausschnitt Cortex: juxtapaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin mRNA Signal: starke Zunahme der Renin-bildenden interstitiellen Zellen (Kreise) und tubuläres Reninsignal (Pfeile) unter einer diabetischen Nephropathie

D. PDGFR β Ren STZ: links: Gesamtniere, Mitte: Ausschnitt Cortex: juxtaglomeruläres Renin mRNA Signal, rechts: Ausschnitt Medulla: keine Renin-bildende interstitielle Zellen (bis auf vereinzelte Ausnahmen) und tubuläres Renin (Pfeile) unter einer diabetischen Nephropathie

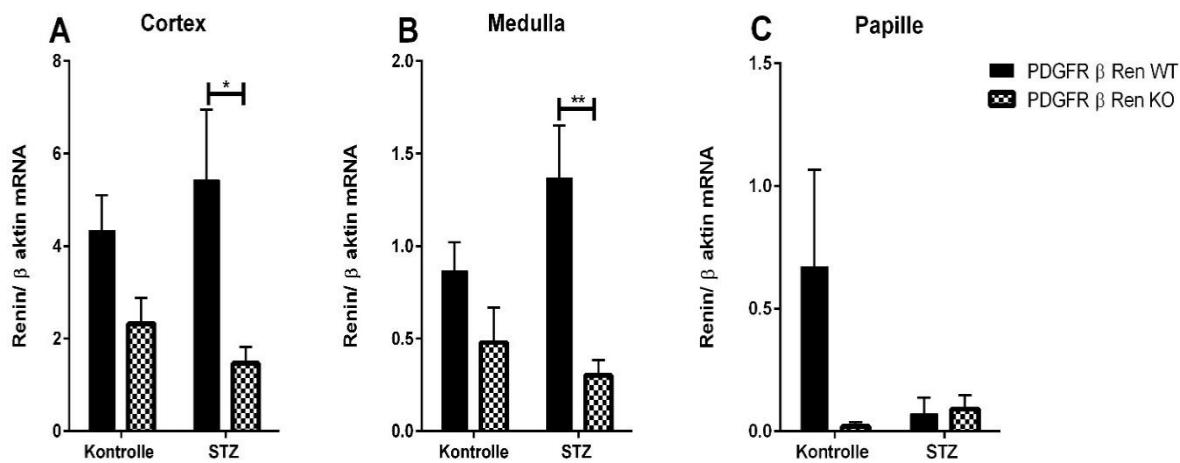


Abbildung 23 qPCR Renin mRNA in Bezug auf β aktin: Cortex, Medulla und Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $4,34 \pm 0,77$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $2,32 \pm 0,56$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $5,43 \pm 1,52$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $1,47 \pm 0,36$
 Signifikanzniveau: * $p < 0,05$,

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,867 \pm 0,153$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,478 \pm 0,190$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $1,370 \pm 0,280$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $0,303 \pm 0,082$
 Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,672 \pm 0,395$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,021 \pm 0,018$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $0,072 \pm 0,065$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $0,091 \pm 0,058$

4.3.6 Aktives Renin und Prorenin im Plasma unter Schädigungsbedingungen

Die Deletion des Reningens in PDGFR β -Zellen hat offensichtlich Auswirkungen auf die Renin und Prorenin Konzentration im Plasma und nimmt dadurch Einfluss auf das systemische RAAS (vgl. 4.2.3). Um den systemischen Einfluss unter Bedingungen einer Nierenschädigung zu bestimmen, wurden die Renin-/Prorenin-Konzentrationen im Plasma der beiden Genotypen gemessen. Unter einer Adeninnephropathie zeigt sich im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen ein Rückgang der Renin-Konzentration im Plasma der Tiere (bei PDGFR β Ren WT Mäusen Trend; bei PDGFR β Ren KO Mäusen statistisch signifikant (vergleiche Abbildung 24 A)). Bei der Betrachtung der Prorenin-Konzentration im Plasma zeigt sich jedoch eine interessante Beobachtung: Bei den mit Adenin behandelten PDGFR β Ren WT Mäusen ist ein etwa 3-facher Anstieg der Prorenin-Konzentration zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu bleibt bei den PDGFR β Ren KO Mäusen die Prorenin-Konzentration unverändert und auf dem Ausgangsniveau (siehe Abbildung 24 B). Durch den fehlenden Anstieg der Prorenin-Konzentration bei den PDGFR β Ren KO Mäusen lässt sich schlussfolgern, dass unter einer Adeninnephropathie der Renin mRNA Anstieg aus den medullären PDGFR β -Zellen der PDGFR β Ren WT Mäuse hauptsächlich zum Prorenin-Anstieg im Plasma der PDGFR β Ren WT Mäuse beiträgt.

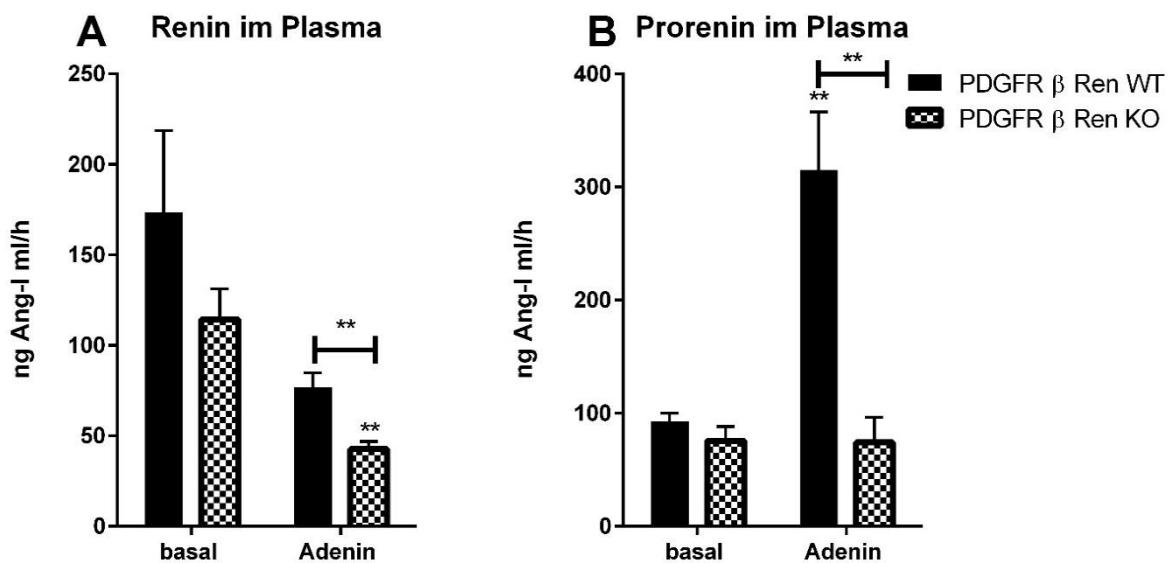


Abbildung 24 Renin und Prorenin-Konzentration im Plasma: Adenin

A. Renin-Konzentration im Plasma:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $173,4 \pm 45,28$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=7): $114,5 \pm 16,79$ ng ANG-I ml/h;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $76,74 \pm 8,07$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=7): $42,70 \pm 4,07$ ng ANG-I ml/h; Signifikanzniveau: ** p < 0,01

B. Prorenin-Konzentration im Plasma:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $92,44 \pm 7,45$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=5): $75,55 \pm 12,75$ ng ANG-I ml/h;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $314,8 \pm 51,38$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=5): $74,16 \pm 22,16$ ng ANG-I ml/h Signifikanzniveau: * p < 0,05, ** p < 0,01

Bei einer diabetischen Nephropathie zeigt sich wie bei einer Adeninnephropathie, eine Abnahme der Renin-Konzentration im Plasma bei beiden Genotypen (vgl. Abbildung 25 A). Der Anstieg der Renin mRNA aus den medullären interstitiellen Zellen (vgl. Abbildung 22 C) könnte sich erneut durch den Anstieg des Prorenins im Plasma der PDGFR β Ren WT STZ Mäuse bemerkbar machen (siehe Abb. 25 B). Im Vergleich zur basalen Prorenin-Konzentration steigt Prorenin im Plasma der PDGFR β Ren WT Mäuse unter diabetischer Nephropathie auf etwa das Zweifache an. Im Gegensatz zur Adenin-induzierten Nephropathie, führt die diabetische Nephropathie bei den PDGFR β Ren KO Mäusen auch zu einem Anstieg der Plasma Prorenin-Konzentration. Dieser etwa 3-fache Prorenin-Anstieg im Plasma der PDGFR β Ren KO Mäuse könnte auf das tubulär produzierte Renin zurückzuführen sein [142]. Sicherlich könnte auch bei den PDGFR β Ren WT Mäusen das Tubulus Renin zum Anstieg des Prorenins im Plasma dieser Tiere beigetragen haben.

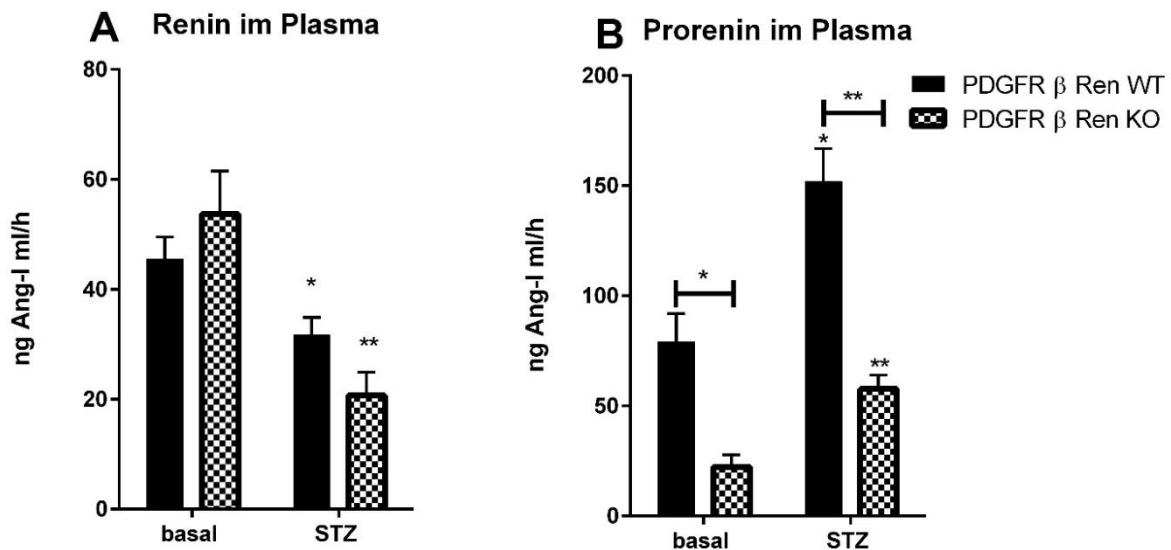


Abbildung 25 Renin und Prorenin-Konzentration im Plasma: STZ

A. Renin-Konzentration im Plasma:

PDGFR β Ren WT basal (n=6): $45,53 \pm 4,01$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $53,69 \pm 7,79$ ng ANG-I ml/h;

PDGFR β Ren WT STZ (n=6): $31,28 \pm 3,67$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $20,67 \pm 4,25$ ng ANG-I ml/h; Signifikanzniveau: * p < 0,05; ** p < 0,01

B. Prorenin-Konzentration im Plasma:

PDGFR β Ren WT basal (n=6): $79,26 \pm 12,62$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $22,34 \pm 5,43$ ng ANG-I ml/h;

PDGFR β Ren WT STZ (n=6): $152,0 \pm 14,79$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $57,62 \pm 6,32$ ng ANG-I ml/h; Signifikanzniveau: * p < 0,05; ** p < 0,01

4.3.7 Urin: Osmolarität und Elektrolytkonzentration

Eine durch Adenin verursachte Nephropathie geht mit einer ausgeprägten Diurese einher. Beide Genotypen zeigen eine ähnliche Verringerung der Harnosmolarität unter einer Adeninnephropathie (siehe Abbildung 26 A). In Bezug auf die Elektrolytkonzentration im Urin (in Relation zum Kreatininwert) ist weder unter Schädigungsbedingungen noch unter Kontrollbedingungen ein Unterschied der Natrium- und Kaliumausscheidung im Urin zu erkennen. Entgegen den Erwartungen und den Ergebnissen, die oben in Abbildung 13 C gezeigt werden, weisen die PDGFR β Ren KO Mäuse in diesem Versuchsteil unter Kontrollbedingungen keine signifikant höhere Natriumausscheidung auf als die PDGFR β Ren WT Mäuse. Dieser Unterschied könnte durch die starke Abhängigkeit der Natriumausscheidung von der Tageszeit und das damit gekoppelte Trink- und Essverhalten der Mäuse erklärt werden. In Abbildung 13 C werden knapp 60 Tiere miteinander verglichen, hier in Abbildung 26 sind es lediglich 14 Tiere. Womöglich stellt Abbildung 13 die aussagekräftigeren Ergebnisse dar.

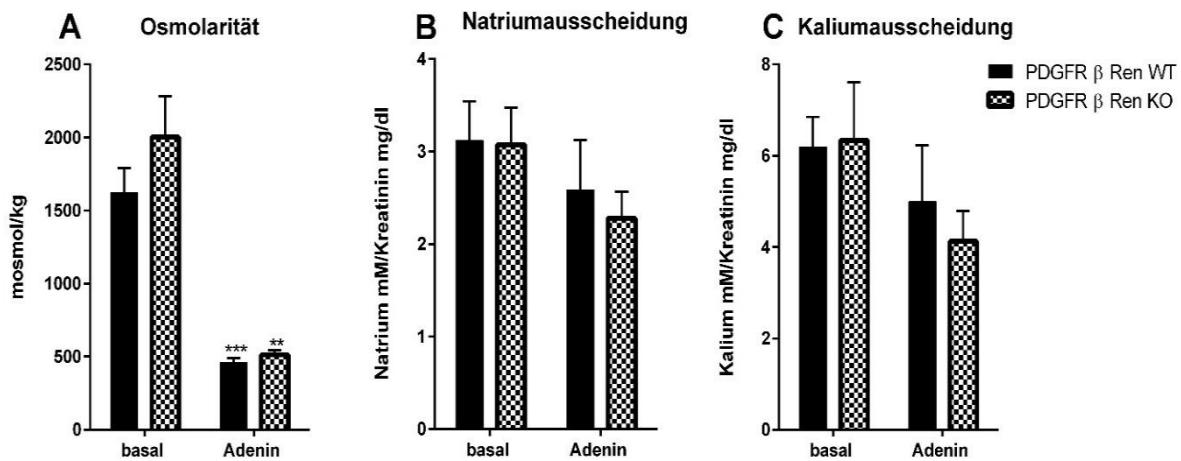


Abbildung 26 Osmolarität und Elektrolytkonzentration, Adenin

A. Osmolarität:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $1626 \pm 165,9$ mosmol/kg vs. PDGFR β Ren KO basal (n=8): $2003 \pm 281,2$ mosmol/kg; PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $462,9 \pm 25,8$ mosmol/kg PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $512,5 \pm 31,7$ mosmol/kg

Signifikanzniveau: ** p < 0,01; *** p < 0,001

B. Natriumkonzentration im Urin:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $3,12 \pm 0,42$ mM Na/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO basal (n=7): $3,07 \pm 0,40$ mM Na/mg /dl Krea;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $2,59 \pm 0,54$ mM Na/mg /dl Krea, vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=7): $2,28 \pm 0,29$ mM Na/mg /dl Krea

C. Kaliumkonzentration im Urin:

PDGFR β Ren WT basal (n=8): $6,20 \pm 0,65$ mM K/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO basal (n=8): $6,34 \pm 1,27$ mM K/mg /dl Krea;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $4,13 \pm 0,66$ mM K/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $4,50 \pm 1,23$ mM K/mg /dl Krea

Unter einer diabetischen Nephropathie steigt wie bei der Adeninnephropathie die Diurese der Tiere, dadurch sinkt die Osmolarität im Urin der PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse. Diesbezüglich gibt es keine Unterschiede zwischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse (siehe Abb. 27 A). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Natrium- bzw. Kaliumausscheidung im Urin unter diabetischen Zuständen bei beiden Genotypen nicht verändert. Lediglich die Kaliumausscheidung unter basalen Bedingungen ist bei den PDGFR β Ren KO Mäusen signifikant geringer als bei den PDGFR β Ren WT Mäusen (vgl. Abb. 27 C). Bemerkenswert ist, dass die basale Kaliumkonzentration im Urin der PDGFR β Ren WT Mäuse in Abbildung 27 C im Vergleich zur Kaliumausscheidung in Abbildung 13 C vergleichsweise hoch ist. Dies könnte möglicherweise die signifikanten Unterschiede bei den Genotypen in der Kaliumausscheidung unter Basalbedingungen in Abbildung 27 C erklären. Auch hier sollte den Ergebnissen in Abbildung 13 C mehr Vertrauen geschenkt werden, da dort eine größere Anzahl von Tieren miteinander verglichen wurde.

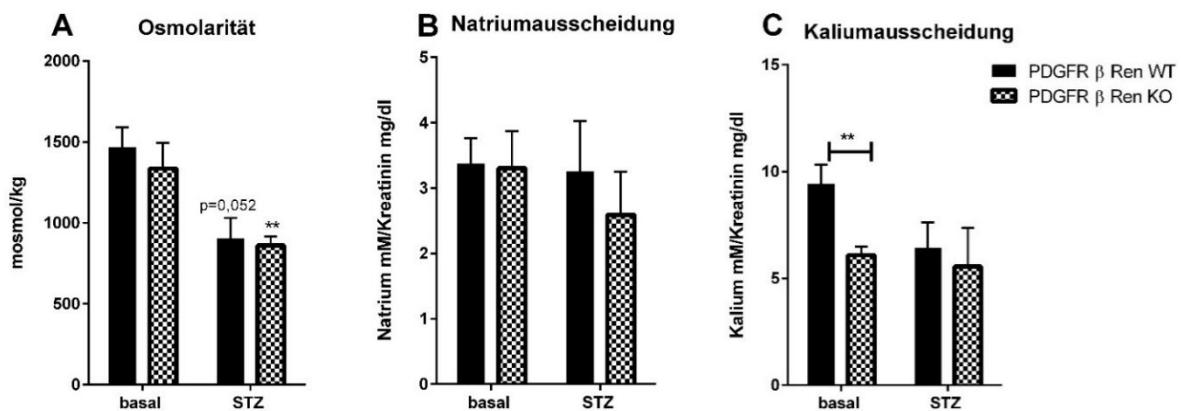


Abbildung 27 Osmolarität und Elektrolytkonzentration, STZ

A. Osmolarität:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $1467 \pm 124,4$ mosmol/kg vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $1335 \pm 158,3$ mosmol/kg; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $902,9 \pm 126,6$ mosmol/kg vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $860,0 \pm 56,86$ mosmol/kg;

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

B. Natriumkonzentration im Urin:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $3,37 \pm 0,40$ mM Na/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $3,26 \pm 0,57$ mM Na/mg /dl Krea

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $3,30 \pm 0,77$ mM Na/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $2,59 \pm 0,65$ mM Na/mg /dl Krea

C. Kaliumkonzentration im Urin:

PDGFR β Ren WT basal (n=7): $9,41 \pm 0,90$ mM K/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO basal (n=6): $6,082 \pm 0,4129$ mM K/mg /dl Krea;

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $6,42 \pm 1,20$ mM K/mg /dl Krea vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $5,555 \pm 1,799$ mM K/mg /dl Krea; Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$

4.3.8 Renin-Konzentration im Urin

Um die Unterschiede in der Renin-Exkretion zwischen den beiden Genotypen zu analysieren, wurde die Renin-Aktivität im Urin mittels ANG-I ELISAs gemessen. Die Renin-Konzentration im Urin könnte Rückschlüsse auf die Renin-Produktion der Tubuluszellen liefern, die bei einer diabetischen Nephropathie verstärkt auftritt [142]. Während die Renin-Konzentration im Urin bei Kontrolltieren gering ausfällt, kann bei den STZ-Tieren ein Anstieg verzeichnet werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl die PDGFR β Ren KO Tiere unter Kontrollbedingungen als auch unter STZ-Bedingungen verglichen mit PDGFR β Ren WT Mäusen eine erhöhte Renin-Aktivität im Urin aufweisen. Es war kein Prorenin im Urin nachweisbar. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass Prorenin durch Proteasen im Tubuluslumen zu aktivem Renin gespalten wird [192]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass aktives Renin im Urin zum Teil aus Prorenin hervorgeht. Da bei der Adenin-Nephropathie kein Anstieg des tubulären Renins beobachtet wurde und daher davon ausgegangen werden kann, dass die Renin-Konzentration im Urin der Adenin-Tiere nicht ansteigt, wurde die Renin-Konzentration im Urin nur bei den STZ-Tieren gemessen.

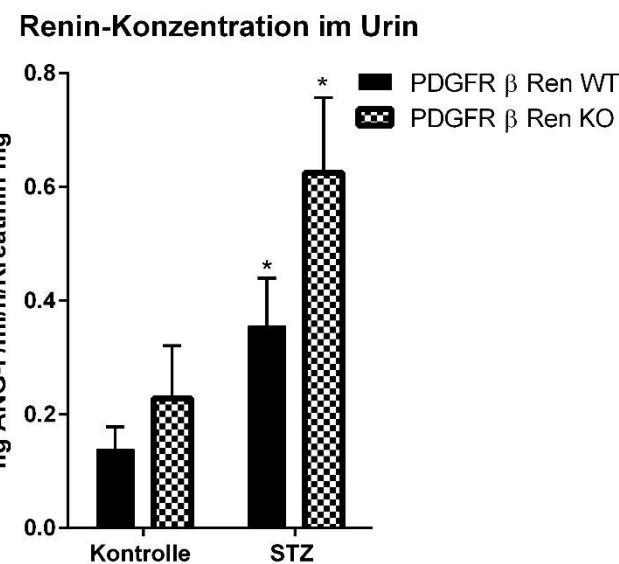


Abbildung 28 Renin-Konzentration im Urin

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,138 \pm 0,039$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,228 \pm 0,093$ ng ANG-I ml/h;

PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $0,355 \pm 0,084$ ng ANG-I ml/h vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $0,625 \pm 0,132$ ng ANG-I ml/h; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

4.3.9 Pathologische Unterschiede der PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse unter Kontroll- und Schädigungsbedingungen

4.3.9.1 Albuminausscheidung im Urin

Die Ausscheidung von Albumin im Urin ist ein bedeutendes Merkmal chronischer Nierenerkrankungen. Sie kann auf eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere hinweisen. Podozyten spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Der zugrundeliegende Mechanismus der Proteinurie besteht darin, dass die glomeruläre Filtrationsbarriere in der Niere aufgrund von Podozytenschädigungen nicht mehr intakt ist [193].

Die Adenin-behandelten PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse weisen lediglich eine leichte Albuminurie auf (siehe Abb. 29 A). Dies liegt daran, dass die Adenin-induzierte Nephropathie hauptsächlich eine tubulointerstitielle Nierenschädigung verursacht, bei der die Podozyten weniger stark betroffen sind [194]. Zwischen den beiden Genotypen gibt es weder unter Kontrollbedingungen noch unter einer Adenin-Behandlung signifikante Unterschiede hinsichtlich der Albuminausscheidung. Die diabetische Nephropathie ist dafür bekannt, dass sie Podozytenschäden verursacht, die später zur Albuminurie führen [195]. Die diabetische Nephropathie führt bei unseren Versuchstieren lediglich zu einer milden Albuminurie, die allerdings etwas stärker als bei Adeninnephropathie ist (vgl. Abb. 29 A und B). In Bezug auf die

Albuminkonzentration im Urin ist kein Unterschied zwischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse zu erkennen.

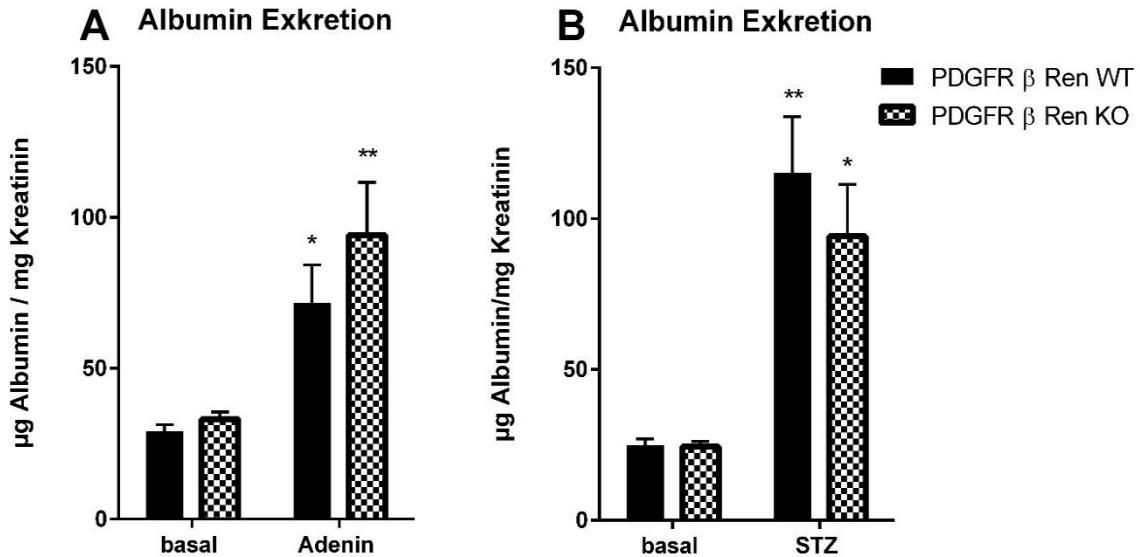


Abbildung 29 Albuminausscheidung im Urin

A. PDGFR β Ren WT basal: $29,02 \pm 2,30 \mu\text{g Alb/mg Krea}$ vs. PDGFR β Ren KO basal: $33,17 \pm 2,39 \mu\text{g Alb/mg Krea}$;

PDGFR β Ren WT Adenin: $71,52 \pm 12,70 \mu\text{g Alb/mg Krea}$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin: $94,02 \pm 17,55 \mu\text{g Alb/mg Krea}$;

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

B. PDGFR β Ren WT basal: $24,76 \pm 2,23 \mu\text{g Alb/mg Krea}$ vs. PDGFR β Ren KO basal: $24,33 \pm 1,83 \mu\text{g Alb/mg Krea}$;

PDGFR β Ren WT STZ: $115,2 \pm 18,56 \mu\text{g Alb/mg Krea}$ vs. PDGFR β Ren KO STZ: $94,14 \pm 17,22 \mu\text{g Alb/mg Krea}$;

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.9.2 Renale Fibronectin, Kollagen I und III, F4/80 Expression

Mittels qPCR wurde die Konzentration von Fibronectin mRNA in der Niere bestimmt. Fibronectin ist eine Komponente der extrazellulären Matrix, die bei Fibrose vermehrt gebildet wird [196]. Bei einer Adeninnephropathie kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Fibronectin mRNA in allen Bereichen der Niere (Cortex, Medulla, Papille) (siehe Abbildung 30). Während die PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Kontrolltiere keinen Unterschied hinsichtlich Fibronectin mRNA aufweisen, haben PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse niedrigere Fibronectin mRNA Konzentrationen im Cortex und in der Medulla als PDGFR β Ren WT Adenin Tiere (vgl. Abb. 30 A und B). In der Papille ist einen Trend zur geringeren Fibronectin mRNA Konzentration bei PDGFR β Ren KO Tieren erkennbar (vgl. Abb. 30 C).

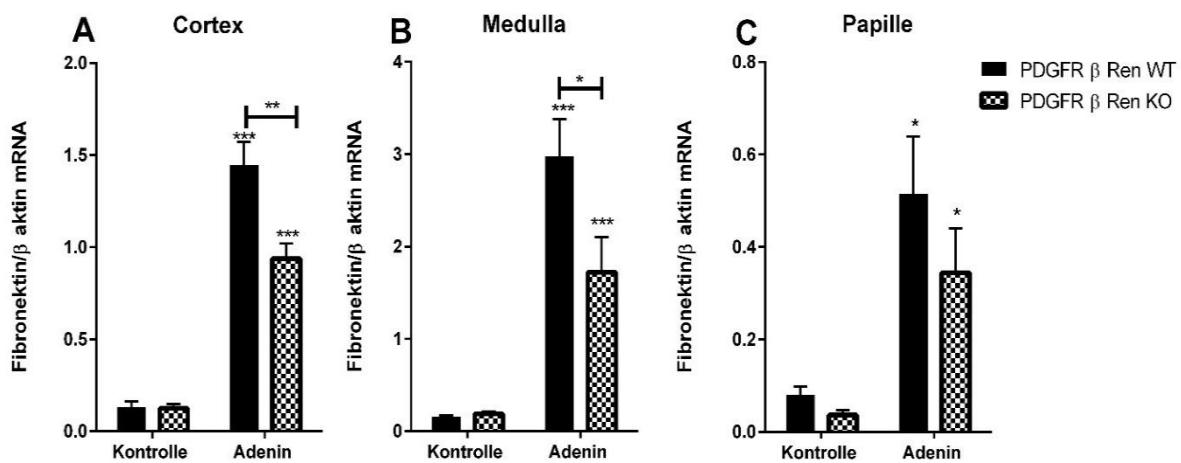


Abbildung 30 Adenintiere: qPCR Fibronectin mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,132 \pm 0,029$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,124 \pm 0,023$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $1,446 \pm 0,124$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,937 \pm 0,082$; Signifikanzniveau ** p<0,01; *** p<0,001

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,153 \pm 0,015$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,189 \pm 0,024$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $2,978 \pm 0,401$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $1,722 \pm 0,379$; Signifikanzniveau * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,080 \pm 0,017$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=6): $0,036 \pm 0,010$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,514 \pm 0,1251$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,344 \pm 0,096$; Signifikanzniveau: * p < 0,05

Analog dazu wurde die Fibronectin mRNA Konzentration bei diabetischen Mäusen gemessen. Im kortikalen Bereich der Niere weisen die STZ Tiere höhere Fibronectin mRNA Konzentrationen auf, als die Kontrolltiere (siehe Abb. 31 A). In der Medulla zeigen die STZ Mäuse tendenziell höhere Fibronectin mRNA Konzentrationen. In der Papille ist kein Unterschied zwischen STZ und Kontrolltieren in Bezug auf die Fibronectin mRNA erkennbar. Diese Daten deuten darauf hin, dass die STZ Mäuse vor allem im Cortex einen Fibronectin mRNA Anstieg aufweisen. Im Gegensatz zum Schädigungsmodell der Adeninnephropathie weisen die PDGFR β Ren KO Mäuse unter diabetischer Nephropathie keine geringeren Fibronectin mRNA Konzentrationen in der Niere auf als die PDGFR β Ren WT STZ Mäuse.

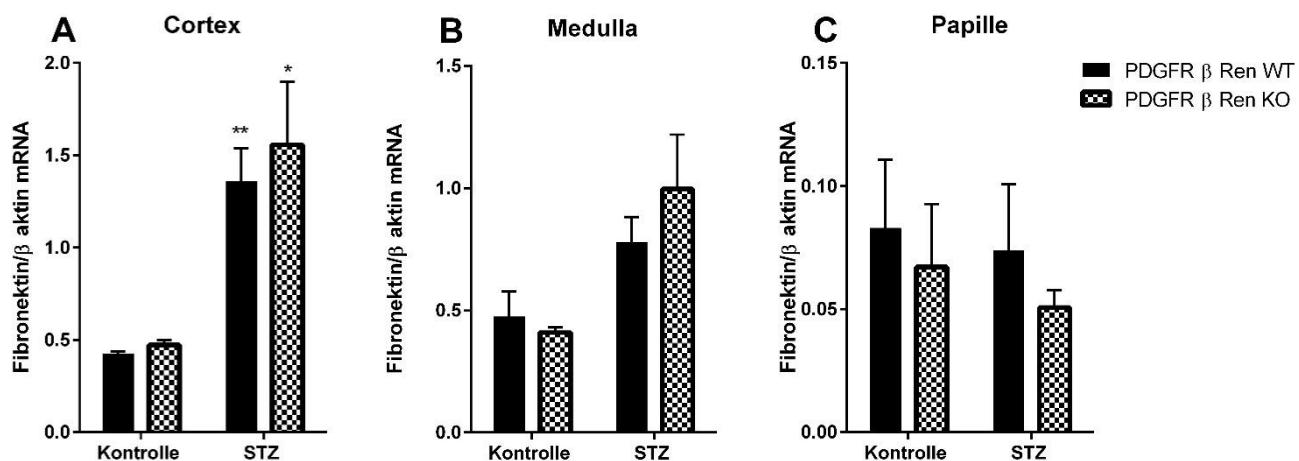


Abbildung 31 STZ-Tiere qPCR Fibronectin mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,426 \pm 0,012$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=4): $0,471 \pm 0,027$; PDGFR β Ren WT STZ (n=6): $1,358 \pm 0,178$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=5): $1,557 \pm 0,341$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,475 \pm 0,103$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=4): $0,409 \pm 0,020$; PDGFR β Ren WT STZ (n=6): $0,779 \pm 0,101$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $0,997 \pm 0,223$

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=4): $0,083 \pm 0,028$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,067 \pm 0,026$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $0,074 \pm 0,027$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=4): $0,051 \pm 0,007$

Da keine Unterschiede hinsichtlich der Fibronectin mRNA Konzentration zwischen den diabetischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen festgestellt wurden, wurde angenommen, dass in diesem Schädigungsmodell auch keine histologischen Unterschiede erkennbar sind. Daher konzentrieren sich die histologischen Untersuchungen auf das Schädigungsmodell der Adeninnephropathie.

Die qPCR-Daten zeigen, dass PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse höhere Fibronectin und F4/80 mRNA Konzentrationen aufweisen als PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse (vgl. Abbildung 30 und 36). Um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbung auf Nierenschnitten durchgeführt. Die Fläche mit Fibronektinfärbung nimmt unter der Adeninnephropathie deutlich zu. Wenn man den Anteil der Fibronectin Färbung auf dem Nierenschnitt betrachtet, ist zu erkennen, dass die PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse tendenziell weniger Fibronectin aufweisen als die PDGFR β Ren WT Mäuse (siehe Abb. 32 A).

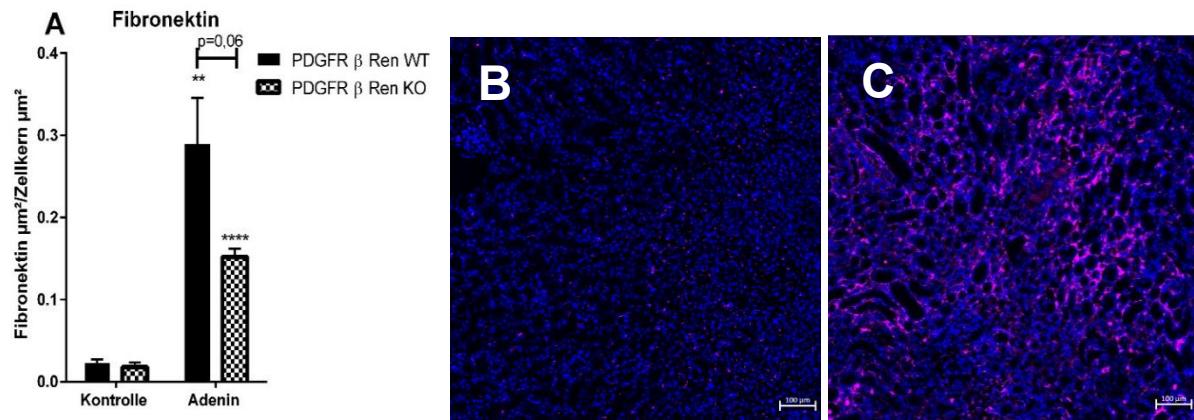


Abbildung 32 Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung von Fibronektin (violett), DAPI (blau) Maßstab Balken 100 μm

A. Auswertung Fibronektin Fläche /DAPI Fläche,

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,022 \pm 0,005$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,018 \pm 0,006$;

PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,289 \pm 0,056$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=6): $0,152 \pm 0,010$

Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

B. PDGFR β Ren WT Kontrolle, Immunofluoreszenzfärbung Fibronektin

C. PDGFR β Ren WT Adenin, Immunofluoreszenzfärbung Fibronektin

Fibrose ist charakterisiert durch die pathologische Produktion und Ansammlung von extrazellulärer Matrix (ECM) im Niereninterstitium. Dabei stellen Kollagen Typ I und III neben Fibronektin die Hauptbestandteile der ECM in fibrotischen Nieren dar [197]. Wie bereits in Abbildung 30 gezeigt wurde, weisen PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse niedrigere mRNA Konzentrationen von Fibronektin auf als PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse. Um festzustellen, ob auch Kollagen I und III in den Nieren der PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse geringer exprimiert werden, wurden an den Adenintieren qPCR Messungen von Kollagen I und III durchgeführt. Sowohl die Kollagen I mRNA Konzentration als auch die Kollagen III mRNA Konzentration steigt in der Niere unter einer Adeninnephropathie. In der Medulla der PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse erkennt man einen starken Trend zu geringeren Kollagen I mRNA Konzentrationen, im Vergleich zu den der PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse (siehe Abbildung 33 B). Generell weisen die PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse tendenziell geringere Kollagen I und III mRNA Konzentrationen in allen Bereichen der Niere auf als die PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse. Allerdings gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied (vergleiche Abbildung 33 und 34).

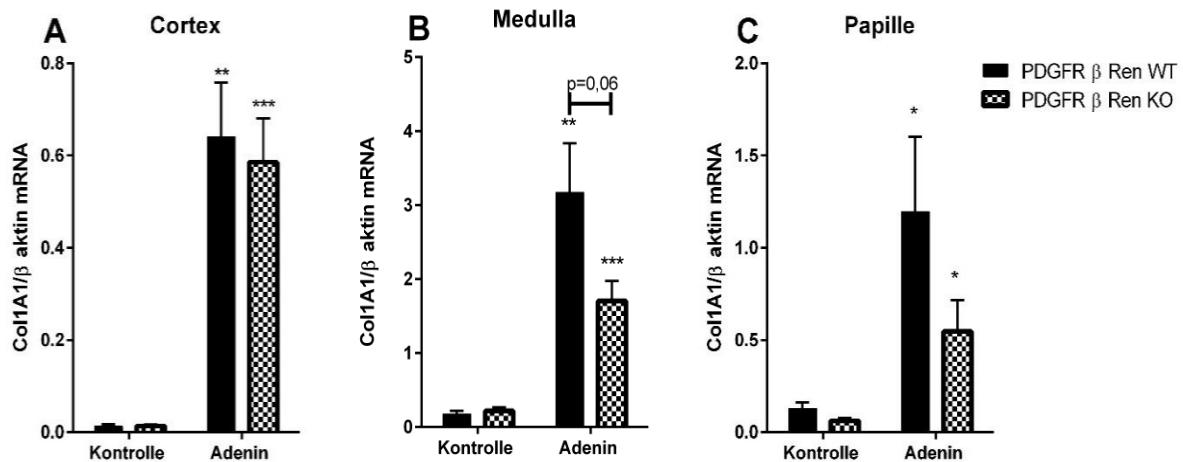


Abbildung 33 Adenintiere: qPCR Col1A1 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=4): $0,014 \pm 0,004$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $0,013 \pm 0,003$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,641 \pm 0,117$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=7): $0,586 \pm 0,094$; Signifikanzniveau ** p < 0,01; *** p < 0,001

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,180 \pm 0,038$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,220 \pm 0,049$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $3,175 \pm 0,661$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $1,703 \pm 0,271$; Signifikanzniveau * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,130 \pm 0,031$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=6): $0,062 \pm 0,017$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $1,198 \pm 0,405$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=6): $0,547 \pm 0,168$; Signifikanzniveau: * p < 0,05

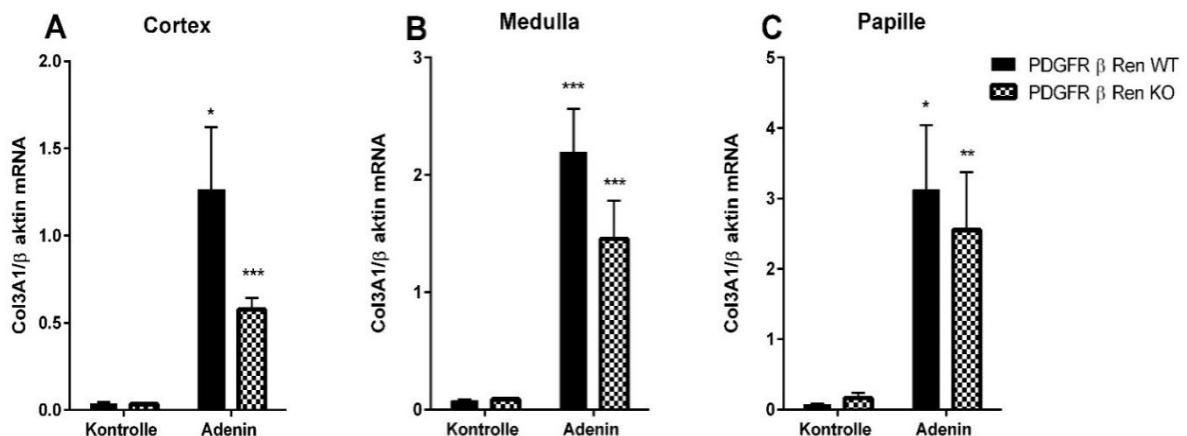


Abbildung 34 Adenintiere: qPCR Col3A1 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,038 \pm 0,009$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,034 \pm 0,007$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $1,265 \pm 0,357$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,576 \pm 0,066$; Signifikanzniveau * p < 0,05; *** p < 0,001

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,077 \pm 0,010$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $0,087 \pm 0,007$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $2,196 \pm 0,367$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $1,456 \pm 0,324$; Signifikanzniveau *** p < 0,001

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,077 \pm 0,007$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=7): $0,166 \pm 0,075$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $3,124 \pm 0,919$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $2,551 \pm 0,822$; Signifikanzniveau: * p < 0,05; ** p < 0,01

Bei den diabetischen Versuchstieren zeigen sich in Bezug auf Kollagen I und III mRNA Konzentrationen, ähnlich wie bei Fibronectin, keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Durch die Anwendung der Masson-Goldner-Färbung auf den Nierenschnitten können fibrotische Bereiche nachgewiesen werden, die sich blau färben. Aufgrund der festgestellten Unterschiede der Fibronectin Expression zwischen PDGFR β Ren WT und den PDGFR β Ren KO Adenin Tieren wurden mögliche Unterschiede hinsichtlich der Fibrose zwischen den beiden Genotypen untersucht. Die Auswertung ergibt, dass die fibrotische Fläche bei den PDGFR β Ren KO Kontrolltieren größer ist als bei den PDGFR β Ren WT Kontrolltieren (siehe Abbildung 35 A). Unter Schädigungsbedingungen nimmt die Anzahl der fibrotischen Areale bei beiden Genotypen zu. Es gibt jedoch keinen Unterschied zwischen den PDGFR β Ren WT Adenin und PDGFR β Ren KO Adenin Mäusen in Bezug auf die fibrotische Flächengröße (siehe Abbildung 35 A).

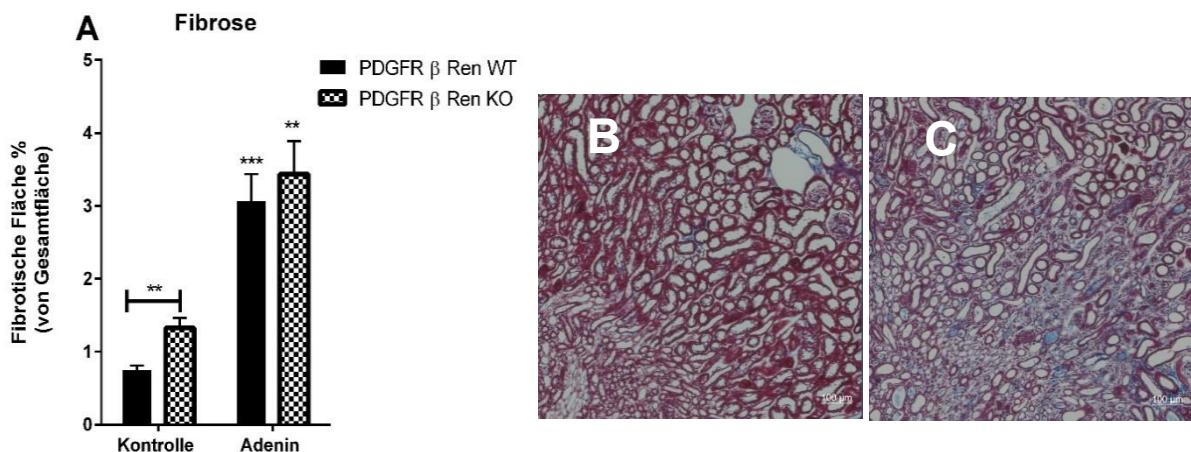


Abbildung 35 Fibrosequantifizierung nach Masson Goldner, Fibrose (blau), Maßstab 100 μ m
A. Auswertung: Fläche Fibrose/Gesamtfläche Niere in %:

PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,745 \pm 0,065$ % vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle: $1,329 \pm 0,137$ %

PDGFR β Ren WT Adenin: $3,067 \pm 0,371$ % vs. PDGFR β Ren KO Adenin: $3,436 \pm 0,454$ %,

Signifikanzniveau: ** p < 0,01

B. Ausschnitt Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle, Masson Goldner Färbung

C. Ausschnitt Medulla: PDGFR β Ren WT Adenin, Masson Goldner Färbung

Chronische Nierenerkrankungen wie die Adenin-induzierte Nephropathie sind durch eine Immunzellinfiltration gekennzeichnet. Da insbesondere die Infiltration von Makrophagen eine wichtige Rolle beim Beginn der Nierenerkrankung spielt [198], wurde diese durch die Quantifizierung des Makrophagenmarkers F 4/80 untersucht. Die mRNA Expression von F 4/80 ist in den kortikalen und medullären Bereichen der Adenin-behandelten Mäuse deutlich höher als bei den Mäusen unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 36 A). Allerdings weisen die PDGFR β Ren KO Tiere unter Schädigungsbedingungen niedrigere F 4/80 mRNA

Konzentrationen auf als die PDGFR β Ren WT Adenin Mäuse. In der Papille sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der F 4/80 mRNA Konzentration erkennbar. Die Werte schwanken dort insgesamt stark (siehe Abbildung 36 C).

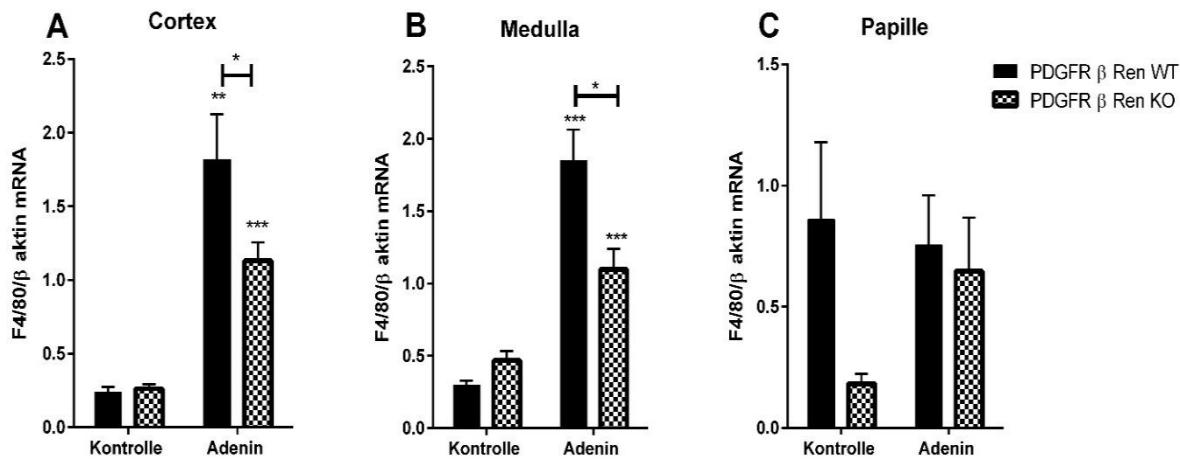


Abbildung 36 Adenintiere qPCR F4/80 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,241 \pm 0,033$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,261 \pm 0,032$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $1,82 \pm 0,304$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $1,131 \pm 0,124$
 Signifikanzniveau: * p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=5): $0,300 \pm 0,030$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,468 \pm 0,063$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $1,853 \pm 0,210$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=7): $1,098 \pm 0,141$
 Signifikanzniveau: * p < 0,05, *** p < 0,001

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,861 \pm 0,316$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=6): $0,182 \pm 0,040$
 PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,756 \pm 0,204$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,647 \pm 0,220$

Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, nimmt auch bei den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Adenin Mäusen die Fläche der Makrophagen, im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich zu. In Bezug auf die Flächengröße von F4/80 zeigen die beiden Genotypen im Schädigungsmodell keine Unterschiede (siehe Abbildung 37 A).

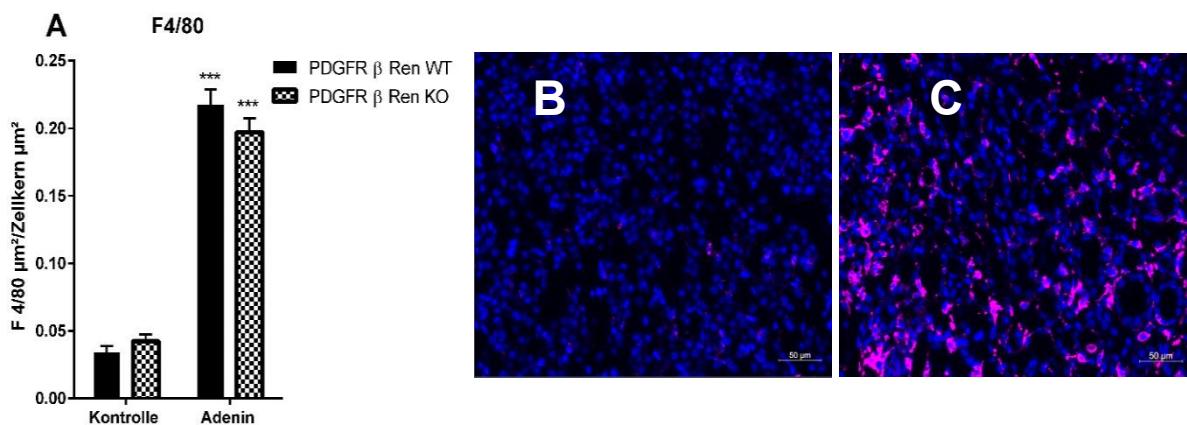


Abbildung 37 Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung von F4/80 (violett), DAPI (blau), Maßstab Balken 50 μ m

A. Auswertung: F 4/80 Fläche/ Zellkern Fläche:
 PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,034 \pm 0,005$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=8): $0,042 \pm 0,005$; PDGFR β Ren WT Adenin (n=8): $0,217 \pm 0,011$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $0,197 \pm 0,010$; Signifikanzniveau: *** p < 0,001

- B. Ausschnitt Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle, Immunofluoreszenzefärbung F 4/80
 C. Ausschnitt Medulla: PDGFR β Ren WT Adenin, Immunofluoreszenzefärbung F 4/80

Unter diabetischen Bedingungen zeigen die PDGFR β Ren WT Mäuse signifikant höhere F 4/80 mRNA Konzentrationen im Cortex im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Kontrollmäusen (vgl. Abb. 38 A). Bei den PDGFR β Ren KO STZ Tieren ist ein deutlicher Trend zu höheren F4/80 mRNA Konzentrationen im Cortex erkennbar. Die PDGFR β Ren WT STZ und PDGFR β Ren KO STZ Mäuse weisen in der Medulla tendenziell höhere F 4/80 mRNA Konzentrationen auf, als die Kontrolltiere (siehe Abb. 38 B). In der Papille kann man keinen Anstieg der F 4/80 mRNA Konzentration bei den diabetischen Tieren verzeichnen, die Werte weisen eine hohe Streuung auf (Abb. 38 C). Hinsichtlich der F 4/80 mRNA Konzentration zeigt sich weder unter Kontrollbedingungen, noch unter diabetischen Bedingungen ein Unterschied zwischen den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Tieren.

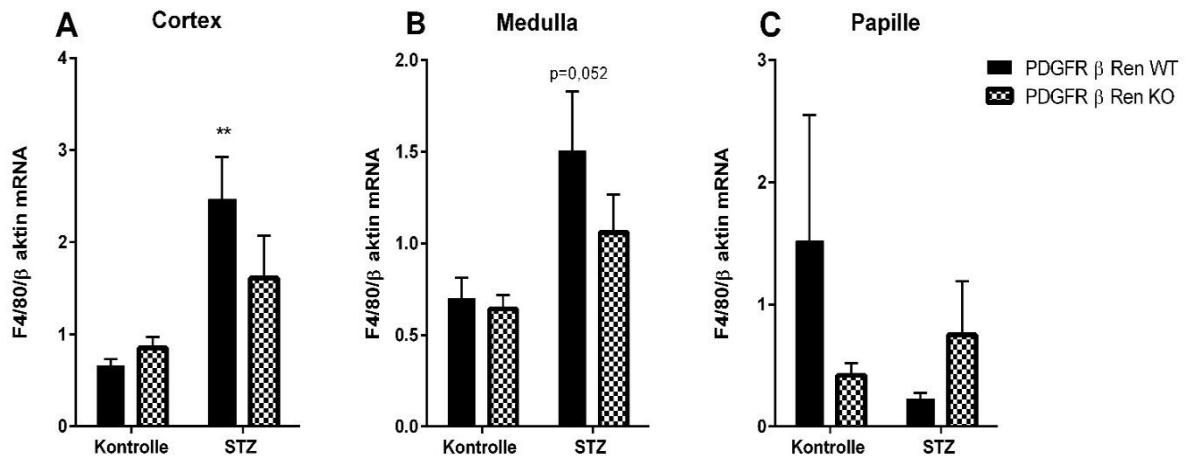


Abbildung 38 STZ-Tiere qPCR F4/80 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille

A. Cortex: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,661 \pm 0,068$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,849 \pm 0,123$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $2,468 \pm 0,454$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=5): $1,609 \pm 0,459$

Signifikanzniveau: (**p < 0,01)

B. Medulla: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=6): $0,701 \pm 0,111$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,642 \pm 0,076$; PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $1,504 \pm 0,326$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=6): $1,059 \pm 0,208$

C. Papille: PDGFR β Ren WT Kontrolle (n=4): $1,520 \pm 1,029$ vs. PDGFR β Ren KO Kontrolle (n=5): $0,419 \pm 0,103$; PDGFR β Ren WT STZ (n=6): $0,228 \pm 0,045$ vs. PDGFR β Ren KO STZ (n=5): $0,753 \pm 0,436$

4.3.9.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Eine Adeninnephropathie ist gekennzeichnet durch eine starke Einschränkung der Nierenfunktion [199]. Zur Erfassung der Unterschiede in Bezug auf die Nierenfunktion zwischen PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Tieren, wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Tiere unter Basalbedingungen und Schädigungsbedingungen gemessen. Unter Basalbedingungen unterscheiden sich beide Genotypen hinsichtlich ihrer GFR nicht. Unter der

Adeninnephropathie reduziert sich die GFR bei beiden Genotypen stark, wobei die Abnahme bei den PDGFR β Ren KO Tieren weniger ausgeprägt ist.

Man kann keine Unterschiede hinsichtlich der GFR zwischen den beiden Genotypen unter Ausgangsbedingungen erkennen. Ebenso weisen die beiden Genotypen unter diabetischen Bedingungen auch keine Unterschiede auf (siehe Abb. 39 B).

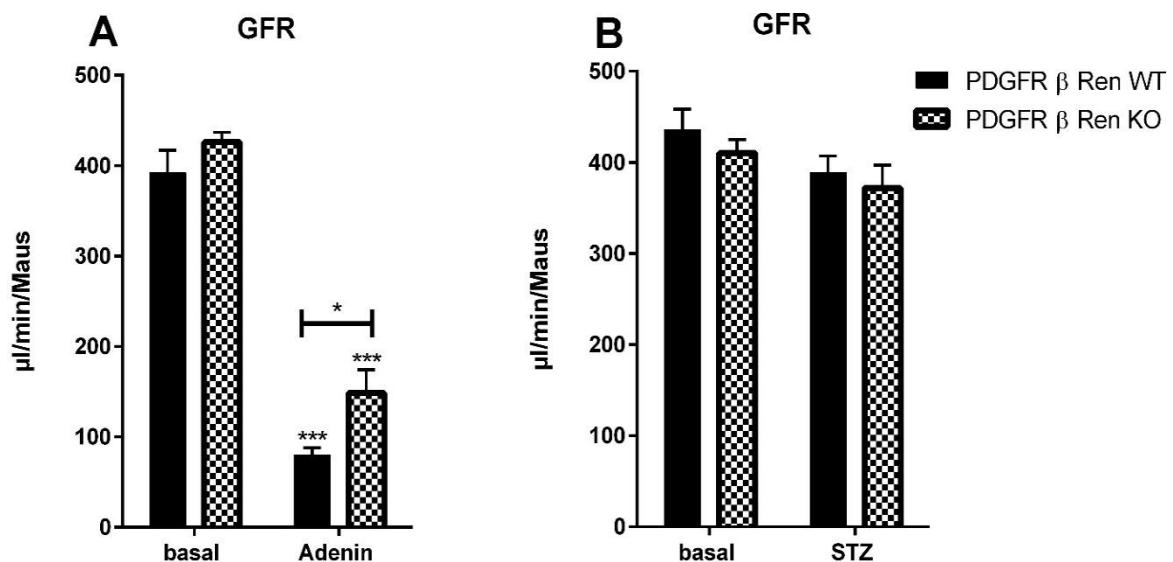


Abbildung 39 Glomeruläre Filtrationsrate Adenin und STZ Tiere

A. PDGFR β Ren WT basal (n=7): $392,2 \pm 25,05$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$ vs. PDGFR β Ren WT Adenin (n=7): $80,23 \pm 7,662$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$;

PDGFR β Ren KO basal (n=8): $425,9 \pm 10,86$, $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=8): $148,6 \pm 25,71$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

B. PDGFR β Ren WT basal (n=7): $436,3 \pm 21,99$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$ vs. PDGFR β Ren WT STZ (n=7): $389,2 \pm 17,87$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$;

PDGFR β Ren KO basal (n=6): $410,4 \pm 14,58$, $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$ vs. PDGFR β Ren KO Adenin (n=6): $371,9 \pm 25,25$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Maus}$

4.4 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen durch physiologische Stimuli

4.4.1 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen: chronische Renin Stimulation

Zur Untersuchung der Regulation der Renin-Freisetzung wurden 5 weibliche PDGFR β Ren WT und 4 weibliche PDGFR β Ren KO Mäuse induziert und gleichzeitig mit dem ACE-Inhibitor Enalapril und einer Niedrigsalz-Diät behandelt. Diese Kombination führt zu einer starken Stimulation der Renin-Freisetzung. Im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen wird bei den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen (Trend) unter Behandlung des ACE-Inhibitors und der Niedrigsalz-Diät eine Zunahme der Plasma Renin-Konzentration festgestellt.

Zwischen den Genotypen kann sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch unter der Behandlung kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 40). Insgesamt zeigen die Plasma Renin-Konzentrationen unter der Behandlung eine beträchtliche Schwankung.

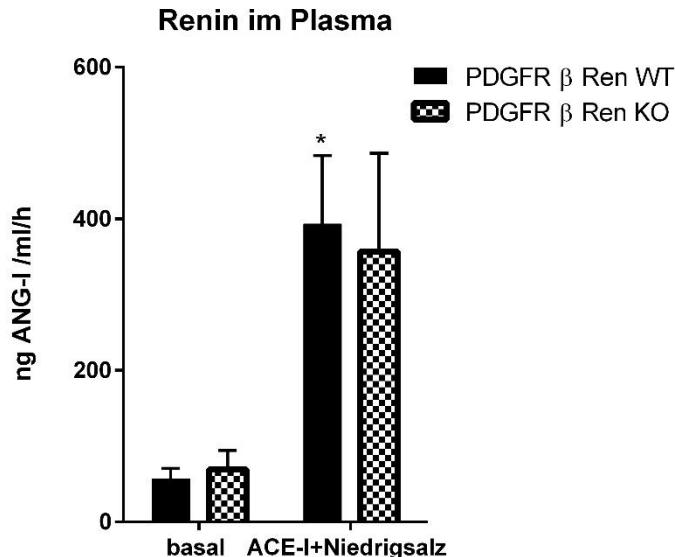


Abbildung 40 Renin-Konzentration im Plasma

PDGFR β Ren WT basal (n= 5): $56,97 \pm 13,63$ ng ANG-I/ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=4) $69,00 \pm 25,49$ ng ANG-I/ml/h;

PDGFR β Ren WT Behandlung: $393,3 \pm 90,06$ ng ANG-I/ml/h; vs. PDGFR β Ren KO Behandlung (n=4): $356,5 \pm 129,8$ ng ANG-I/ml/h, Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

Um genauere Aussagen über die Renin-Produktion aus interstitiellen Zellen zu treffen, wurde die Renin mRNA mittels RNA-Scope auf Nierenschnitten von Tieren unter Behandlung einer Hochsalz- und einer Niedrigsalz-Diät + Enalapril detektiert. Die juxtaglomeruläre Renin mRNA Expression steigt unter einer Niedrigsalzdiät + ACE-Inhibitor (siehe Abbildung 41B) während sie unter einer Hochsalz-Diät abnimmt (siehe Abbildung 41 C). Mäuse, die mit einer Niedrigsalz-Diät und Enalapril behandelt wurden, zeigen eine Zunahme der Anzahl und Verteilung der Renin-bildenden juxtaglomerulären Zellen (Rekrutierung der Reninzellen). Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, wird allerdings weder durch die Niedrigsalz- noch durch die Hochsalz-Diät die Renin-Expression in den medullären PDGFR β -Zellen beeinflusst (siehe Abbildung 41).

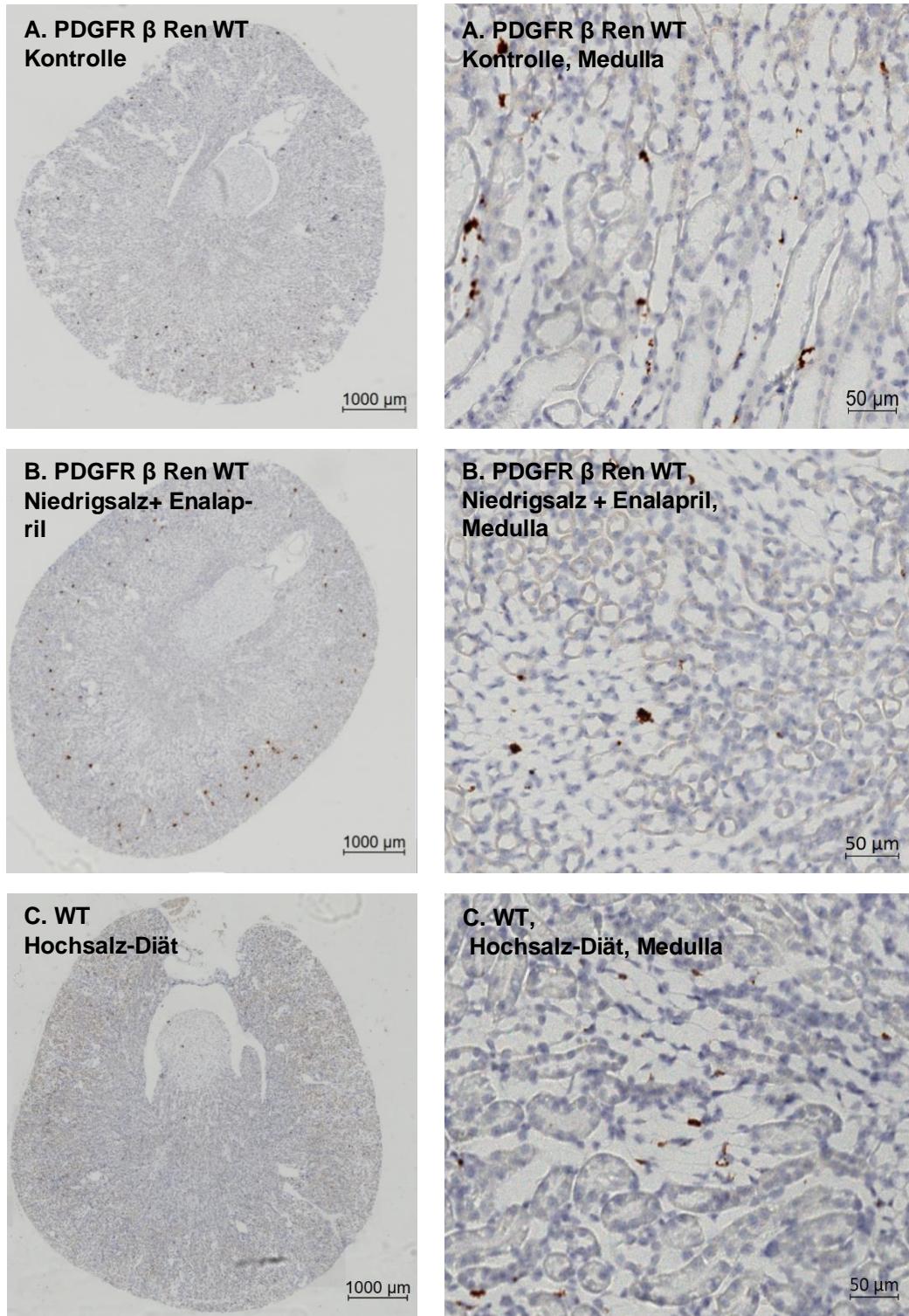


Abbildung 41 Renin mRNA Scope, Rein mRNA braun, PDGFR β Ren WT Mäuse

- A. Gesamtniere einer PDGFR β Ren WT Kontrollmaus, rechts Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin
- B. Gesamtniere einer ACE-Inhibitor+ Niedrigsalz behandelten PDGFR β Ren WT Maus, rechts Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin
- C. Gesamtniere einer Hochsalz behandelten WT Maus, rechts Ausschnitt Medulla: interstitielles Renin

4.4.2 Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen: akute Renin Stimulation

Bislang wurde der Einfluss des interstitiellen Renin KOs bei einer chronischen Stimulation von Renin beschrieben. Im Folgenden wird die akute Stimulation von Renin unter der Verwendung von Isoproterenol untersucht. Isoproterenol ist ein β -Rezeptoragonist, der über adrenerge β 1-Rezeptoren wirkt und zu einer unmittelbaren Freisetzung von Renin führt und die physiologisch sehr bedeutsame Stimulation der Renin-Sekretion durch das sympathische Nervensystem imitiert [180]. Durch die Behandlung der Mäuse mit Isoproterenol würde überprüft, ob β -Rezeptoren in interstitiellen Zellen *in vivo* einen Einfluss auf die Renin-Produktion haben. Die Renin-Konzentration im Plasma der PDGFR β Ren WT Mäuse steigt unter Isoproterenol-Behandlung um etwa das 75-fache an. Auch bei PDGFR β Ren KO Mäusen kommt es zu einem sehr starken Anstieg der Renin-Konzentration im Plasma, der allerdings gegenüber PDGFR β Ren WT Mäusen reduziert ist.

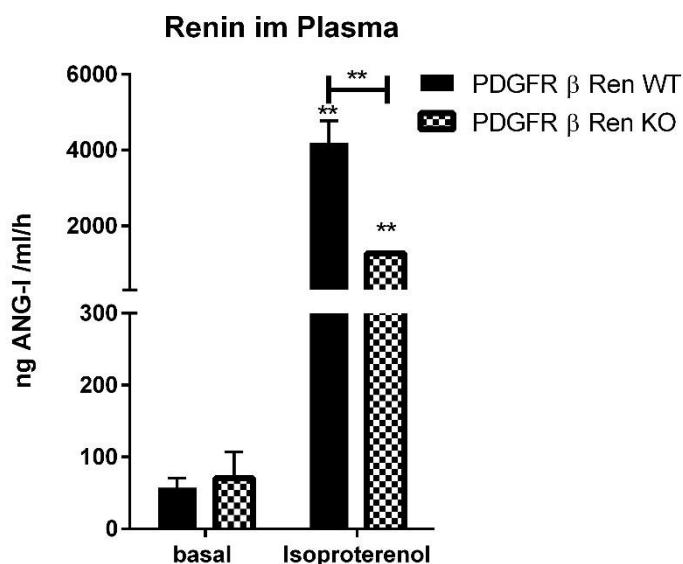


Abbildung 42 Renin-Konzentration im Plasma, Isoproterenol (ISO)

PDGFR β Ren WT basal (n=5): 56.97 ± 13.63 ng ANG I/ml/h vs. PDGFR β Ren KO basal (n=3): 71.06 ± 35.93 ng ANG I/ml/h;

PDGFR β Ren WT ISO (n=5): 4.192 ± 583.8 ng ANG I/ml/h vs. PDGFR β Ren KO ISO (n=3): 1.276 ± 32.97 ng ANG I/ml/h; Signifikanzniveau ** p < 0,01

4.5 Zellkulturexperimente: Regulation der Renin-Freisetzung aus PDGFR β -Zellen

Die grün fluoreszierenden interstitiellen Zellen von PDGFR β -Cre/mTmG Mäusen wurden für Zellkulturversuche verwendet. Zur Sicherstellung der korrekten Sortierung der PDGFR β Zellen mittels Durchflusszytometrie, wurde eine qPCR durchgeführt, wobei das Vorhandsein der PDGFR β mRNA der Zellen überprüft wurde. Zusätzlich wurde eine

Immunofluoreszenzfärbung mit einem PDGFR β Antikörper durchgeführt, um die Anwesenheit des Rezeptors auf den Zellen zu bestätigen (siehe Abbildung 43). Durch diese Techniken konnte sichergestellt werden, dass PDGFR β -positive Zellen kultiviert wurden.

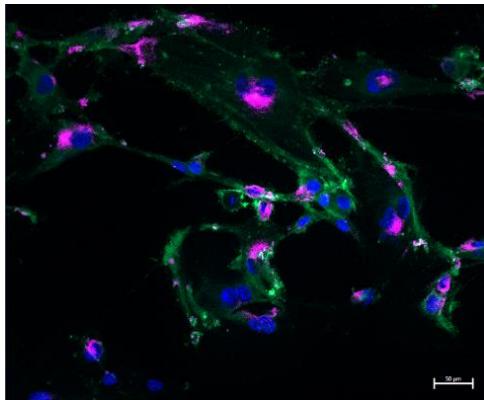


Abbildung 43 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kultivierten PDGFR β -positiven Zellen, Maßstab: 50 μ m
Immunofluoreszenzfärbung von PDGFR β (violett), DAPI (blau) und grün fluoreszierende mG Protein

Um auszuschließen, dass es sich bei den kortikalen PDGFR β Zellen nicht teilweise auch um juxtaglomeruläre Zellen handelt, wurde vor der Isolation der PDGFR β Zellen aus den murinen Nieren, die Niere in Cortex und Medulla zoniert. Dieser Ansatz ermöglicht nicht nur die genaue Trennung der PDGFR β Zellen von den juxtaglomerulären Zellen, sondern eröffnete auch die Möglichkeit, etwaige Unterschiede im Verhalten dieser Zellpopulationen zu erkennen. Um den Stimulus zu untersuchen, der die Renin-Produktion auf hormoneller und molekularer Ebene beeinflusst, wurde zunächst analysiert, ob die Renin-Produktion in primären PDGFR β -Zellen durch Forskolin und IBMX stimuliert wird [135]. Sowohl Forskolin (Aktivator der Adenylatcyclase (AC)), als auch IBMX (nichtselektive Inhibitor der Phosphodiesterasen (PDE)) erhöhen die Renin-Freisetzung in isolierten juxtaglomerulären Zellen [81,200]. Forskolin, sowie IBMX bewirken eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle. Adenylatcyclasen (AC), die in eukaryotischen Zellen weit verbreitet sind, sind Enzyme, die cAMP aus zytosolischem Adenosintriphosphat (ATP) erzeugen. Forskolin bindet allosterisch an AC und stimuliert die ATP-Katalyse [201]. Die cAMP-Konzentration in den Zellen wird durch ein Gleichgewicht zwischen der Geschwindigkeit der cAMP-Erzeugung durch AC und der cAMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterasen (PDE) bestimmt [81]. PDE fördern somit den Abbau von cAMP. Durch die Hemmung der PDE wird folglich die cAMP-Konzentration in der Zelle gesteigert. Es stellte sich heraus, dass die kultivierten murinen PDGFR β -Zellen, genauso wie kultivierte humane Perizyten [135] nach einigen Tagen die Fähigkeit zur Renin-Produktion verlieren und nur durch die Zugabe von Forskolin oder IBMX wieder dazu angeregt werden können, Renin zu produzieren. Es wurden daher alle Zellen für 4 Tage mit Forskolin behandelt, um die Renin-Expression der Zellen aufrecht zu erhalten. Nach 4 Tagen wurden die Zellen entweder für einen weiteren Tag mit Forskolin stimuliert oder nur mit dem Vehikel (DMSO) behandelt. Es wurde festgestellt, dass die um einen Tag längere Stimulation mit 10 μ M Forskolin zu einer erhöhten Renin-Produktion in PDGFR β Zellen führt (vgl. Abbildung 44 A und B). Ähnlich verhielten sich die Zellen,

die einen weiteren Tag mit 100 μ M IBMX behandelt wurden. Alle Zellen wurden 5 Tage lang mit 100 μ M IBMX behandelt, anschließend wurde ein Teil der Zellen ein Tag länger mit 100 μ M IBMX stimuliert (siehe Abbildung 44 C und D). Die Zellen, die ein Tag länger mit IBMX behandelt wurden, weisen eine höhere Renin-Produktion auf.

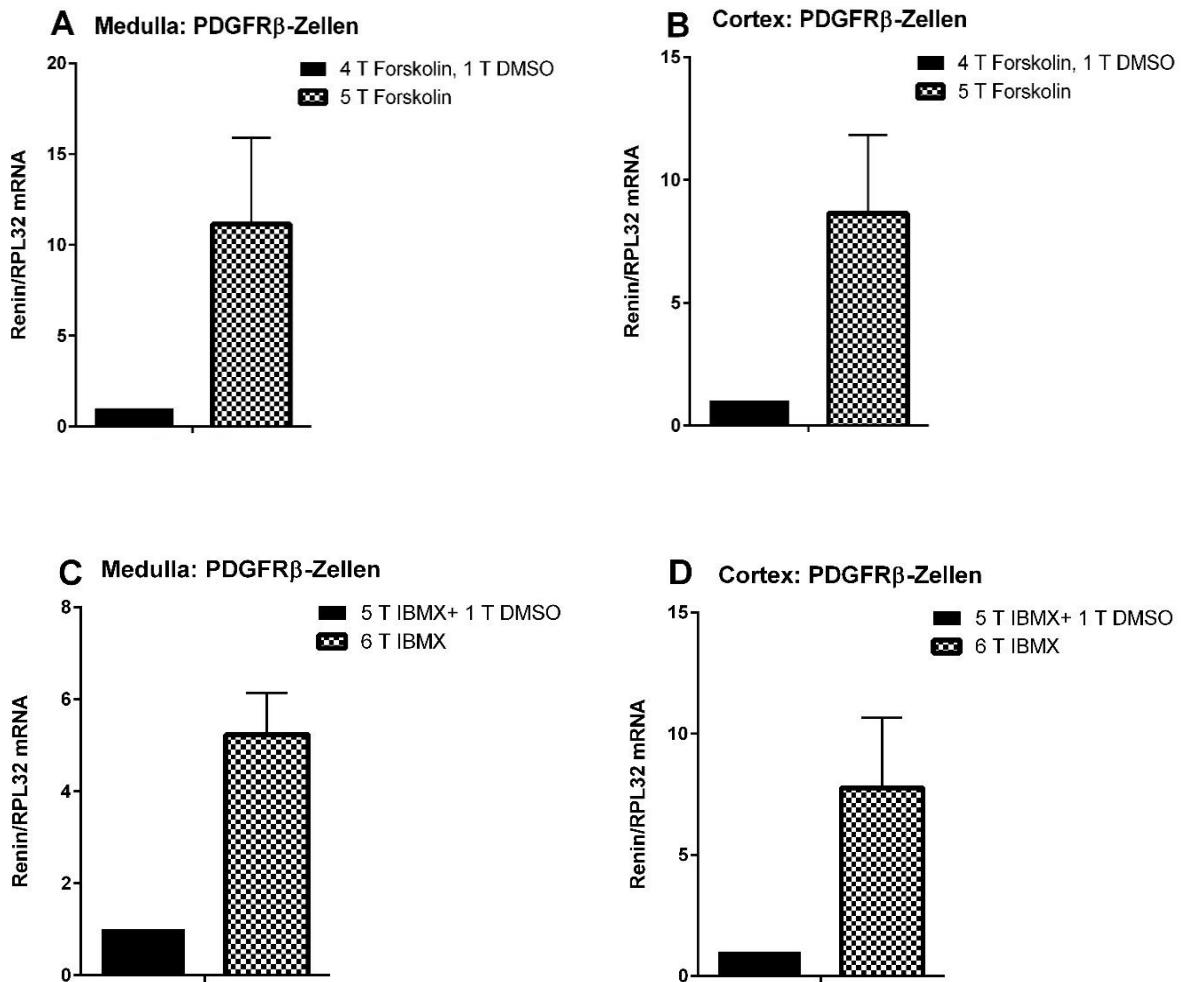


Abbildung 44 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-9 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells

A. PDGFR β Zellen aus dem Nierenmark: 1 Tag kürzer mit Forskolin behandelte Zellen (n=3) wurden auf 1 nomiert vs. 1 Tag länger mit Forskolin behandelte Zellen (n=3): 11.14 ± 4.739

B. PDGFR β Zellen aus dem Nierencortex: 1 Tag kürzer mit Forskolin behandelte Zellen (n=2) wurden auf 1 nomiert vs. 1 Tag länger mit Forskolin behandelte Zellen (n=2): 8.634 ± 3.202

C. PDGFR β Zellen aus dem Nierenmark: 1 Tag kürzer mit IBMX behandelte Zellen (n=2) wurden auf 1 nomiert vs. 1 Tag länger mit IBMX behandelte Zellen (n=2): 5.233 ± 0.9088

D. PDGFR β Zellen aus dem Nierencortex: 1 Tag kürzer mit IBMX behandelte Zellen (n=3) wurden auf 1 nomiert vs. 1 Tag länger mit IBMX behandelte Zellen (n=3): 7.765 ± 2.890

Um zu untersuchen, ob PGE₂, das verstärkt unter Nierenschädigungsbedingungen produziert wird, die Renin-Produktion erhöht, wurde eine Stimulation der PDGFR β Zellen mit diesem Hormon durchgeführt. Zunächst wurde mithilfe der qPCR überprüft, ob in den kultivierten PDGFR β Zellen Prostaglandinrezeptoren vorhanden sind. Dabei wurde festgestellt, dass die

Zellen insbesondere EP2 und EP4 mRNA exprimieren. Um die Renin mRNA Expression in allen kultivierten Zellen nachzuweisen, wurden für das Stimulationsexperiment die PDGFR β Zellen 4 Tage lang mit Forskolin vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PGE₂, beziehungsweise dem Vehikel (ETOH) 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation mit PGE₂ bewirkt einen Anstieg der Renin mRNA in den PDGFR β -Zellen (Medulla: signifikanter Anstieg, Cortex: starker Trend) (siehe Abbildung 45).

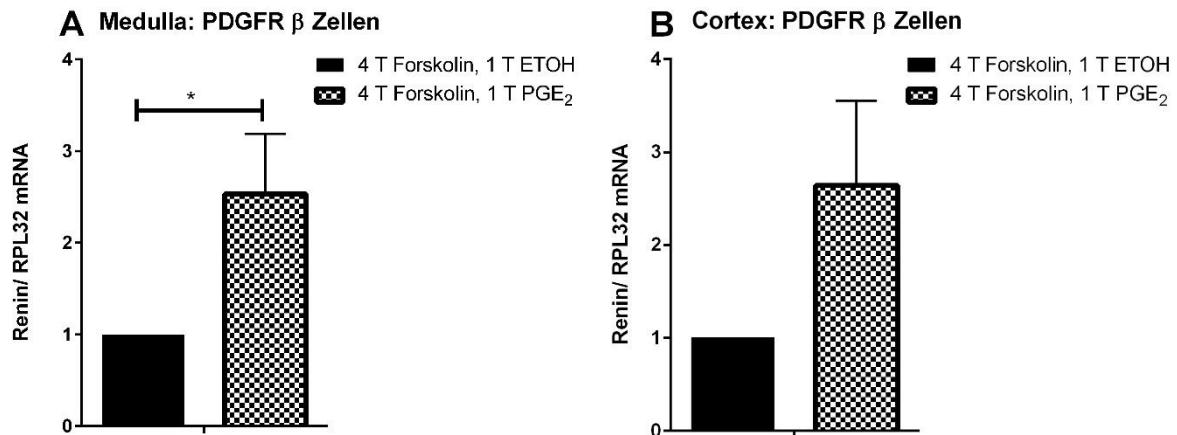


Abbildung 45 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-9 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells

- A. PDGFR β Zellen aus dem Nierenmark: Die Nicht stimulierten Zellen (n=7) wurden auf 1 nominiert. Stimulation mit PGE₂ (n=7): $2,534 \pm 0,656$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$
- B. PDGFR β Zellen aus dem Nierencortex : Die Nicht stimulierten Zellen (n=8) wurden auf 1 nominiert. Stimulation mit PGE₂ (n=8): $2,641 \pm 0,912$

PGE₂ konnte ein Anstieg der Renin mRNA in den Zellen bewirken. Anschließend wurde untersucht, ob dieser Anstieg durch gleichzeitige Inhibition von Phosphodiesterasen verstärkt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass PGE₂ durch die Aktivierung der EP2- und EP4-Rezeptoren die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigert [202], könnte man erwarten, dass eine zusätzliche Hemmung der PDE durch IBMX zu einer noch höheren intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Wenn dies zu einer weiteren Steigerung der Renin-Produktion in den PDGFR β -Zellen führt, könnte dies darauf hinweisen, dass PDGFR β -Zellen über PGE₂-vermittelte cAMP-Signalwege die Renin-Produktion verstärken. Abbildung 46 zeigt, dass der Anstieg der Renin mRNA in den Zellen durch die Kombination von PGE₂ und IBMX weiter erhöht wird.

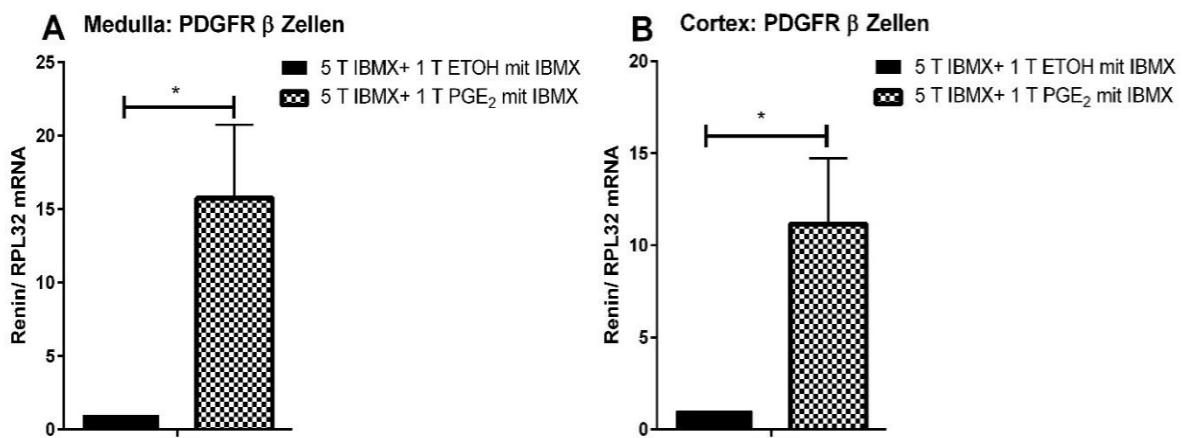


Abbildung 46 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-10 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells

A. PDGFR β Zellen aus dem Nierenmark: Die Nicht stimulierten Zellen (n=5) wurden auf 1 nomiert vs. Stimulation mit PGE₂ (n=7): $15,77 \pm 4,988$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

B. PDGFR β Zellen aus dem Nierencortex : Die Nicht stimulierten Zellen (n=6) wurden auf 1 nomiert vs. Stimulation mit PGE₂ (n=7): $11,15 \pm 3,568$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

5 Diskussion

5.1 Regulation und funktionelle Bedeutung von Renin in interstitiellen Zellen unter physiologischen Bedingungen

Um die funktionelle Bedeutung des interstitiellen Renins genauer zu untersuchen, wurde eine genetisch modifizierte Maus generiert, bei der das Reningen gezielt in den interstitiellen Zellen ausgeschaltet wurde. Vorherige Forschungsergebnisse deuteten darauf hin, dass Renin-bildende interstitielle Zellen den PDGFR β exprimieren [137]. Daher wurden Ren1^{flox/flox}-Mäuse mit einer Mauslinie gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des PDGFR β -Promotors exprimiert. Durch diese Kreuzung konnte eine Maus erzeugt werden, bei die Renin-Bildung in PDGFR β positiven interstitiellen Zellen stark reduziert oder sogar aufgehoben ist. Zu einem beliebigen Zeitpunkt kann die Aktivierung der Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle des PDGFR β -Promotors steht, durch die Verabreichung von tamoxifenhaltigem Futter erfolgen [203]. Der Vorteil gegenüber dem konstitutiven Knockout Modell ist, dass bei dem induzierbaren Maus Modell die Embryonalentwicklung durch den Knockout nicht beeinträchtigt wird und die Funktion des Gens im Erwachsenenalter untersucht werden kann [178]. Es wurde darauf geachtet, dass die Induktion mit Tamoxifen (TMX) der Versuchstiere erst im Erwachsenenalter erfolgte. Mäuse mit induzierbaren Cre-Systemen können normal heranwachsen und die genetische Funktion bis zur Induktion uneingeschränkt beibehalten. Die korrekte Rekombination der PDGFR β -Zellen wurde mithilfe der TMX-induzierten PDGFR β Cre mTmG Maus überprüft. Es war deutlich erkennbar, dass nur interstitielle Zellen und Mesangiumzellen der Glomeruli das grün fluoreszierende mG-Protein exprimieren, was darauf schließen lässt, dass die Cre-Rekombination in den PDGFR β Zellen stattfindet. Die Tubuli und die juxtaglomerulären Zellen exprimieren hingegen weiterhin das rote mT-Protein. Dennoch konnte man in der PDGFR β Cre Ren^{flox/flox}-Maus vereinzelte interstitielle Zellen erkennen, die Renin exprimieren. Dies könnte zum einen an einer nicht 100%igen Rekombinationseffizienz liegen [204]. So könnte u.a. eine nicht ausreichende Tamoxifen-Dosis die Ursache für eine unzureichend induzierte Transgenexpression sein [205]. Zum anderen könnten auch weitere Zellen des Interstitiums, die nicht den PDGFR β exprimieren, Renin exprimieren. Diese würden entsprechend keine Cre-Aktivität und damit auch keine Deletion des Reningens aufweisen. Allerdings war bereits unter physiologischen Bedingungen ein deutlicher Unterschied in der Renin mRNA Expression zwischen den beiden induzierten Genotypen erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die Rekombination größtenteils stattgefunden hat.

PDGFR β Ren KO Tiere unterschieden sich von PDGFR β Ren WT Tieren durch geringere Renin mRNA Konzentrationen in der Niere. Um die Lokalisation der Renin-produzierenden PDGFR β positiven interstitiellen Zellen zu bestimmen, wurde geschaut, in welchem Bereich

der Niere der Unterschied der Renin mRNA auftritt. Vorangegangene Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die PDGFR β positiven Zellen, welche Renin bilden, vorwiegend in der äußeren Medulla der Niere lokalisiert sind [153]. Durch die Verwendung eines RNA-Sscopes erkennt man auf Nierenschnitten, insbesondere im Bereich der äußeren Medulla, einen deutlichen Unterschied der Renin mRNA Expression zwischen den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäusen. Im Gegensatz zu den PDGFR β Ren WT Mäusen, weisen die PDGFR β Ren KO Mäuse mit Ausnahme einiger weniger Fälle keine Renin mRNA in den interstitiellen Zellen der äußeren Medulla auf. Dies spiegelt sich auch in der Renin mRNA Konzentration im Nierengewebe der Mäuse wider. Die qPCR Daten zeigen, dass die PDGFR β Ren KO Mäuse in der Medulla weniger Renin mRNA aufweisen als die PDGFR β Ren WT Mäuse. Dadurch kann bestätigt werden, dass sich die Renin-bildenden interstitiellen Zellen im Nierenmark befinden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PDGFR β Ren KO Tiere geringere Renin mRNA Konzentrationen in allen Bereichen der Niere aufweisen. Die Ergebnisse der qPCR verdeutlichen, dass die PDGFR β Ren KO Mäuse auch im Cortex im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen niedrigere Renin mRNA Konzentrationen besitzen. Allerdings ist dieser Unterschied auf den Nierenschnitten der Tiere nicht eindeutig erkennbar. Es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der makroskopischen Zonierung der Niere in Cortex, Medulla und Papille eine unabsichtliche Kontamination des Cortex mit Teilen der Medulla aufgetreten ist. Da sich im Cortex allerdings juxtaglomeruläre Zellen befinden, die deutlich mehr Renin exprimieren als die interstitiellen Zellen, hätte eine Verunreinigung möglicherweise nur einen geringfügigen Unterschied der Renin mRNA Konzentration in der qPCR gezeigt. Die Expression von Renin in kortikalen interstitiellen Zellen wurde bereits in Mäusen gezeigt, bei denen durch die Behandlung mit dem Vasodilatator Hydralazin bzw. dem AT 1 Rezeptor Antagonist Losartan eine Hypotonie induziert wurde [136]. Die Verabreichung von Hydralazin und Losartan führte zu einer Blutdrucksenkung der Mäuse, begleitet von einem Anstieg der Renin 1 mRNA. Der Anstieg der Renin 1 mRNA wurde vor allem in den kortikalen tubulointerstitiellen Zellen festgestellt, während in den medullären interstitiellen Zellen und den juxtaglomerulären Zellen kein bedeutender Anstieg der Renin mRNA zu verzeichnen war [136]. Dies legt nahe, dass sich auch im Cortex einige PDGFR β Zellen befinden, die Renin produzieren können. Allerdings konnte ich auf den Nierenschnitten der PDGFR β Ren WT Mäuse unter physiologischen Bedingungen nur wenig Renin mRNA in den kortikalen tubulointerstitiellen Zellen nachweisen. Daher scheint eine unterschiedliche Expression von Renin in PDGFR β positiven interstitiellen Zellen allein nicht ausreichend zu sein, um den Unterschied in der Renin mRNA Expression im Cortex der beiden Genotypen vollständig zu erklären. Allerdings wurde beschrieben, dass sich PDGFR β Zellen auch direkt um die juxtaglomerulären Zellen herum gruppieren und diese Zellen daher nicht als klassische interstitielle Zellen, die eher im losen Verband im Gewebe liegen, imponieren. Bisher ist nicht bekannt, ob die perivaskulären PDGFR β Zellen unter

physiologischen Bedingungen Renin produzieren [187]. Hinweise auf die Fähigkeit der perivaskulären PDGFR β Zellen zur Renin-Produktion liefert eine Immunofluoreszenzfärbung mit Renin (siehe Ergebnis-Teil 4.3.4). Bei der Quantifizierung des Renin-Signals an der afferenten Arteriole von PDGFR Ren WT und PDGFR Ren KO Mäusen stellt sich heraus, dass die PDGFR Ren KO Mäuse eine geringere Fläche der Renin-Färbung im Bereich des juxtaglomerulären Apparats aufweisen als die PDGFR Ren WT Mäuse. Dies legt nahe, dass die perivaskulären Renin-Zellen auch unter physiologischen Bedingungen in der Lage sind Renin zu produzieren. Auf den Nierenschnitten, die mithilfe des RNA-Scope-Verfahrens angefertigt wurden, ist keine eindeutige Zuordnung der Renin mRNA-Expression zu den perivaskulären PDGFR- β -Zellen möglich, da das starke Renin mRNA Signal von den juxtaglomerulären Zellen das Renin-Signal der perivaskulären Zellen überdeckt. Allerdings sprechen die geringere Fläche der Renin-Färbung, die geringere Renin mRNA und die geringere Renin-Aktivität im Cortex der PDGFR Ren KO Mäuse dafür, dass die perivaskulären PDGFR β Zellen im Bereich des juxtaglomerulären Apparats auch unter physiologischen Bedingungen in der Lage sind Renin zu produzieren.

Die RNA-Scope Untersuchungen zeigen zudem, dass auch in der Papille Renin-bildende interstitielle Zellen vorhanden sind. Allerdings ist die Gesamtzahl der Renin-exprimierenden Zellen hier sehr gering. Dies könnte erklären, warum bei der Messung der Renin mRNA Konzentration lediglich ein Trend zu einer geringeren Renin-Konzentration bei den PDGFR Ren KO Mäusen, im Vergleich zu den PDGFR Ren WT Mäusen beobachtet wird. Aufgrund der sehr geringen Gewebemenge und der unmittelbaren Nachbarschaft zum Nierenmark, das eine deutlich höhere Renin mRNA Expression aufweist, besteht die Möglichkeit der Kontamination mit Gewebe aus dem Nierenmark, sodass die Isolierung von mRNA aus der Papille störanfällig ist.

Parallel zu den Ergebnissen der Renin mRNA Expression in der qPCR, ist auch die Renin-Konzentration, also die Renin-Aktivität in Anwesenheit eines Überschusses Angiotensinogen, bei PDGFR β Ren KO Tieren im Cortex signifikant niedriger als bei PDGFR β Ren WT Tieren. Möglicherweise könnten, wie bereits oben erläutert, dafür auch die perivaskulären PDGFR β Zellen im juxtaglomerulären Apparat verantwortlich sein. Leider konnte ich in diesem Gewebe kein Prorenin nachweisen. Dies konnte einerseits daran gelegen haben, dass Prorenin, anders als Renin, konstitutiv freigesetzt wird und nicht in der Zelle gespeichert wird, sondern unmittelbar in den Blutkreislauf freigesetzt wird [104]. Somit liegt die Prorenin-Konzentration im Gewebe möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze des ANG I ELISA's. Ein weiterer Grund dafür, dass Prorenin nicht nachgewiesen werden konnte, könnte die enzymatische Umwandlung von Prorenin in Renin während der Gewebehomogenisierung sein. Die oben aufgeführte Renin-Konzentration wäre in diesem Fall also als Gesamt-Renin-Konzentration, also die Summe aus aktiven Renin und aktivierten Prorenin, zu verstehen.

In der Medulla und der Papille kann man lediglich einen Trend zur geringeren Renin-Aktivität der PDGFR β Ren KO Tiere beobachten. Basierend auf diesen Daten könnte man vermuten, dass die Renin mRNA Expression in den medullären PDGFR β Zellen nicht zu einer Veränderung der Freisetzung von aktivem Renin führt, sondern viel mehr zur Prorenin-Freisetzung beiträgt. Dies würde etwas im Widerspruch zu den Beobachtungen im Cortex stehen, da diese vermuten lassen, dass die kortikalen PDGFR β Zellen auch aktives Renin freisetzen können. Die resultierende Schlussfolgerung, dass PDGFR β Zellen sowohl aktives Renin, als auch primär inaktives Prorenin freisetzen können wird durch die Untersuchungen im Plasma gestützt. Hier haben PDGFR β Ren KO Mäuse unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu PDGFR β Ren WT Mäusen geringere Konzentrationen von aktiven Renin und Prorenin. Es bleibt jedoch noch weiter zu untersuchen, ob die Freisetzung von Renin und Prorenin aus den PDGFR β Zellen von ihrer Lokalisation in der Niere abhängt.

Renin löst durch die Aktivierung der nachgeschalteten enzymatischen Kaskade eine Vielzahl physiologischer Effekt aus, von denen die offensichtlichsten die Erhöhung der renalen Kochsalzresorption und des Blutdrucks sind. Die renalen Effekte der Renin-Angiotensin-Kaskade werden zum Teil über direkte tubuläre Effekte von Angiotensin II vermittelt. Darüber hinaus stimuliert Angiotensin II auch die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, was dann seinerseits auf den Tubulus einwirkt. Die verminderte Aldosteron-Konzentration der PDGFR β Ren KO Tiere sowie die beobachtete erhöhte renale Natrium-Ausscheidung kann daher gut auf die reduzierten Konzentrationen von Renin und Prorenin im Plasma der Tiere zurückzuführen sein. Es ist anzumerken, dass die PDGFR β Ren KO Tiere trotz der niedrigen Aldosteron-Konzentration im Blut keine reduzierte Ausscheidung von Kalium zeigen, da eine niedrige Aldosteron-Konzentration im Blut sowohl zu einer erhöhten Natriumausscheidung als auch zu einer verringerten Kaliumausscheidung führen könnte [206]. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass es neben den Aldosteron-abhängigen Mechanismen der renalen Kaliumausscheidung weitere Regulatoren des Kaliumhaushalts gibt [207]. Des Weiteren ist die Ausscheidung von Elektrolyten im Urin abhängig von der Uhrzeit, von der Trinkmenge und der Nahrungsaufnahme. Diese Faktoren wurden bei unseren Untersuchungen nicht standardisiert, um eine möglichst allgemeingültige und übertragbare Aussage treffen zu können. Neben den Veränderungen der Renin-Aktivität im Plasma könnte auch die beobachtete tendenziell reduzierte Renin mRNA in der Nebenniere zur niedrigeren Aldosteron-Konzentration im Plasma der PDGFR β Ren KO Mäuse beitragen. Wie viele andere Organe verfügt auch die Nebenniere über ein eigenständiges lokales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [119]. PDGFR β Zellen kommen hier vor allem in der kortikomedullären Grenzzone vor. Es ist bekannt, dass diese Zellen auch EPO mRNA exprimieren können [148]. Ob die PDGFR β positiven Zellen in der Nebenniere tatsächlich auch aktives Renin produzieren und sezernieren, bleibt noch weiter zu erforschen. Der Unterschied hinsichtlich der Renin und Prorenin-Konzentration und damit

verbundenen unterschiedlichen Aldosteron-Plasma Konzentration der Tiere ist höchstwahrscheinlich verantwortlich für die niedrigeren Blutdruckwerte bei den PDGFR β Ren KO Mäusen. Es lässt sich vermuten, dass der niedrige Blutdruck bei den PDGFR β Ren KO Mäusen nach 15 Wochen möglicherweise zu einer Abnahme des Herzgewichts beigetragen haben könnte (siehe Ergebnis-Teil 4.2.1). Es ist zudem bekannt, dass die Aktivierung des Prorenin-Rezeptors die Hypertrophie von Kardiomyozyten fördert [208]. Die verminderten Renin und Prorenin-Konzentrationen könnten daher, über die resultierende reduzierte Aktivierung des Prorenin-Rezeptors, auch direkt an den Kardiomyozyten zu einer reduzierten Zell- und damit Herzgröße beitragen.

Die genannten Veränderungen bei PDGFR β Ren KO Mäusen, also reduzierte Renin-, Prorenin- und Aldosteron-Konzentration, erhöhte Natriumausscheidung und niedriger Blutdruck, lassen die Schlussfolgerung zu, dass unter physiologischen Bedingungen offensichtlich keine anderen Zellen im Körper die fehlende Renin-Produktion der PDGFR β Zellen vollständig kompensieren können. Dies ist insofern erstaunlich, da der reduzierte Blutdruck eigentlich zu einer Stimulation der Renin-Bildung in den juxtaglomerulären Zellen führen sollte. Es bleibt also die Frage, warum die vorhandenen juxtaglomerulären Zellen in der PDGFR β Ren KO Maus, den Mangel der Renin-Freisetzung aus den PDGFR β Zellen nicht ausgleichen können. Um diese Frage zu beantworten, ist es zunächst notwendig, den Mechanismus zu verstehen, wie ein erhöhter Bedarf an Renin beantwortet wird und welche Zellen dabei zur Renin-Synthese mobilisiert werden. Tiere mit angeborenen genetischen Defekten im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System weisen eine erhöhte Anzahl von Renin-produzierenden Zellen in der adulten Niere auf, was als Hyperplasie der Renin-Zellen bezeichnet wird [187,209,210]. In der Regel wird ein erhöhter Renin-Bedarf im Körper bei Aktivierung des RAAS nicht durch eine verstärkte Renin-Produktion in den vorhandenen Zellen gedeckt, sondern durch eine Zunahme der Anzahl von Renin-produzierenden Zellen [187,211]. In Nieren mit genetischen Defekten im RAAS finden sich Renin-Zellen nicht nur im juxtaglomerulären Bereich, sondern auch in der mittleren Schicht der präglomerulären Arteriolen und insbesondere in den Zellschichten um die afferente Arteriole herum. Diese zellulären Schichten sind perivaskuläre Zellen, die unter anderem den PDGFR β exprimieren [187]. Die Hyperplasie dieser Zellen entwickelt sich mit der Zeit und ist irreversibel [210]. Bei der kurzzeitigen Behandlung mit Arzneimitteln, die das RAAS hemmen, wird ebenfalls die Anzahl der Renin-Zellen erhöht sowie auch die Menge des sezernierten Renins [147,212]. Diese Wirkstoffe führen zur Rekrutierung von Renin-Zellen aus den glatten Muskelzellen der präglomerulären Gefäße. Allerdings sind in diesem Rekrutierungsprozess keine perivaskulären PDGFR β -Zellen involviert. [209]. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der mit Enalapril und Niedrigsalz behandelten PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse wider. Bei den PDGFR β Ren WT Mäusen konnte man unter dieser Behandlung keine verstärkte Renin-Expression in den perivaskulären PDGFR β Zellen

erkennen. Selbstverständlich ist bei diesem Experiment zu bedenken, dass es sich nur um eine geringe Anzahl von Tieren handelt und dass in diesem Fall Weibchen verwendet wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Renin-Sekretion geschlechtsspezifische Veränderungen aufweist. In beiden Genotypen zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich des juxtaglomerulären Renin-Signals und der Renin-Konzentration im Plasma. Dies lässt darauf schließen, dass die PDGFR β Renin KO Maus prinzipiell einen erhöhten Renin-Bedarf im Körper, ausgelöst durch einen ACE-Hemmer in Kombination mit einer Niedrigsalzdiät, durch die vorhandenen juxtaglomerulären Zellen kompensieren kann. In anderen Hypotonie-Modellen, die durch die Verwendung von Hydralazin und Losartan erzeugt wurden, blieb die Renin-Expression der medullären interstitiellen Zellen nahezu auf dem Ausgangsniveau [136]. Ähnlich haben auch die mit Enalapril und Niedrigsalz behandelten Mäuse keine erhöhte Renin-Produktion in den medullären PDGFR β Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Regulation der Renin-Produktion in den juxtaglomerulären Zellen unabhängig von der Renin-Produktion der PDGFR β Zellen erfolgt. Diese Entkopplung der Regulation des interstitiellen Renins von der juxtaglomerulären Renin-Produktion im Hypotonie-Modell zeigt erstmals, dass die Renin-Produktion in den PDGFR β -Zellen eine eigenständige Funktion hat und nicht ein Spiegelbild der Reninproduktion im juxtaglomerulären Apparat ist.

Die Frage bleibt jedoch, warum die juxtaglomerulären Zellen unter physiologischen Bedingungen die reduzierte Renin-Produktion bei PDGFR β Ren KO Tieren nicht ausgleichen. Möglicherweise ist die Blutdruckreduktion der PDGFR β Ren KO Tiere zu gering, um den Barorezeptormechanismus zu aktivieren und so die Rekrutierung von Renin-Zellen zu initiieren [22]. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die PDGFR β Ren KO Mäuse die geringere Renin/Prorenin-Konzentration im Plasma durch eine zusätzliche lokale Renin-Produktion in der Niere ausgleichen. Da die Gesamtexpression von Renin mRNA im Gewebe der PDGFR β Ren KO Mäuse niedriger ist als bei PDGFR β Ren WT Mäuse, kann das fehlende interstitielle Renin der PDGFR β Ren KO Mäuse offensichtlich nur teilweise durch tubuläres Renin kompensiert werden. Es ist bekannt, dass die Produktion von lokalem Renin aus Tubuluszellen die Nierenschädigung bei Diabetes fördert [213]. Möglicherweise produzieren die PDGFR β Ren KO Mäuse unter Kontrollbedingungen vermehrt tubuläres Prorenin. Durch den Einsatz der Masson-Goldner Färbung konnte belegt werden, dass die PDGFR β Ren KO Mäuse unter physiologischen Bedingungen einen erhöhten Fibroseanteil in der Niere im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Mäusen aufweisen, was zu dieser Hypothese passen würde. Zudem könnte die Tatsache, dass PDGFR β Ren KO Mäuse tendenziell höhere Renin-Konzentrationen im Urin aufweisen als PDGFR β Ren WT Mäuse, ein weiterer Hinweis dafür sein, dass PDGFR β Ren KO Tiere mehr tubuläres Renin produzieren. Im Allgemeinen kann Renin im Urin aus zwei verschiedenen Quellen stammen:

Aus [192,213,214]:

1.) Plasma-Renin bzw. Prorenin, das im Glomerulus filtriert wird und nicht vollständig vom proximalen Tubulus rückresorbiert wird

2.) Renin bzw. Prorenin, das lokal vom Tubulus produziert und freigesetzt wird

Da die PDGFR β Ren KO Tiere sowohl niedrigere Renin, als auch Prorenin Konzentrationen im Plasma aufweisen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die tendenziell höheren Renin-Konzentrationen im Urin der PDGFR β Ren KO Mäuse durch eine stärkere Filtration von (Pro)-Renin bedingt sind. Es ist daher wahrscheinlicher, dass es zu einer verstärkten Freisetzung aus den Tubuli kommt.

Interessant ist die Erkenntnis, dass bei PDGFR β Ren KO Mäusen der Anstieg der Plasma Renin- Konzentration durch eine akute Stimulation mit Isoproterenol geringer war als bei PDGFR β Ren WT Mäusen. Isoproterenol wirkt über β 1 und β 2 adrenerge Rezeptoren [180]. Durch Aktivierung der Beta Rezeptoren, deren Aufgabe die Signalübertragung im sympathischen Nervensystem ist, kommt es in der Niere zur Renin-Freisetzung [215]. Der β 1 Rezeptor ist für die Renin-Freisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen verantwortlich, der dort durch den intrazellulären Anstieg des cAMP Spiegels die Renin-Sekretion fördert [216]. Entsprechend der großen Rolle von β -Rezeptoren für die Renin-Freisetzung weisen Mäuse mit einem β 1/ β 2 Rezeptor Doppelknockout geringere Renin-Konzentrationen im Plasma und infolgedessen auch geringere Blutdruckwerte auf [64]. Die reduzierte Renin-Antwort auf die Stimulation mit Isoproterenol legt nahe, dass der β -Rezeptor nicht nur in den juxtaglomerulären Zellen, sondern auch in den interstitiellen Zellen zur Kontrolle der Renin-Freisetzung beiträgt. Daraus ist zu entnehmen, dass die Renin Freisetzung aus PDGFR β Zellen offensichtlich durch adrenerge β Rezeptoren stimuliert werden kann. Ferner liefert dies einen weiteren Hinweis dafür, dass PDGFR β Zellen in der Lage sind Renin zu speichern und durch die regulierte Exozytose freizusetzen. Die schwache Immunfluoreszenzfärbung von Renin in den medullären PDGFR β Zellen, spricht allerdings eher dafür, dass diese Zellen hauptsächlich auf dem konstitutiven Weg Prorenin freisetzen. Möglicherweise sind es vor allem die perivaskulären PDGFR β Zellen im Bereich des juxtaglomerulären Apparats, die durch Isoproterenol zur Renin-Freisetzung stimuliert werden. Bei den mit Isoproterenol behandelten Tieren konnte aus methodischen Gründen die Plasma Prorenin-Konzentration nicht gemessen werden. Aufgrund der sehr hohen Renin-Konzentrationen mussten die Plasmaproben stark verdünnt werden, um innerhalb des Messbereichs des ANG I ELISAs zu bleiben. Durch die starke Vorverdünnung der Proben war das Prorenin nicht mehr nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass Prorenin bei akuter Stimulation wahrscheinlich nicht proportional zum aktiven Renin ansteigt. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Derkx et al. gemacht, die zeigten, dass Isoproterenol bei Menschen das aktive, aber nicht das inaktive Renin im Plasma erhöht. Isoproterenol führt sogar zu einer Abnahme von Prorenin im Plasma [217]. Schließlich bleibt die Frage welche Stimuli neben der β 1-Adrenorezeptor-vermittelten Stimulation für die Renin-Freisetzung der PDGFR β Zellen auf

zellulärer Ebene verantwortlich ist. Passend zur zellulären Wirkung des β 1-Adrenorezeptors konnten Stefanska et al in kultivierten humanen Perizyten die Renin-Induktion durch den cAMP Induktor Forskolin, sowie den Hemmstoff des cAMP Abbaus IBMX nachweisen [135]. Zellkulturversuche mit primären PDGFR β Zellen aus der Mausniere können die cAMP vermittelte Renin-Produktion bestätigen (siehe Ergebnis-Teil). Sowohl Forskolin als auch IBMX stimulieren die Renin-Produktion in diesen Zellen. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass in den PDGFR β -Zellen sowohl Adenylatzyklen zur Synthese von cAMP als auch Phosphodiesterasen zum Abbau von cAMP vorhanden sind. Welche Isoformen hierbei von funktioneller Bedeutung sind, muss in künftigen Untersuchungen geklärt werden. Letztendlich führt eine höhere cAMP Konzentration in den PDGFR β Zellen zu einer gesteigerten Renin-Produktion. Ein Hormon mit großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung in der Niere, das über cAMP wirkt, ist Prostaglandin E₂ (PGE₂). PGE₂ stimuliert über die EP2- und EP4-Rezeptoren der E-Typ-Prostanoid (EP)-Rezeptorfamilie die Synthese von cAMP [78]. Die PGE₂ -Produktion ist unter Diabetes mellitus erhöht [218] EP2 und EP4 Rezeptoren werden zudem von interstitiellen Zellen der Niere exprimiert [219]. Die Ergebnisse meiner qPCR-Daten bestätigen eine hohe Expression von EP2- und EP4-Rezeptoren in kultivierten PDGFR- β -Zellen, während die Expression von EP1- und EP3-Rezeptoren in diesen Zellen nur sehr gering ist (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation mit PGE₂ führt zu einem signifikanten Anstieg der Renin mRNA Konzentration in PDGFR β Zellen. Dieser Anstieg wird durch die gleichzeitige Blockade der Phosphodiesterasen weiter verstärkt, so dass sich schlussfolgern lässt, dass PGE₂ in PDGFR β Zellen die Produktion von Renin über Aktivierung des cAMP-Signalwegs stimuliert. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise gemeinsam mit anderen freigesetzten Entzündungsfaktoren und Hormonen bei chronischen Nierenerkrankungen den Anstieg der Renin-mRNA-Expression in interstitiellen Zellen der Niere erklären.

Es bleibt abschließend die Frage offen, ob die Regulation der Renin mRNA in isolierten PDGFR β Zellen auch von entsprechenden Veränderungen der Renin- oder Prorenin-Freisetzung begleitet wird. Die dazu notwendigen Zellkulturexperimente werden Gegenstand späterer Untersuchungen sein.

5.2. Regulation und funktionelle Bedeutung von Renin aus interstitiellen Zellen der Niere bei chronischer Nierenschädigung

Bei Entzündungs- und Fibroseprozessen in der Niere gewinnt das renale Interstitium zunehmend an Bedeutung. Pathologische Zustände in der Niere führen zur Aktivierung einer Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren. Diese Signalmoleküle haben direkte Auswirkungen auf die interstitiellen Zellen und bewirken unter anderem die Differenzierung der residenten Fibroblasten zu Myofibroblasten [220]. Möglicherweise können auch Perizyten und Fibrozyten zu Myofibroblasten differenzieren. In einer Studie von Lin et al., bei der in Mäusen

eine Fibrose durch eine Harnleiterobstruktion induziert wurde, wird gezeigt, dass Perizyten die Hauptquelle der interstitiellen Myofibroblasten in fibrotischen Nieren darstellen [221]. Myofibroblasten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression der Nierenfibrose [222]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sie bei Nierenschädigungen für die gesteigerte Expression von Renin im renalen Interstitium verantwortlich sind. Miyauchi et al zeigt in murinen Nieren, dass die Anzahl der Renin positiven interstitiellen Zellen mit dem Fortschreiten der Fibrose zunimmt [136]. Diese Induktion von Renin erfolgt durch α SMA-positive Myofibroblasten, die sich im geschädigtem Tubulointerstitium der Niere bilden. Eine erhöhte Produktion von interstitiellem Renin kann nicht nur in der Maus, sondern auch beim Menschen mit einer chronischen tubulointerstitiellen Nephritis beobachtet werden. Folglich könnte die Aktivierung des interstitiellen Renins nicht nur im Mausmodell, sondern auch beim Menschen eine bedeutende Rolle spielen [136]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gesteigerte Expression von Renin mRNA in renalen, interstitiellen Zellen in Mäusen unter chronischen Nierenerkrankungen wie der Adeninnephropathie und der diabetischen Nephropathie nachgewiesen. Bei Betrachtung der Renin mRNA auf den Nierenschnitten zeigt sich unter Schädigungsbedingungen eine starke Zunahme von Renin in den medullären PDGFR β Zellen der PDGFR β Ren WT Mäuse. Die Expression der Renin mRNA im Interstitium nimmt vor allem entlang der Blutgefäße deutlich zu. Dies lässt vermuten, dass insbesondere die Perizyten für den Anstieg von Renin mRNA im Interstitium unter pathologischen Zuständen verantwortlich sind. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um zu unterscheiden, ob die Perizyten in ihrer Ursprungsform oder erst als differenzierte Myofibroblasten Renin produzieren. Die PDGFR β Ren KO Mäuse hingegen exprimieren unter Kontrollbedingungen, sowie unter Schädigungsbedingungen wie erwartet kaum interstitielles Renin.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die beiden verschiedenen Nierenschädigungsmodelle (Adeninnephropathie und diabetische Nephropathie) im Hinblick auf das interstitielle Renin näher betrachtet. Der Fokus liegt dabei zunächst auf der Adeninnephropathie:

Die qPCR-Daten der inneren Medulla zeigen, dass die Renin mRNA Konzentration unter einer Adenin-Nephropathie bei PDGFR β Ren WT Tiere ansteigt. Höchstwahrscheinlich ist dieser Anstieg verantwortlich für den Prorenin Anstieg im Plasma der Tiere unter Schädigungsbedingungen. Sowohl die Konzentration der Renin-mRNA in der inneren Medulla als auch die Prorenin-Konzentration im Plasma der PDGFR β Ren KO Mäuse bleiben unter Schädigungsbedingungen unverändert. Diese Ergebnisse, zusammen mit den RNA-Scope Befunden, lassen den Schluss zu, dass unter einer Adenin-Nephropathie ausschließlich die PDGFR β positiven Zellen für den Anstieg der Renin mRNA in der Medulla und den damit verbundenen Anstieg von Prorenin im Plasma verantwortlich sind. Möglicherweise könnte der Renin mRNA Anstieg aber zusätzlich auch die (Pro)-Renin Konzentration in der Niere erhöht haben und somit Auswirkungen auf das lokale RAAS in der Niere ausüben. Es bedarf weiteren

Untersuchungen, um diese Frage zu beantworten. Weder auf den Nierenschnitten der PDGFR β Ren WT noch der PDGFR β Ren KO Mäuse unter einer Adeninnephropathie ist eine deutliche Renin mRNA-Signal in den Tubuluszellen festzustellen. Basierend auf dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass nach drei Wochen Adenin-Futtergabe die lokale tubuläre Renin-Produktion keine wesentliche Rolle spielt. Federlein et al. haben gezeigt, dass unter diabetischen Bedingungen die Tubuluszellen für den Anstieg von Prorenin im Plasma verantwortlich sind. [142,213]. Aufgrund des fehlenden Anstiegs von Prorenin im Plasma der PDGFR β Ren KO Mäuse kann man davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt der Adeninnephropathie keine verstärkte Renin-Produktion in den Tubuluszellen stattfindet. Allerdings kann dadurch nicht ausgeschlossen werden, dass PDGFR β Ren KO Tiere unter einer Adenin-Nephropathie, wie auch möglicherweise schon unter physiologischen Bedingungen, mehr Tubulus-Renin produzieren als PDGFR β Ren WT Tiere. Trotz des vollständigen Ausbleibens des Prorenin-Anstiegs im Plasma der PDGFR β Ren KO Mäuse wurde bei diesen Tieren eine stärkere Reduktion der Renin-Konzentration im Plasma im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Adenin Tieren beobachtet. Die Ergebnisse der Renin-Färbung (siehe Ergebnis-Teil) deuten darauf hin, dass der Rückgang der Renin-Konzentration wahrscheinlich auf eine Abnahme des juxtaglomerulären Renins beruht. Die Tatsache, dass bei den PDGFR β Ren KO Adenin-Tieren die Fläche der juxtaglomerulären Renin-Färbung und gleichzeitig auch die Renin-Konzentration im Plasma im Vergleich zu PDGFR β Ren KO-Kontrolltieren um etwa 50 % fällt, stärkt die Hypothese, dass die juxtaglomerulären Zellen für den Rückgang der Renin-Konzentration im Plasma verantwortlich sind. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die PDGFR β Ren KO Mäuse die fehlende Renin/Prorenin-Produktion unter einer Adeninnephropathie nicht durch die juxtaglomerulären Zellen kompensieren. Auch die PDGFR β Ren WT Tiere verzeichnen einen Rückgang der Reninfärbung und eine Abnahme der Renin-Konzentration im Plasma. Vermutlich erfolgt der Rückgang der Renin-Konzentration bei beiden Genotypen aus kompensatorischen Gründen, da der systolische Blutdruck unter einer Adenin-Nephropathie ansteigt [223]. Bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen gibt es verschiedene Hauptursachen für Bluthochdruck. Neben der Aktivierung des RAAS, insbesondere des lokalen RAAS [224], spielen auch ein erhöhtes Blutvolumen aufgrund von Schädigungen der Nephrone sowie die Entwicklung von Gefäßverkalkungen eine entscheidende Rolle bei der Hypertonie im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen. Letztere resultieren aus strukturellen Veränderungen der Arterienwand, die durch langanhaltenden Bluthochdruck verursacht werden und schließlich zu einer Abnahme der Gefäßelastizität führen. Diese Gefäßverkalkungen können zur Entwicklung einer isolierten systolischen Hypertonie beitragen [225,226]. Ähnlich wie im Hypotonie-Modell der Mäuse zeigt sich auch im Nierenschädigungsmodell, dass die Renin-Produktion aus den interstitiellen Zellen unabhängig von der Renin-Produktion der juxtaglomerulären Zellen erfolgt. Sowohl PDGFR β Ren WT Adenin Tiere als auch PDGFR β Ren KO Adenin Tiere

produzieren unter Schädigungsbedingungen aktives Renin aus juxtaglomerulären Zellen. Die deutlich niedrigere Konzentration von aktivem Renin im Plasma von PDGFR β Ren KO Adenin Mäusen im Vergleich zu PDGFR β Ren WT Adenin-Tieren legt nahe, dass dieser Unterschied zwischen den beiden Genotypen auf die Renin-Produktion durch PDGFR β -positive Zellen zurückzuführen ist. Es ist wahrscheinlich, dass PDGFR β Ren WT Adenin Tiere unter einer Adeninnephropathie weiterhin aktiv Renin freisetzen, möglicherweise sogar vermehrt. Im Gegensatz dazu kann angenommen werden, dass die Renin-Produktion aus juxtaglomerulären Zellen unter einer Adeninnephropathie abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Reninsekretion aus PDGFR β -positiven Zellen anders erfolgt als die aus juxtaglomerulären Zellen. Es scheint, dass die Freisetzung von Renin aus interstitiellen Zellen nicht durch einen erhöhten Blutdruck inhibiert, sondern möglicherweise sogar stimuliert wird. Dies könnte auf die unterschiedliche Regulation der Renin-Gen-Transkription in rekrutierten glatten Muskelzellen im Vergleich zu interstitiellen Fibroblasten zurückzuführen sein [136].

Im Folgenden werde ich das interstitielle Renin im Zusammenhang mit der diabetischen Nephropathie betrachten und es mit dem Adeninmodell vergleichen. Die diabetische Nephropathie ist gekennzeichnet durch eine Expression von Renin in den Tubuluszellen der PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Mäuse. Es ist bereits bekannt, dass unter einer diabetischen Nephropathie vor allem die Sammelrohre in der Niere Renin exprimieren [227]. Interessanterweise wird bei der qPCR-Analyse in der Niere beider Genotypen keine Zunahme der Renin mRNA Konzentration festgestellt. Dies könnte darauf hindeuten, dass gleichzeitig mit der Zunahme der Renin mRNA in den tubulären Zellen eine Abnahme der juxtaglomerulären Renin-Expression unter diabetischen Bedingungen auftritt [214]. Es ist verwunderlich, dass nicht nur im Cortex, wo sich die juxtaglomerulären Zellen befinden, sondern auch in der Medulla der STZ-Tiere keine Erhöhung der Renin mRNA beobachtet wird. Dies könnte auf eine Verunreinigung der Medulla mit kortikalen Bereichen der Niere zurückzuführen sein, die aufgrund der makroskopischen Zonierung der Nieren der Kontrolltiere und STZ-Tiere aufgetreten ist. Diese Verunreinigung könnte dazu geführt haben, dass der Renin mRNA Anstieg in der Medulla bei den STZ-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen nicht mehr detektierbar war. Es ist interessant zu beobachten, dass Mäuse unter diabetischen Bedingungen nicht nur eine erhöhte Expression von Renin in den Tubuluszellen, sondern auch in den interstitiellen Zellen aufweisen [142]. Dies wurde auch bei PDGFR β Ren WT Mäusen unter diabetischen Bedingungen beobachtet. Möglicherweise könnte das tubuläre Renin auch die Freisetzung von interstitiellem Renin verstärken. Die Aktivierung des tubulären Renins und die daraus resultierende erhöhte intrarenale ANG II-Konzentration führen zur Infiltration von Immunzellen und zur Produktion von Chemokinen [228]. Darüber hinaus bewirkt die Bindung von ANG II an den AT1-Rezeptor eine verstärkte Freisetzung von TGF- β , was zu einer Tubuluszellhypertrophie und interstitieller Vernarbung führt [229]. Es wurde auch beobachtet, dass TGF- β die Expression von alpha-

SMA-mRNA in Myofibroblasten fördert, was eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Myofibroblasten spielt [230]. Kürzlich wurde entdeckt, dass diese Myofibroblasten für die Induktion von interstitiellem Renin bei Nierenschädigungen verantwortlich sind [136]. Dies legt nahe, dass möglicherweise aufgrund der Aktivierung des tubulären Renins eine verstärkte Freisetzung von interstitiellem Renin stattfindet. Zudem deutet einiges darauf hin, dass tubuläres und interstitielles Renin auch durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Insbesondere im diabetischen Modell scheint die Aktivierung des tubulären Renins in erster Linie auf hyperglykämische Zustände zurückzuführen zu sein [142,231]. Möglicherweise ist dies der Grund, warum im Adenin-Modell kein deutliches tubuläres Renin-Signal festgestellt wurde. Die genauen Mechanismen der Aktivierung des interstitiellen Renins sind jedoch noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden Zellkulturversuche durchgeführt, bei denen festgestellt wurde, dass PDGFR- β -positive Zellen durch PGE₂-vermitteltes cAMP die Renin-Produktion stimuliert. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass es noch weitere Entzündungs-Zytokine/Hormone gibt, die die interstitielle Renin-Freisetzung fördern.

Gemäß den Ergebnissen aus dem Adenin-Modell trägt die Zunahme des interstitiellen Renins zur Erhöhung des Prorenins im Plasma der PDGFR β Ren WT Tieren bei. Es ist bekannt, dass nicht nur das interstitielle Renin, sondern auch das tubuläre Renin für einen Anstieg des Prorenins im Plasma verantwortlich ist [213]. Im Vergleich zu den basalen Prorenin Plasma Werten, steigt bei den diabetischen PDGFR β Ren WT Tieren die Prorenin-Konzentration um das 1,9-fache an. Schließlich führt unter diabetischen Bedingungen auch das tubuläre Renin bei den PDGFR β Ren KO Mäusen zu einem Prorenin-Anstieg im Plasma. Bei den PDGFR β Ren KO Tieren unter diabetischen Bedingungen kommt es zu einem 2,6-fachen Anstieg der Prorenin-Konzentration im Plasma. Daraus wird ersichtlich, dass bei diabetischen Tieren das Tubulus-Renin möglicherweise stärker aktiviert wird, als das interstitielle Renin und dadurch einen größeren Prorenin-Anstieg im Plasma der PDGFR β Ren KO Tiere bewirkt. Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass die PDGFR β Ren KO Tiere unter diabetischen Bedingungen verstärkt tubuläres Renin freisetzen, um das interstitielle Renin zu kompensieren. Dafür sprechen auch die tendenziell höheren Renin-Konzentrationen im Urin der PDGFR β Ren KO-Tiere unter STZ-Bedingungen.

Auch unter einer diabetischen Nephropathie kommt es bei beiden Genotypen zu einem Abfall der Renin-Konzentration im Plasma. Dies steht im Gegensatz zu Tieren, die im Tubulussystem einen Renin-KO aufweisen. Sie verzeichnen unter diabetischen Zustand eine höhere Konzentration von aktivem Renin im Plasma. Die Erklärung hierfür ist die unterdrückte lokale ANG II-Konzentration der Tubulus-Renin-KO-Tiere, die auf die fehlende Renin-Produktion in den Tubuluszellen zurückzuführen ist. Die Unterdrückung der ANG II Konzentration kann sich wiederum aktivierend auf die juxtaglomeruläre Renin-Produktion auswirken [142]. Dies legt nahe, dass das tubuläre Renin unter diabetischen Bedingungen möglicherweise eine stärkere lokale

Wirkung in der Niere zeigt, in dem das intrarenal gebildete ANG II der Tubulus-Zellen direkt die Renin Freisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen reguliert. Die Nähe der Renin-bildenden Perizyten zu den Blutgefäßen lässt darauf schließen, dass das interstitielle Renin unmittelbar in die Blutbahn freigesetzt wird und möglicherweise weniger lokale Wirkung in der Niere zeigt. Daraus lässt sich möglicherweise ableiten, dass das lokal gebildete ANG II einen stärkeren Effekt auf die juxtaglomerulären Zellen hat, als das systemische ANG II.

Bei den diabetischen PDGFR β Ren KO Tieren ist ein stärkerer Abfall der Renin-Konzentrationen zu verzeichnen als bei den PDGFR β Ren WT Mäusen. In diesem Modell könnte der stärkere Rückgang der Renin-Konzentration im Plasma der PDGFR β Ren KO Tiere auf die möglicherweise stärkere Aktivierung des Tubulus-Renins zurückzuführen sein. Durch diese verstärkte Aktivierung des Tubulus-Renins wird die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen stärker gehemmt.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, besitzen die PDGFR β Ren KO Mäuse aufgrund des fehlenden interstitiellen Renins einen niedrigeren Blutdruck. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die PDGFR β Ren KO Tiere auch unter pathologischen Bedingungen einen niedrigeren systemischen Blutdruck aufweisen. Sowohl unter einer Adeninnephropathie als auch unter einer diabetischen Nephropathie weisen die PDGFR β Ren KO Mäuse niedrigere Herzgewichte auf. Schon unter physiologischen Bedingungen, verringert sich nach 15 Wochen das Herzgewicht der PDGFR β Ren KO Tiere höchstwahrscheinlich infolge des niedrigeren Blutdrucks. Bei den PDGFR β Ren WT und PDGFR β Ren KO Kontrolltieren kann noch kein Unterschied hinsichtlich des Herzgewichts festgestellt werden, möglicherweise aufgrund der noch zu kurzen Zeitspanne seit der Induktion der Gendeletion, um eine Reduktion des Herzgewichts unter physiologischen Bedingungen zu bewirken. Hingegen war bei den PDGFR β Ren KO Mäusen unter den beiden Schädigungsmodellen eine deutliche Reduktion des Herzgewichts im Vergleich zu PDGFR β Ren WT Tieren und PDGFR β Ren KO Kontrolltieren erkennbar. Das Herzgewicht der PDGFR β Ren WT Tiere bleibt unter Schädigungsbedingungen im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Kontrolltieren unverändert. Bei der Betrachtung und dem Vergleich funktioneller Parameter unter Schädigungsbedingungen sollte der Aspekt des unterschiedlichen systemischen Blutdrucks der beiden Genotypen berücksichtigt werden. Darüber hinaus weisen PDGFR β Ren KO Tiere unter physiologischen Bedingungen leicht erhöhte Fibrosewerte auf, möglicherweise aufgrund einer verstärkten tubulären Renin-Produktion. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass sie unter pathologischen Bedingungen verstärkt tubuläres Renin bilden. Auch dieser Aspekt sollte in Betracht gezogen werden.

Ein häufig verwendetes Maß für Schädigungen bei chronischen Nierenerkrankungen ist die Albuminurie. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt wurde, deutet eine erhöhte Albuminurie auf eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere hin. Diese Barriere weist eine hohe Selektivität in Bezug auf Größe und Ladung von Stoffen auf, wodurch die Filtration von Albumin

nahezu vollständig verhindert wird. Geringere Mengen an filtriertem Albumin werden größtenteils durch den Megalin-Cubulin-Komplex im proximalen Tubulus rückresorbiert und dort abgebaut. Eine Überschreitung der Transportkapazität im proximalen Tubulus führt zur Entstehung von Albuminurie [232]. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt wurde, ist bei diabetischer Nephropathie vor allem die Schädigung der Podozyten für eine ausgeprägte Albuminurie verantwortlich [195]. Im Adenin-Modell hingegen wird vorwiegend das Tubulointerstitium geschädigt, weshalb es nicht überraschend ist, dass die Tiere unter einer Adenin-Nephropathie eine milderne Albuminurie aufweisen als unter diabetischen Bedingungen [194]. Cao et al. zeigten, dass eine verstärkte Exposition von Albumin gegenüber proximalen Tubuluszellen zur Aktivierung des intraproximalen tubulären RAAS führen kann [233]. Im Diabetes Modell konnte man eine stärkere Albuminurie gegenüber der Adenin-Nephropathie erkennen. Möglicherweise ist dies ein weiterer Grund dafür, dass im Diabetes-Modell das tubuläre Renin stärker aktiviert wird als im Adenin-Modell. Darüber hinaus verschlechtert die erhöhte Aktivität des proximalen tubulären RAAS die Aufnahme von Albumin in den proximalen Tubulus, was zu einer weiteren Zunahme der Albuminurie führt [234,235]. Unter physiologischen Bedingungen weisen die PDGFR β Ren KO Tiere höhere Albuminkonzentrationen im Urin auf als die PDGFR β Ren WT Tiere. Möglicherweise ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass bei den PDGFR β Ren KO Mäusen schon unter physiologischen Bedingungen das tubuläre RAAS stärker aktiviert wird. Unter pathologischen Bedingungen besteht kein Unterschied hinsichtlich der Albuminurie zwischen den beiden Genotypen. Dies legt nahe, dass das interstitielle Renin keinen Einfluss auf die Albuminaufnahme im Urin hat.

Die Anreicherung von Fibronectin stellt eines der frühesten Ereignisse bei der Entwicklung von Nierenfibrose dar. Als adhäsives Glykoprotein spielt es eine Rolle bei der Organisation der extrazellulären Matrix (ECM) [236,237]. Obwohl verschiedene Zelltypen in der Niere, wie Tubulusepithelzellen, glatte Muskelzellen, Blutgefäße und eine Untergruppe von Makrophagen, in der Lage sind, ECM zu produzieren, werden Fibroblasten gemeinhin als die wichtigsten Zellen angesehen, die eine beträchtliche Menge an interstitiellen Matrixkomponenten erzeugen, darunter Fibronectin sowie Kollagene des Typ I und III [238]. PDGFR β Ren KO Mäuse im Vergleich zu PDGFR β Ren WT Mäusen weisen unter einer Adenin-Nephropathie geringere Mengen an Fibronectin mRNA in der Niere auf. Es wäre durchaus denkbar, dass die interstitiellen Zellen durch die lokale Renin-Produktion autokrine Wirkung zeigen und dadurch verstärkt Matrixkomponenten bilden. Interessanterweise ergab die Masson-Goldner Färbung keine geringere Fibrose-Färbung bei den PDGFR β Ren KO Tieren, was an der eher geringen Sensitivität der Methode liegen könnte. Diese Diskrepanz könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die extrazelluläre Matrix (ECM), die letztendlich zur Fibrose führt, nicht nur aus Fibronectin, sondern hauptsächlich auch aus Kollagenen besteht [239]. PDGFR β Ren KO Tiere weisen unter Schädigungsbedingungen keine klare Reduktion der Kollagen-I- und -III-mRNA-

Konzentration in der Niere im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Tieren auf. Insgesamt war die Fibrose nach einer dreiwöchigen Fütterung mit Adenin noch nicht stark ausgeprägt, möglicherweise hätte man zu einem späteren Zeitpunkt einen deutlicheren Unterschied zwischen den Genotypen gesehen. Dagegen ist Fibronectin das erste ECM-Protein, das bei der Entstehung von Fibrose abgelagert wird [236]. Daher ist es nicht überraschend, dass bereits zu diesem Zeitpunkt der Adeninnephropathie eine erhöhte Expression von Fibronectin zu beobachten ist. Obwohl diese Daten mit einer direkten Wirkung des lokalen interstitiellen Renins auf die Fibroseentstehung kompatibel sind, ist es auch denkbar, dass die erhöhten Fibronectin-Werte auf den möglicherweise höheren Blutdruck der PDGFR β Ren WT Tieren unter Schädigungsbedingungen zurückzuführen sind.

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist der zentrale Parameter der Nierenfunktion. Sowohl die GFR als auch die Albuminurie sind aussagekräftige Maße für die Erkennung und Klassifizierung von akuten und chronischen Nierenerkrankungen sowie für die Vorhersage des Fortschreitens der Nierenschädigung. Die GFR spiegelt die Gesamtleistung der Nephrone wider [240]. Mit zunehmendem Alter und bei Nierenerkrankungen nimmt die Anzahl der Nephrone ab [241]. Physiologisch gesehen kann der resultierende Rückgang der GFR durch eine erhöhte GFR eines einzelnen Nephrons (Hyperfiltration eines einzelnen Nephrons) kompensiert werden, was den Gesamtrückgang der GFR abschwächen kann. Im Laufe der Zeit kann dies jedoch zu einer hämodynamischen Schädigung der verbleibenden Nephrone und einem beschleunigten Fortschreiten der Nierenerkrankung führen [240]. Die diabetische Nephropathie ist durch die diabetische Stoffwechsellage in der frühen Phase durch einen Anstieg der GFR (Hyperfiltration) gekennzeichnet. Im Verlauf der Schädigung kehrt die GFR zunächst auf Normwerte zurück (Phase 2) und nimmt dann kontinuierlich ab, bis die Hypofiltration eintritt [242]. Die PDGFR β Ren WT STZ und PDGFR β Ren KO STZ Mäuse befinden sich höchstwahrscheinlich in Phase 2, es zeigt sich kein Unterschied zwischen der Ausgangs-GFR und der GFR unter diabetischen Bedingungen.

Unter einer Adenin-Nephropathie zeigt sich bei beiden Genotypen eine signifikante Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Interessanterweise zeigen die PDGFR β Ren KO Adenin Tiere im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Adenin Tieren eine geringere Reduktion der GFR. Somit hat der interstitielle Renin KO einen Einfluss auf die Nierenfunktion der Tiere. Es besteht jedoch ein starker Zusammenhang zwischen dem Blutdruckniveau (insbesondere dem systolischen Blutdruck) und der GFR [243]. Somit könnte die mildere Reduktion der GFR bei den PDGFR β Ren KO Adenin Tieren auf den möglicherweise niedrigeren Blutdruck zurückzuführen sein. Es ist auch denkbar, dass der geringere Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei den PDGFR β Ren KO Tieren mit den niedrigeren Fibronectin-Werten in Verbindung steht. Fibronectin ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und seine Anreicherung kann zur Verdickung der Basalmembranen in den Glomeruli und Tubuli führen, was

letztendlich bei den meisten Nierenerkrankungen zu Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose führt. Fibronectin spielt auch eine wichtige Rolle im Glomerulus, indem es an der Zell-zu-Zell-Bindung beteiligt ist [244,245]. Eine erhöhte Fibronectinmenge könnte möglicherweise zu einer verstärkten Zelladhäsion und Matrixreorganisation im Glomerulus führen, was die glomeruläre Filtrationsrate beeinträchtigen könnte. Daher könnten niedrigere Fibronectin-Werte auf eine geringere Nierenschädigung hinweisen, was sich positiv auf die GFR auswirken könnte. Wie bereits erwähnt, werden Fibroblasten und perivaskuläre Perizyten während des Prozesses der Fibrogenese aktiviert. Dabei nehmen sie einen myofibroblastischen Phänotyp an, der durch die Expression von α SMA gekennzeichnet ist. Gleichzeitig geht die Aktivierung der Fibroblasten mit einer Infiltration von Entzündungszellen, wie Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen, einher. Es wird vermutet, dass diese Entzündungszellen möglicherweise der Fibrogenese vorausgehen [246]. Unter einer Adenin-Nephropathie wurde ein deutlicher Anstieg von F4/80 mRNA und Protein beobachtet. Die quantitativen PCR-Daten zeigen, dass PDGFR β Ren KO Tiere eine geringere Expression der F4/80 mRNA unter Schädigungsbedingungen aufweisen. Allerdings kann auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbung kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen in Bezug auf die F4/80-Proteinexpression festgestellt werden. Diese Diskrepanz könnte auf verschiedene Regulationsmechanismen in der Transkription, Translation und dem Proteinabbau im Gewebe zurückzuführen sein, die dazu führen, dass mRNA in einem Gewebe nachgewiesen wird, das entsprechende Protein jedoch nicht. Zusätzlich könnte der Zeitpunkt der Analyse eine Rolle spielen, da die F4/80 mRNA Konzentration in den beiden Genotypen zu einem bestimmten Zeitpunkt unterschiedlich sein könnte, während sich dieser Unterschied auf Proteinebene erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert. Proteine benötigen eine längere Zeit, um produziert, modifiziert und akkumuliert zu werden. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Renin-produzierenden interstitiellen Zellen nicht nur in Bezug auf Renin, sondern auch in Bezug auf Immunzellen einen bedeutenden systemischen Einfluss besitzen. Angesichts der Hinweise auf den systemischen Einfluss der PDGFR β Zellen wäre es sinnvoll, die beiden Genotypen nicht nur in Bezug auf die Niere, sondern auch in Bezug auf andere Organe unter Schädigungsbedingungen miteinander zu vergleichen. Bei einer diabetischen Nephropathie zeigt sich kein Unterschied in der Expression von Fibronectin und F4/80 mRNA zwischen den beiden Genotypen. Dies könnte darauf hindeuten, dass das interstitielle Renin unter diabetischen Bedingungen keinen bedeutenden schädigenden Einfluss auf die Niere hat, während die Hauptursache der Schädigung vom tubulären Renin ausgeht. Zudem ist es möglich, dass die PDGFR β Ren KO Tiere tubuläres Renin produzieren, um den Mangel an interstitiellem Renin auszugleichen. Um die funktionelle Bedeutung des interstitiellen Renins genauer zu untersuchen, wäre es ratsam, das Adenin-Modell zu verwenden, da in diesem Modell das tubuläre Renin höchstwahrscheinlich

keinen bedeutenden schädigenden Einfluss auf die Niere hat und die schädigende Wirkung vor allem vom interstitiellen Renin ausgeht.

6 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAAS) spielt eine entscheidende physiologische Rolle bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts sowie des Blutdrucks. Darüber hinaus trägt es maßgeblich zur Progression von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Nierenerkrankungen bei. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass das lokale RAAS bei diesen Erkrankungen aktiviert wird. In dieser Arbeit wurde herausgearbeitet, dass Renin nicht nur in den juxtaglomerulären Zellen, sondern auch in den interstitiellen Zellen der Niere exprimiert wird. Die Renin-produzierenden interstitiellen Zellen scheinen unabhängig von den juxtaglomerulären Zellen reguliert zu werden und könnten daher möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Regulation des lokalen RAAS in der Niere spielen. Da Renin produzierende interstitielle Zellen den PDGFR β exprimieren, wurde eine PDGFR β -Cre-Mauslinie verwendet, um eine zellspezifische Deletion von Renin in interstitiellen Zellen (PDGFR β -Cre/Ren KO) zu induzieren. Bereits unter physiologischen Bedingungen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. PDGFR β Ren KO Mäusen weisen geringere Renin-, Prorenin- und Aldosteron-Konzentrationen auf, sowie einen niedrigeren Blutdruck als PDGFR β Ren WT Mäuse. Insgesamt haben PDGFR β Ren KO Mäuse durch den interstitiellen Renin KO ein abgeschwächtes RAAS. Während die Zahl der Renin exprimierenden interstitiellen Zellen unter Kontrollbedingungen eher gering war, stieg sie bei PDGFR β Ren WT Mäusen unter einer Adeninnephropathie und einer diabetischen Nephropathie deutlich an (Renin-mRNA-in-situ-Hybridisierung). Wie erwartet, wird die Renin mRNA in den interstitiellen Zellen von PDGFR β Ren KO Mäusen weder unter Kontrollbedingungen noch unter Schädigungsbedingungen nachgewiesen. Die Adeninnephropathie und diabetische Nephropathie sind bei beiden Genotypen mit einer Suppression der Plasma-Renin-Konzentration verbunden. Im Gegensatz dazu ist die Plasmakonzentration von enzymatisch inaktivem Prorenin, das mit einem verstärkten Fortschreiten der Nierenerkrankung einhergeht, bei PDGFR β Ren WT Adenin Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen um das Dreifache erhöht. PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse verzeichnen keinen Prorenin Anstieg im Plasma. Unter diabetischen Bedingungen hingegen wird bei beiden Genotypen ein Anstieg von Prorenin im Plasma beobachtet, was durch die gleichzeitige Aktivierung des Tubulus-Renins unter diabetischen Bedingungen erklärt werden könnte. Um gezielt die Auswirkungen des interstitiellen Renins zu untersuchen, erweist sich daher das Adenin-Modell als geeigneter. Die PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse zeigen hinsichtlich glomerulärer Filtrationsrate (GFR) sowie in Bezug auf die Expression von Fibronectin und F4/80 mRNA eine geringere Nierenschädigung im Vergleich zu den PDGFR β Ren WT Adenin Mäusen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression von Renin in den PDGFR β -positiven interstitiellen Zellen unter Diabetes und einer Adeninnephropathie stimuliert wird und dies zu den zirkulierenden Renin- und Prorenin-Spiegeln im Plasma beiträgt. Die gezielte Deletion von Renin in den PDGFR β -positiven Zellen bei PDGFR β Ren KO Adenin Mäuse

verhindert den Anstieg von Prorenin im Plasma und führt zu einer Verbesserung der Nierenschädigung. Dies weist darauf hin, dass das interstitielle Renin ein krankheitsfördernder Faktor sein könnte.

7 Abstract

The renin-angiotensin system (RAAS) plays a crucial physiological role in the regulation of salt and water balance as well as blood pressure. It also contributes significantly to the progression of cardiovascular diseases and kidney diseases. There are numerous indications that the local RAAS is activated in these diseases. In this study it was shown that renin is expressed not only in the juxtaglomerular cells, but also in the interstitial cells of the kidney. The renin-producing interstitial cells appear to be regulated independently of the juxtaglomerular cells and could therefore possibly play an important role in the regulation of the local RAAS in the kidney. Since renin-producing interstitial cells express the PDGFR β , a PDGFR β -Cre mouse line (PDGFR β -Cre/Ren KO) was used to establish a cell-specific deletion of renin in interstitial cells. Even under physiological conditions there are clear differences between the two genotypes. PDGFR β Ren KO mice have lower renin, prorenin and aldosterone concentrations as well as lower blood pressure than PDGFR β Ren WT mice. Overall PDGFR β Ren KO mice have an attenuated RAAS due to the interstitial renin KO. While the number of renin-expressing interstitial cells was rather low under control conditions, it increased significantly in PDGFR β Ren WT mice under adenine nephropathy and diabetic nephropathy (renin mRNA in situ hybridization). As expected, renin mRNA is not detected in the interstitial cells of PDGFR β Ren KO mice under either control or damage conditions. Adenine nephropathy and diabetic nephropathy are associated with suppression of plasma renin concentration in both genotypes. In contrast, the plasma concentration of enzymatically inactive prorenin, which is associated with increased renal disease progression, is increased threefold in PDGFR β Ren WT adenine mice compared to healthy control mice. PDGFR β Ren KO adenine mice do not show an increase in prorenin in plasma. Under diabetic conditions, however, an increase of prorenin in plasma is observed in both genotypes, which could be explained by the simultaneous activation of tubule renin under diabetic conditions. The adenine model is therefore more suitable for specifically investigating the effects of interstitial renin. The PDGFR β Ren KO adenine mice show less renal damage in terms of glomerular filtration rate (GFR) and the expression of fibronectin and F4/80 mRNA compared to the PDGFR β Ren WT adenine mice. In conclusion, renin expression is stimulated in PDGFR β -positive interstitial cells under diabetes and adenine nephropathy, and this contributes to circulating plasma renin and prorenin levels. Targeted deletion of renin in the PDGFR β -positive cells in PDGFR β Ren KO adenine mice prevents the increase of prorenin in plasma and leads to amelioration of renal injury. This indicates that interstitial renin may be a disease-promoting factor.

8 Literatur

- [1] Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagel, S. (Hrsg.) (2014). Physiologie, 7. Aufl. Georg Thieme Verlag KG.
- [2] Brandes, R., Lang, F., Schmidt, R. F. (Hrsg.) (2019). Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit 850 Farabbildungen, 32. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [3] Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B. (Hrsg.) (2012). Anatomie, 6. Aufl. Pearson Deutschland GmbH.
- [4] Hick, C., Hick, A., Urban-&-Fischer-Verlag (2017). Kurzlehrbuch Physiologie. Elsevier.
- [5] Marks, L. S., Maxwell, M. H. (1979). Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension* **1**/4, 384–388.
- [6] Tigerstedt, R., Bergman, P. Q. (1898). Niere und Kreislauf1. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* **8**/1, 223–271.
- [7] Barajas, L. (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *The American journal of physiology* **237**/5, F333-43.
- [8] Persson, P. B. (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of physiology* **552**/Pt 3, 667–671.
- [9] Bell, P. D., Lapointe, J.-Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K.-I., Kovacs, G., Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**/7, 4322–4327.
- [10] THURAU, K., Schnermann, J. (1965). THE SODIUM CONCENTRATION IN THE MACULA DENSA CELLS AS A REGULATING FACTOR FOR GLOMERULAR FILTRATION (MICROPUNCTURE EXPERIMENTS). *Klinische Wochenschrift* **43**, 410–413.
- [11] Lorenz, J. N., Weihprecht, H., Schnermann, J., Skott, O., Briggs, J. P. (1991). Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **260**/4, F486-F493.
- [12] Lorenz, J. N., Weihprecht, H., Schnermann, J., Skott, O., Briggs, J. P. (1990). Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion. *The American journal of physiology* **259**/1 Pt 2, F186-93.
- [13] Friis, U. G., Madsen, K., Stubbe, J., Hansen, P. B. L., Svenningsen, P., Bie, P., Skott, O., Jensen, B. L. (2013). Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **465**/1, 25–37.
- [14] Gomez, R. A., Chevalier, R. L., Everett, A. D., Elwood, J. P., Peach, M. J., Lynch, K. R., Carey, R. M. (1990). Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **259**/4, F660-F665.

- [15] Müller, M. W. H., Todorov, V., Krämer, B. K., Kurtz, A. (2002). Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **444**/4, 499–505.
- [16] Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., Kurtz, A. (2007). Renin release. *Physiology (Bethesda, Md.)* **22**, 310–319.
- [17] Dickinson, D. P., Gross, K. W., Piccini, N., Wilson, C. M. (1984). Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* **108**/3, 651–667.
- [18] Abel, K. J., Gross, K. W. (1990). Physical characterization of genetic rearrangements at the mouse renin loci. *Genetics* **124**/4, 937–947.
- [19] Chirgwin, J. M., Schaefer, I. M., Diaz, J. A., Lalley, P. A. (1984). Mouse kidney renin gene is on chromosome one. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **10**/6, 633–637.
- [20] Wilson, C. M., Taylor, B. A. (1982). Genetic regulation of thermostability of mouse submaxillary gland renin. *Journal of Biological Chemistry* **257**/1, 217–223.
- [21] Borensztein, P., Germain, S., Fuchs, S., Philippe, J., Corvol, P., Pinet, F. (1994). cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circulation research* **74**/5, 764–773.
- [22] Kurtz, A. (2012). Control of Renin Synthesis and Secretion. *American Journal of Hypertension* **25**/8, 839–847.
- [23] Pentz, E. S., Lopez, Maria Luisa S Sequeira, Cordaillat, M., Gomez, R. A. (2008). Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**/2, H699-707.
- [24] Reudelhuber, T. L., Ramlal, D., Chiu, L., Mercure, C., Seidah, N. G. (1994). Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney international* **46**/6, 1522–1524.
- [25] Neves, F. A., Duncan, K. G., Baxter, J. D. (1996). Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* **27**/3 Pt 2, 514–517.
- [26] Brechler, V., Chu, W. N., Baxter, J. D., Thibault, G., Reudelhuber, T. L. (1996). A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* **271**/34, 20636–20640.
- [27] Mullins, L. J., Payne, C. M., Kotelevtseva, N., Brooker, G., Fleming, S., Harris, S., Mullins, J. J. (2000). Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *The Journal of biological chemistry* **275**/51, 40378–40384.
- [28] Cooper, M. E. (1998). Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet (London, England)* **352**/9123, 213–219.

- [29] Allen, T. J., Cao, Z., Youssef, S., Hulthen, U. L., Cooper, M. E. (1997). Role of angiotensin II and bradykinin in experimental diabetic nephropathy. Functional and structural studies. *Diabetes* **46**/10, 1612–1618.
- [30] Shu, Z., Wan, J., Read, R. J., Carrell, R. W., Zhou, A. (2021). Angiotensinogen and the Modulation of Blood Pressure. *Frontiers in cardiovascular medicine* **8**, 645123.
- [31] Matsusaka, T., Niimura, F., Shimizu, A., Pastan, I., Saito, A., Kobori, H., Nishiyama, A., Ichikawa, I. (2012). Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **23**/7, 1181–1189.
- [32] Kukida, M., Cai, L., Ye, D., Sawada, H., Katsumata, Y., Franklin, M. K., Hecker, P. I., Campbell, K. S., Danser, A. H. J., Mullick, A. E., Daugherty, A., Temel, R. E., Lu, H. S. (2021). Renal Angiotensinogen Is Predominantly Liver Derived in Nonhuman Primates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **41**/11, 2851–2853.
- [33] Nishiyama, A., Kobori, H. (2018). Independent regulation of renin–angiotensin–aldosterone system in the kidney. *Clinical and Experimental Nephrology* **22**/6, 1231–1239.
- [34] Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Höhle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., Zhu, Y. Z. (1996). Angiotensin receptors. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* **14**/5, S95–103.
- [35] Hunyady, L., Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) **20**/5, 953–970.
- [36] Sigmund, C. D., Gross, K. W. (1991). Structure, expression, and regulation of the murine renin genes. *Hypertension* **18**/4, 446–457.
- [37] Ames, M. K., Atkins, C. E., Pitt, B. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of veterinary internal medicine* **33**/2, 363–382.
- [38] Cesari, M., Rossi, G. P., Pessina, A. C. (2002). Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: implications for hypertension and cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* **20**/5, 793–799.
- [39] Benigni, A., Cassis, P., Remuzzi, G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine* **2**/7, 247–257.
- [40] Vukelic, S., Griendling, K. K. (2014). Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor: a paradigm shift. *Circulation research* **114**/5, 754–757.
- [41] Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., Acton, S. (2000). A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation research* **87**/5, e1-e9.

- [42] Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Dean, R. H., Iyer, S. N. (1998). Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **9**/9.
- [43] Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews* **98**/1, 505–553.
- [44] Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzhir, L., Giller, T., Sraer, J.-D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation* **109**/11, 1417–1427.
- [45] Schweda, F. (2015). Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **467**/3, 565–576.
- [46] Wynne, B. M., Chiao, C.-W., Webb, R. C. (2009). Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* **3**/2, 84–95.
- [47] Lin, Y.-J., Kwok, C.-F., Juan, C.-C., Hsu, Y.-P., Shih, K.-C., Chen, C.-C., Ho, L.-T. (2014). Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **451**/2, 263–269.
- [48] Koshimizu, T., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems. *Physiological Reviews* **92**/4, 1813–1864.
- [49] Palatini, P. (2001). Sympathetic overactivity in hypertension: a risk factor for cardiovascular disease. *Current Hypertension Reports* **3 Suppl 1**, S3-9.
- [50] DiBona, G. F. (2001). Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **940**, 395–406.
- [51] Wang, Y., Seto, S.-W., Golledge, J. (2014). Angiotensin II, sympathetic nerve activity and chronic heart failure. *Heart failure reviews* **19**/2, 187–198.
- [52] Garty, H. (2000). Regulation of the epithelial Na⁺ channel by aldosterone: Open questions and emerging answers. *Kidney international* **57**/4, 1270–1276.
- [53] Brewster, U. C., Perazella, M. A. (2004). The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American Journal of Medicine* **116**/4, 263–272.
- [54] Fountain, J. H., Kaur, J., Lappin, S. L. (2023). Physiology, Renin Angiotensin System. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- [55] Pimenta, E., Gordon, R. D., Stowasser, M. (2013). Salt, aldosterone and hypertension. *Journal of Human Hypertension* **27**/1, 1–6.
- [56] Harrison-Bernard, L. M. (2009). The renal renin-angiotensin system. *Advances in physiology education* **33**/4, 270–274.
- [57] Sandgren, J. A., Linggongoro, D. W., Zhang, S. Y., Sapouckey, S. A., Claflin, K. E., Pearson, N. A., Leidinger, M. R., Pierce, G. L., Santillan, M. K., Gibson-Corley, K. N., Sigmund, C. D., Grobe, J. L. (2018). Angiotensin AT(1A) receptors expressed in vaso-pressin-producing cells of the supraoptic nucleus contribute to osmotic control of vaso-pressin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **314**/6, R770-R780.
- [58] Verbalis, J. G. (2007). How does the brain sense osmolality? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**/12, 3056–3059.
- [59] René, P., Grino, M., Viollet, C., Videau, C., Jullian, E., Bucchini, D., Epelbaum, J., Bergagna, X., Keyzer, Y. de (2002). Overexpression of the V3 vasopressin receptor in transgenic mice corticotropes leads to increased basal corticosterone. *Journal of neuroendocrinology* **14**/9, 737–744.
- [60] Funder, J. W. (2016). The Potential of ACTH in the Genesis of Primary Aldosteronism. *Frontiers in Endocrinology* **7**.
- [61] Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., Wagner, C. (2010). Physiology of Kidney Renin. *Physiological Reviews* **90**/2, 607–673.
- [62] Hackenthal, E., Paul, M., Ganter, D., Taugner, R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiological Reviews* **70**/4, 1067–1116.
- [63] Bie, P., Mølstrøm, S., Wamberg, S. (2009). Normotensive sodium loading in conscious dogs: regulation of renin secretion during β -receptor blockade. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **296**/2, R428-R435.
- [64] Kim, S. M., Chen, L., Faulhaber-Walter, R., Oppermann, M., Huang, Y., Mizel, D., Briggs, J. P., Schnermann, J. (2007). Regulation of Renin Secretion and Expression in Mice Deficient in β 1- and β 2-Adrenergic Receptors. *Hypertension* **50**/1, 103–109.
- [65] Skøtt, O. (1988). Do osmotic forces play a role in renin secretion? *The American journal of physiology* **255**/1 Pt 2, F1-10.
- [66] Oppermann, M., Mizel, D., Huang, G., Li, C., Deng, C., Theilig, F., Bachmann, S., Briggs, J., Schnermann, J., Castrop, H. (2006). Macula Densa Control of Renin Secretion and Preglomerular Resistance in Mice with Selective Deletion of the B Isoform of the Na,K,2Cl Co-Transporter. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**/8, 2143–2152.

- [67] Peti-Peterdi, J., Harris, R. C. (2010). Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**/7, 1093–1096.
- [68] Cheng, H., Huang, H., Guo, Z., Chang, Y., Li, Z. (2021). Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. *Theranostics* **11**/18, 8836–8854.
- [69] Cheng, H. F., Wang, J. L., Zhang, M. Z., McKanna, J. A., Harris, R. C. (2000). Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *The Journal of clinical investigation* **106**/5, 681–688.
- [70] Shroff, U. N., Gyarmati, G., Izuhara, A., Deepak, S., Peti-Peterdi, J. (2021). A new view of macula densa cell protein synthesis. *American journal of physiology. Renal physiology* **321**/6, F689-F704.
- [71] Friis, U. G., Jensen, B. L., Sethi, S., Andreasen, D., Hansen, P. B., Skøtt, O. (2002). Control of Renin Secretion From Rat Juxtaglomerular Cells by cAMP-Specific Phosphodiesterases. *Circulation research* **90**/9, 996–1003.
- [72] Chen, M., Schnermann, J., Smart, A. M., Brosius, F. C., Killen, P. D., Briggs, J. P. (1993). Cyclic AMP selectively increases renin mRNA stability in cultured juxtaglomerular granular cells. *The Journal of biological chemistry* **268**/32, 24138–24144.
- [73] Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A., Schweda, F. (2006). The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circulation research* **99**/11, 1197–1206.
- [74] Hofbauer, K. G., Konrads, A., Schwarz, K., Werner, U. (1978). Role of cyclic AMP in the regulation of renin release from the isolated perfused rat kidney. *Klinische Wochenschrift* **56**/1, 51–59.
- [75] Kurtz, A. (2011). Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annual review of physiology* **73**, 377–399.
- [76] Chen, L. M., Kim, S. M., Oppermann, M., Faulhaber-Walter, R., Huang, Y. N., Mizel, D., Chen, M., Lopez, M. L., Weinstein, L. S., Gomez, R. A., Briggs, J. P., Schnermann, J. (2007). Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gs alpha in juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**/1, F27-F37.
- [77] Tamura, K., Umemura, S., Yamaguchi, S., Iwamoto, T., Kobayashi, S., Fukamizu, A., Murakami, K., Ishii, M. (1994). Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *The Journal of clinical investigation* **94**/5, 1959–1967.
- [78] Schweda, F., Klar, J., Narumiya, S., Nüsing, R. M., Kurtz, A. (2004). Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *American journal of physiology. Renal physiology* **287**/3, F427-33.

- [79] Seino, S., Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiological Reviews* **85**/4, 1303–1342.
- [80] Kurtz, A., Götz, K. H., Hamann, M., Wagner, C. (1998). Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**/8, 4743–4747.
- [81] Ortiz-Capisano, M. C., Liao, T.-D., Ortiz, P. A., Beierwaltes, W. H. (2009). Calcium-dependent phosphodiesterase 1C inhibits renin release from isolated juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **297**/5, R1469-R1476.
- [82] Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Hutter, A., Bahrle, C., Nobiling, R., Taugner, R., Hackenthal, E., Bauer, C. (1986). Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **250**/4, C563-C571.
- [83] Takagi, M., Matsuoka, H., Atarashi, K., Yagi, S. (1988). Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochemical and biophysical research communications* **157**/3, 1164–1168.
- [84] van Dongen, R., Peart, W. S. (1974). Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *British journal of pharmacology* **50**/1, 125–129.
- [85] Jones-Dombi, T., Churchill, P. (1993). The baroreceptor mechanism for controlling renin secretion: effect of calcium channel blockers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **266**/1, 274–278.
- [86] Churchill, P. C. (1988). Cellular Mechanisms of Renin Release. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice* **10**/6, 1189–1202.
- [87] Fray, J. C., Park, C. S., Valentine, A. N. (1987). Calcium and the control of renin secretion. *Endocrine reviews* **8**/1, 53–93.
- [88] Ortiz-Capisano, M. C., Ortiz, P. A., Harding, P., Garvin, J. L., Beierwaltes, W. H. (2007). Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension* **49**/1, 162–169.
- [89] Breitwieser, G. E., Gama, L. (2001). Calcium-sensing receptor activation induces intracellular calcium oscillations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **280**/6, C1412-C1421.
- [90] Ward, D. T. (2004). Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* **35**/3, 217–228.
- [91] Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Taugner, R., Bauer, C. (1986). Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**/13, 4769–4773.

- [92] Kageyama, S., Brown, J. (1990). Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated glomeruli. *Biochemical and biophysical research communications* **168**/1, 37–42.
- [93] Schramm, A., Schweda, F., Sequeira-Lopez, M. L. S., Hofmann, F., Sandner, P., Schlossmann, J. (2019). Protein Kinase G Is Involved in Acute but Not in Long-Term Regulation of Renin Secretion. *Frontiers in pharmacology* **10**, 800.
- [94] Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., Kurtz, A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *The Journal of clinical investigation* **102**/8, 1576–1582.
- [95] Skøtt, O., Briggs, J. P. (1987). Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science (New York, N.Y.)* **237**/4822, 1618–1620.
- [96] Peti-Peterdi, J., Komlosi, P., Fuson, A. L., Guan, Y., Schneider, A., Qi, Z., Redha, R., Rovis, L., Breyer, M. D., Bell, P. D. (2003). Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *The Journal of clinical investigation* **112**/1, 76–82.
- [97] Kim, S. M., Mizel, D., Huang, Y. G., Briggs, J. P., Schnermann, J. (2006). Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **290**/5, F1016-F1023.
- [98] Ortiz-Capisano, M. C., Atchison, D. K., Harding, P., Lasley, R. D., Beierwaltes, W. H. (2013). Adenosine inhibits renin release from juxtaglomerular cells via an A1 receptor-TRPC-mediated pathway. *American journal of physiology. Renal physiology* **305**/8, F1209-19.
- [99] Schmitt, R. (2022). Inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Der nephrologe* **17**/1, 26–33.
- [100] Chen, Z.-Q., Sun, X.-H., Li, X.-J., Xu, Z.-C., Yang, Y., Lin, Z.-Y., Xiao, H.-M., Zhang, M., Quan, S.-J., Huang, H.-Q. (2020). Polydatin attenuates renal fibrosis in diabetic mice through regulating the Cx32-Nox4 signaling pathway. *Acta pharmacologica Sinica* **41**/12, 1587–1596.
- [101] Irazabal, M. V., Torres, V. E. (2020). Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. *Cells* **9**/6.
- [102] Barrera-Chimal, J., Girerd, S., Jaisser, F. (2019). Mineralocorticoid receptor antagonists and kidney diseases: pathophysiological basis. *Kidney international* **96**/2, 302–319.
- [103] Epstein, M., Kovesdy, C. P., Clase, C. M., Sood, M. M., Pecoits-Filho, R. (2022). Aldosterone, Mineralocorticoid Receptor Activation, and CKD: A Review of Evolving Treatment Paradigms. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **80**/5, 658–666.

- [104] Nguyen, G., Danser, A. H. J. (2008). Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Experimental physiology* **93**/5, 557–563.
- [105] Arthur, G., Osborn, J. L., Yiannikouris, F. B. (2021). (Pro)renin receptor in the kidney: function and significance. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **320**/4, R377-R383.
- [106] Jan Danser, A. H., Derkx, F. H., Schalekamp, M. A., Hense, H.-W., Riegger, G. A., Schunkert, H. (1998). Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *Journal of Hypertension* **16**/6, 853–862.
- [107] Prieto, M. C., Reverte, V., Mamenko, M., Kuczeriszka, M., Veiras, L. C., Rosales, C. B., McLellan, M., Gentile, O., Jensen, V. B., Ichihara, A., McDonough, A. A., Pochynyuk, O. M., Gonzalez, A. A. (2017). Collecting duct prorenin receptor knockout reduces renal function, increases sodium excretion, and mitigates renal responses in ANG II-induced hypertensive mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **313**/6, F1243-F1253.
- [108] Matavelli, L. C., Huang, J., Siragy, H. M. (2010). (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **37**/3, 277–282.
- [109] Rosendahl, A., Niemann, G., Lange, S., Ahadzadeh, E., Krebs, C., Contrepas, A., van Goor, H., Wiech, T., Bader, M., Schwake, M., Peters, J., Stahl, R., Nguyen, G., Wenzel, U. O. (2014). Increased expression of (pro)renin receptor does not cause hypertension or cardiac and renal fibrosis in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **94**/8, 863–872.
- [110] Gonzalez, A. A., Zamora, L., Reyes-Martinez, C., Salinas-Parra, N., Roldan, N., Cuevas, C. A., Figueroa, S., Gonzalez-Vergara, A., Prieto, M. C. (2017). (Pro)renin receptor activation increases profibrotic markers and fibroblast-like phenotype through MAPK-dependent ROS formation in mouse renal collecting duct cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **44**/11, 1134–1144.
- [111] Su, J., Liu, X., Xu, C., Lu, X., Wang, F., Fang, H., Lu, A., Qiu, Q., Li, C., Yang, T. (2017). NF-κB-dependent upregulation of (pro)renin receptor mediates high-NaCl-induced apoptosis in mouse inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **313**/6, C612-C620.
- [112] Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Sakoda, M., Takemitsu, T., Nabi, A H M Nurun, Uddin, M. N., Nakagawa, T., Nishiyama, A., Suzuki, F., Inagami, T., Itoh, H. (2007). Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**/6, 1789–1795.

- [113] Song, R., Janssen, A., Li, Y., El-Dahr, S., Yosypiv, I. V. (2017). Prorenin receptor controls renal branching morphogenesis via Wnt/β-catenin signaling. *American journal of physiology. Renal physiology* **312**/3, F407-F417.
- [114] Ludwig, J., Kerscher, S., Brandt, U., Pfeiffer, K., Getlawi, F., Apps, D. K., Schägger, H. (1998). Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *The Journal of biological chemistry* **273**/18, 10939–10947.
- [115] Li, Z., Zhou, L., Wang, Y., Miao, J., Hong, X., Hou, F. F., Liu, Y. (2017). (Pro)renin Receptor Is an Amplifier of Wnt/β-Catenin Signaling in Kidney Injury and Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **28**/8, 2393–2408.
- [116] Fang, H., Deng, M., Zhang, L., Lu, A., Su, J., Xu, C., Zhou, L., Wang, L., Ou, J.-S., Wang, W., Yang, T. (2018). Role of (pro)renin receptor in albumin overload-induced nephropathy in rats. *American journal of physiology. Renal physiology* **315**/6, F1759–F1768.
- [117] Luo, R., Yang, K., Wang, F., Xu, C., Yang, T. (2020). (Pro)renin receptor decoy peptide PRO20 protects against adriamycin-induced nephropathy by targeting the intrarenal renin-angiotensin system. *American journal of physiology. Renal physiology* **319**/5, F930–F940.
- [118] Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews* **86**/3, 747–803.
- [119] Peters, J. (2012). Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides* **34**/2, 427–432.
- [120] Danser, A. H., Saris, J. J., Schuijt, M. P., van Kats, J. P. (1999). Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular research* **44**/2, 252–265.
- [121] Ganten, D., Marquez-Julio, A., Granger, P., Hayduk, K., Karsunky, K. P., Boucher, R., Genest, J. (1971). Renin in dog brain. *The American journal of physiology* **221**/6, 1733–1737.
- [122] Leung, P. S. (2007). The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *The Journal of physiology* **580**/Pt 1, 31–37.
- [123] Yoshimura, Y. (1997). The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Frontiers in neuroendocrinology* **18**/3, 247–291.
- [124] Gianzo, M., Subirán, N. (2020). Regulation of Male Fertility by the Renin-Angiotensin System. *International journal of molecular sciences* **21**/21.
- [125] Cassis, L. A., Police, S. B., Yiannikouris, F., Thatcher, S. E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Current Hypertension Reports* **10**/2, 93–98.

- [126] Yang, T., Xu, C. (2017). Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **28**/4, 1040–1049.
- [127] Hermann, K., McDonald, W., Unger, T., Lang, R. E., Ganter, D. (1984). Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats. *Journal de physiologie* **79**/6, 471–480.
- [128] Kim, S., Tokuyama, M., Hosoi, M., Yamamoto, K. (1992). Adrenal and circulating renin-angiotensin system in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* **20**/3, 280–291.
- [129] Ingert, C., Grima, M., Coquard, C., Barthelmebs, M., Imbs, J.-L. (2002). Contribution of angiotensin II internalization to intrarenal angiotensin II levels in rats. *American journal of physiology. Renal physiology* **283**/5, F1003-10.
- [130] Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews* **59**/3, 251–287.
- [131] Darby, I. A., Sernia, C. (1995). In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell and Tissue Research* **281**/2, 197–206.
- [132] Rohrwasser, A., Morgan, T., Dillon, H. F., Zhao, L., Callaway, C. W., Hillas, E., Zhang, S., Cheng, T., Inagami, T., Ward, K., Terreros, D. A., Lalouel, J. M. (1999). Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* **34**/6, 1265–1274.
- [133] Prieto-Carrasquero, M. C., Harrison-Bernard, L. M., Kobori, H., Ozawa, Y., Hering-Smith, K. S., Hamm, L. L., Navar, L. G. (2004). Enhancement of Collecting Duct Renin in Angiotensin II-Dependent Hypertensive Rats. *Hypertension* **44**/2, 223–229.
- [134] Gonzalez, A. A., Cifuentes-Araneda, F., Ibaceta-Gonzalez, C., Gonzalez-Vergara, A., Zamora, L., Henriquez, R., Rosales, C. B., Navar, L. G., Prieto, M. C. (2016). Vasopressin/V2 receptor stimulates renin synthesis in the collecting duct. *American journal of physiology. Renal physiology* **310**/4, F284-93.
- [135] Stefanska, A., Kenyon, C., Christian, H. C., Buckley, C., Shaw, I., Mullins, J. J., Péault, B. (2016). Human kidney pericytes produce renin. *Kidney international* **90**/6, 1251–1261.
- [136] Miyauchi, K., Nakai, T., Saito, S., Yamamoto, T., Sato, K., Kato, K., Nezu, M., Miyazaki, M., Ito, S., Yamamoto, M., Suzuki, N. (2021). Renal interstitial fibroblasts coproduce erythropoietin and renin under anaemic conditions. *EBioMedicine* **64**, 103209.
- [137] Broeker, K. A. E., Fuchs, M. A. A., Schrankl, J., Lehrmann, C., Schley, G., Todorov, V. T., Hugo, C., Wagner, C., Kurtz, A. (2022). Prolyl-4-hydroxylases 2 and 3 control

- erythropoietin production in renin-expressing cells of mouse kidneys. *The Journal of physiology* **600**/3, 671–694.
- [138] van Kats, J. P., Lannoy, L. M. de, Danser, A. H. J., van Meegen, J. R., Verdouw, P. D., Schalekamp, M. A. D. H. (1997). Angiotensin II Type 1 (AT1) Receptor–Mediated Accumulation of Angiotensin II in Tissues and Its Intracellular Half-life In Vivo. *Hypertension* **30**/1, 42–49.
- [139] Navar, L. G., Mitchell, K. D., Harrison-Bernard, L. M., Kobori, H., Nishiyama, A. (2001). Review: Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **2**/1_suppl, S176-S184.
- [140] Miyata, N., Park, F., Li, X. F., Cowley, A. W., JR (1999). Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *The American journal of physiology* **277**/3, F437-46.
- [141] Dhakarwal, P., Agrawal, V., Kumar, A., Goli, K. M., Agrawal, V. (2014). Update on role of direct renin inhibitor in diabetic kidney disease. *Renal Failure* **36**/6, 963–969.
- [142] Federlein, A. R. (2019). Die funktionelle Rolle des tubulären Renin-Systems. Universität Regensburg.
- [143] Hettiarachchi, S. D., Kwon, Y. M., Omidi, Y., Speth, R. C. (2023). Nanoparticle approaches for the renin-angiotensin system. *Heliyon* **9**/6, e16951.
- [144] Saritas, T., Floege, J. (2023). Retarding progression of chronic kidney disease. *Innere Medizin* (Heidelberg, Germany) **64**/3, 240–246.
- [145] Lemley, K. V., Kriz, W. (1991). Anatomy of the renal interstitium. *Kidney international* **39**/3, 370–381.
- [146] Zeisberg, M., Kalluri, R. (2015). Physiology of the Renal Interstitium. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**/10, 1831–1840.
- [147] Kurtz, A. (2017). Endocrine functions of the renal interstitium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **469**/7, 869–876.
- [148] Gerl, K., Nolan, K. A., Karger, C., Fuchs, M., Wenger, R. H., Stolt, C. C., Willam, C., Kurtz, A., Kurt, B. (2016). Erythropoietin production by PDGFR- β + cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **468**/8, 1479–1487.
- [149] Le Hir, M., Kaissling, B. (1989). Distribution of 5'-nucleotidase in the renal interstitium of the rat. *Cell and Tissue Research* **258**/1, 177–182.
- [150] Spielman, W. S., Thompson, C. I. (1982). A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *The American journal of physiology* **242**/5, F423-35.
- [151] Simoni, J., Simoni, G., Moeller, J. F., Feola, M., Griswold, J. A., Wesson, D. E. (2012). Adenosine-5'-Triphosphate-Adenosine-Glutathione Cross-Linked Hemoglobin as Erythropoiesis-Stimulating Agent. *Artificial Organs* **36**/2, 139–150.

- [152] Sequeira Lopez, M. L., Pentz, E. S., Robert, B., Abrahamson, D. R., Gomez, R. A. (2001). Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**/2, F345-56.
- [153] Broeker, K. A. E., Schrankl, J., Fuchs, M. A. A., Kurtz, A. (2022). Flexible and multi-faceted: the plasticity of renin-expressing cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **474**/8, 799–812.
- [154] Nangaku, M., Eckardt, K.-U. (2007). Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **85**/12, 1325–1330.
- [155] Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A. Y.-M., Yang, C.-W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet (London, England)* **382**/9888, 260–272.
- [156] Rayego-Mateos, S., Valdivielso, J. M. (2020). New therapeutic targets in chronic kidney disease progression and renal fibrosis. *Expert opinion on therapeutic targets* **24**/7, 655–670.
- [157] Panizo, S., Martínez-Arias, L., Alonso-Montes, C., Cannata, P., Martín-Carro, B., Fernández-Martín, J. L., Naves-Díaz, M., Carrillo-López, N., Cannata-Andía, J. B. (2021). Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *International journal of molecular sciences* **22**/1.
- [158] Bollée, G., Dollinger, C., Boutaud, L., Guillemot, D., Bensman, A., Harambat, J., Deteix, P., Daudon, M., Knebelmann, B., Ceballos-Picot, I. (2010). Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**/4, 679–688.
- [159] Okabe, C., Borges, R. L., Almeida, D. C. de, Fanelli, C., Barlette, G. P., Machado, F. G., Arias, S. C. A., Malheiros, Denise Maria Avancini Costa, Camara, N. O. S., Zatz, R., Fujihara, C. K. (2013). NF-κB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology* **305**/2, F155-63.
- [160] Tang, W., Liang, H., Cheng, Y., Yuan, J., Huang, G., Zhou, Z., Yang, L. (2021). Diagnostic value of combined islet antigen-reactive T cells and autoantibodies assays for type 1 diabetes mellitus. *Journal of diabetes investigation* **12**/6, 963–969.
- [161] Lee, S.-H., Park, S.-Y., Choi, C. S. (2022). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes & metabolism journal* **46**/1, 15–37.
- [162] Guthrie, R. A., Guthrie, D. W. (2004). Pathophysiology of diabetes mellitus. *Critical care nursing quarterly* **27**/2, 113–125.
- [163] Viigimaa, M., Sachinidis, A., Toumpourleka, M., Koutsampasopoulos, K., Alliksoo, S., Titma, T. (2020). Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current vascular pharmacology* **18**/2, 110–116.

- [164] Dahl-Jørgensen, K. (1998). Diabetic microangiopathy. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). Supplement **425**, 31–34.
- [165] Deinum, J., Rønn, B., Mathiesen, E., Derkx, F. H., Hop, W. C., Schalekamp, M. A. (1999). Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **42**/8, 1006–1010.
- [166] Luetscher, J. A., Kraemer, F. B., Wilson, D. M., Schwartz, H. C., Bryer-Ash, M. (1985). Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *The New England journal of medicine* **312**/22, 1412–1417.
- [167] Siragy, H. M., Carey, R. M. (2010). Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *American journal of nephrology* **31**/6, 541–550.
- [168] Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols* **1**/4, e78.
- [169] Schiessl, I. M., Grill, A., Fremter, K., Steppan, D., Hellmuth, M.-K., Castrop, H. (2018). Renal Interstitial Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Cells Support Proximal Tubular Regeneration. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **29**/5, 1383–1396.
- [170] Kaissling, B., Hegyi, I., Loffing, J., Le Hir, M. (1996). Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anatomy and Embryology* **193**/4, 303–318.
- [171] Cuervo, H., Pereira, B., Nadeem, T., Lin, M., Lee, F., Kitajewski, J., Lin, C.-S. (2017). PDGFR β -P2A-CreER(T2) mice: a genetic tool to target pericytes in angiogenesis. *Angiogenesis* **20**/4, 655–662.
- [172] Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **45**/9, 593–605.
- [173] Kranz, A., Fu, J., Duerschke, K., Weidlich, S., Naumann, R., Stewart, A. F., Anastasiadis, K. (2010). An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **48**/8, 512–520.
- [174] Kristianto, J., Johnson, M. G., Zastrow, R. K., Radcliff, A. B., Blank, R. D. (2017). Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo. *Transgenic research* **26**/3, 411–417.
- [175] Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **7**/6, 2087–2096.
- [176] Nagy, A. (2000). Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **26**/2, 99–109.
- [177] Li, F., Dou, J., Wei, L., Li, S., Liu, J. (2016). The selective estrogen receptor modulators in breast cancer prevention. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **77**/5, 895–903.

- [178] Feil, S., Valtcheva, N., Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **530**, 343–363.
- [179] Brosius, F. C. 3., Alpers, C. E., Bottinger, E. P., Breyer, M. D., Coffman, T. M., Gurley, S. B., Harris, R. C., Kakoki, M., Kretzler, M., Leiter, E. H., Levi, M., McIndoe, R. A., Sharma, K., Smithies, O., Susztak, K., Takahashi, N., Takahashi, T. (2009). Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **20**/12, 2503–2512.
- [180] Aldehni, F., Tang, T., Madsen, K., Plattner, M., Schreiber, A., Friis, U. G., Hammond, H. K., Han, P. L., Schweda, F. (2011). Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension* **57**/3, 460–468.
- [181] Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N., Schock-Kusch, D. (2012). Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American journal of physiology. Renal physiology* **303**/5, F783-8.
- [182] Tauber, P., Sinha, F., Berger, R. S., Gronwald, W., Dettmer, K., Kuhn, M., Trum, M., Maier, L. S., Wagner, S., Schweda, F. (2021). Empagliflozin Reduces Renal Hyperfiltration in Response to Uninephrectomy, but Is Not Nephroprotective in UNx/DOCA/Salt Mouse Models. *Frontiers in pharmacology* **12**, 761855.
- [183] Staffel, J. (2017). Der Podozyt als Zielstruktur der renalen Wirkungen der kardialen natriuretischen Peptide. Universität Regensburg.
- [184] Czogalla, J., Schweda, F., Loffing, J. (2016). The Mouse Isolated Perfused Kidney Technique. *Journal of visualized experiments : JoVE* 117.
- [185] Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y. (2012). RNAscope: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **14**/1, 22–29.
- [186] Broeker, K. A. E., Fuchs, M. A. A., Schrankl, J., Kurt, B., Nolan, K. A., Wenger, R. H., Kramann, R., Wagner, C., Kurtz, A. (2020). Different subpopulations of kidney interstitial cells produce erythropoietin and factors supporting tissue oxygenation in response to hypoxia *in vivo*. *Kidney international* **98**/4, 918–931.
- [187] Christian Karger (2014). DISSERTATION Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in der Aldosteronsynthase-defizienten Maus.
- [188] Chardin, P., McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* **97**/2, 153–155.
- [189] Kumar, S., Peter, M., Stephen, R. D. (2003). Diabetic kidney disease in the db/dbmouse. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **284**/6, F1138-F1144.

- [190] Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed research international* **2021**, 1497449.
- [191] HARTROFT, P. M. (1963). Juxtaglomerular cells. *Circulation research* **2**, 525–538.
- [192] Roksnoer, L. C. W., Verdonk, K., van den Meiracker, A. H., Hoorn, E. J., Zietse, R., Danser, A. H. J. (2013). Urinary Markers of Intrarenal Renin-Angiotensin System Activity In Vivo. *Current Hypertension Reports* **15**/2, 81–88.
- [193] Barutta, F., Bellini, S., Gruden, G. (2022). Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy. *Clinical Science* **136**/7, 493–520.
- [194] Jia, T., Olauson, H., Lindberg, K., Amin, R., Edvardsson, K., Lindholm, B., Andersson, G., Wernerson, A., Sabbagh, Y., Schiavi, S., Larsson, T. E. (2013). A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC nephrology* **14**, 116.
- [195] Lin, J. S., Susztak, K. (2016). Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Current diabetes reports* **16**/5, 45.
- [196] Vega, M. E., Schwarzbauer, J. E. (2016). Collaboration of fibronectin matrix with other extracellular signals in morphogenesis and differentiation. *Current opinion in cell biology* **42**, 1–6.
- [197] Baues, M., Klinkhammer, B. M., Ehling, J., Gremse, F., van Zandvoort, Marc A M J, Reutelingsperger, C. P. M., Daniel, C., Amann, K., Bábíčková, J., Kiessling, F., Floege, J., Lammers, T., Boor, P. (2020). A collagen-binding protein enables molecular imaging of kidney fibrosis in vivo. *Kidney international* **97**/3, 609–614.
- [198] Correa-Costa, M., Braga, T. T., Felizardo, R. J. F., Andrade-Oliveira, V., Perez, K. R., Cuccovia, I. M., Hiyane, M. I., Da Silva, J. S., Câmara, N. O. S. (2014). Macrophage trafficking as key mediator of adenine-induced kidney injury. *Mediators of inflammation* **2014**, 291024.
- [199] Rahman, A., Yamazaki, D., Sufiun, A., Kitada, K., Hitomi, H., Nakano, D., Nishiyama, A. (2018). A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anaemia in rodents. *PLoS one* **13**/2, e0192531.
- [200] Fray, J. C., Park, C. S. (1986). Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. *The Journal of physiology* **375**, 361–375.
- [201] Bhatia, V., Maghsoudi, S., Hinton, M., Bhagirath, A. Y., Singh, N., Jaggupilli, A., Cheilikani, P., Dakshinamurti, S. (2023). Characterization of Adenylyl Cyclase Isoform 6 Residues Interacting with Forskolin. *Biology* **12**/4.
- [202] Friis, U. G., Stubbe, J., Uhrenholt, T. R., Svenningsen, P., Nüsing, R. M., Skøtt, O., Jensen, B. L. (2005). Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **289**/5, F989-97.

- [203] Álvarez-Aznar, A., Martínez-Corral, I., Daubel, N., Betsholtz, C., Mäkinen, T., Gaengel, K. (2020). Tamoxifen-independent recombination of reporter genes limits lineage tracing and mosaic analysis using CreERT2 lines. *Transgenic research* **29**/1, 53–68.
- [204] Song, A. J., Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in genetics : TIG* **34**/5, 333–340.
- [205] Hubner, E. Dissertation_ue_eric161227_final_pub_pdf.
- [206] Yang, L., Xu, Y., Gravotta, D., Frindt, G., Weinstein, A. M., Palmer, L. G. (2021). ENaC and ROMK channels in the connecting tubule regulate renal K⁺ secretion. *The Journal of general physiology* **153**/8.
- [207] Palmer, B. F., Clegg, D. J. (2022). Extrarenal Effects of Aldosterone on Potassium Homeostasis. *Kidney360* **3**/3, 561–568.
- [208] Yoshida, A., Kanamori, H., Naruse, G., Minatoguchi, S., Iwasa, M., Yamada, Y., Mikkami, A., Kawasaki, M., Nishigaki, K., Minatoguchi, S. (2019). (Pro)renin Receptor Blockade Ameliorates Heart Failure Caused by Chronic Kidney Disease. *Journal of cardiac failure* **25**/4, 286–300.
- [209] Kurt, B., Karger, C., Wagner, C., Kurtz, A. (2013). Control of renin secretion from kidneys with renin cell hyperplasia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **306**/3, F327-F332.
- [210] Hilgers, K. F., Reddi, V., Krege, J. H., Smithies, O., Gomez, R. A. (1997). Aberrant Renal Vascular Morphology and Renin Expression in Mutant Mice Lacking Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertension* **29**/1, 216–221.
- [211] Taugner, R., Bührle, C. P., Nobiling, R. (1984). Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell and Tissue Research* **237**/3, 459–472.
- [212] Ice, K. S., Geary, K. M., Gomez, R. A., Johns, D. W., Peach, M. J., Carey, R. M. (1988). Cell and molecular studies of renin secretion. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice* **10**/6, 1169–1187.
- [213] Federlein, A., Lehrmann, C., Tauber, P., Todorov, V., Schweda, F. (2022). Prorenin from renal tubules is a major driver of diabetic kidney disease. *bioRxiv*, 2022.09.26.509473.
- [214] Tang, J., Wysocki, J., Ye, M., Vallés, P. G., Rein, J., Shirazi, M., Bader, M., Gomez, R. A., Sequeira-Lopez, M.-L. S., Afkarian, M., Batlle, D. (2019). Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. *Hypertension* **74**/1, 83–94.
- [215] Alhayek, S., Preuss, C. V. (2023). Beta 1 Receptors. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- [216] Moosavi, S. M. S., Johns, E. J. (2003). The Effect of Isoprenaline Infusion on Renal Renin and Angiotensinogen Gene Expression in the Anaesthetised Rat. *Experimental physiology* **88**/2, 221–227.
- [217] Derkx, F. H., Gool, J. M. von, Wenting, G. J., Verhoeven, R. P., Man in 't Veld, A J, Schalekamp, M. A. (1976). Inactive renin in human plasma. *Lancet* (London, England) 1/7984, 496–499.
- [218] Jia, Z., Zhang, Y., Ding, G., Heiney, K. M., Huang, S., Zhang, A. (2015). Role of COX-2/mPGES-1/prostaglandin E2 cascade in kidney injury. *Mediators of inflammation* **2015**, 147894.
- [219] Fuchs, M. A. A., Schrankl, J., Leupold, C., Wagner, C., Kurtz, A., Broeker, K. A.-E. (2022). Intact prostaglandin signaling through EP2 and EP4 receptors in stromal progenitor cells is required for normal development of the renal cortex in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **322**/3, F295-F307.
- [220] Meran, S., Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *International journal of experimental pathology* **92**/3, 158–167.
- [221] Lin, S.-L., Kisseeleva, T., Brenner, D. A., Duffield, J. S. (2008). Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *The American Journal of Pathology* **173**/6, 1617–1627.
- [222] Souma, T., Yamazaki, S., Moriguchi, T., Suzuki, N., Hirano, I., Pan, X., Minegishi, N., Abe, M., Kiyomoto, H., Ito, S., Yamamoto, M. (2013). Plasticity of Renal Erythropoietin-Producing Cells Governs Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **24**/10.
- [223] Vishal, D., David, S., Kate, K., Glenda, C. G., Lindsay, B. (2014). Gender differences in adenine-induced chronic kidney disease and cardiovascular complications in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **307**/11, F1169-F1178.
- [224] Covic, A. (2017). Resistant Hypertension in Chronic Kidney Disease. Springer, Cham.
- [225] Ashour, W. M. R., Zamzam, M. S. A., Sayed Ali, Heba Essam El Din El, Ebrahim, R. H. (2023). Effect of fetuin-A on adenine-induced chronic kidney disease model in male rats. *Iranian journal of basic medical sciences* **26**/5, 511–516.
- [226] Rattazzi, M., Bertacco, E., Puato, M., Faggin, E., Pauletto, P. (2012). Hypertension and vascular calcification: a vicious cycle? *Journal of Hypertension* **30**/10, 1885–1893.
- [227] Kang, J. J., Toma, I., Sipos, A., Meer, E. J., Vargas, S. L., Peti-Peterdi, J. (2008). The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension* **51**/6, 1597–1604.
- [228] Chawla, T., Sharma, D., Singh, A. (2010). Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World journal of diabetes* **1**/5, 141–145.

- [229] Wolf, G., Mueller, E., Stahl, R. A., Ziyadeh, F. N. (1993). Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *The Journal of clinical investigation* **92**/3, 1366–1372.
- [230] Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology* **122**/1, 103–111.
- [231] Chen, C.-M., Juan, S.-H., Chou, H.-C. (2018). Hyperglycemia activates the renin-angiotensin system and induces epithelial-mesenchymal transition in streptozotocin-induced diabetic kidneys. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **19**/3, 1470320318803009.
- [232] Haraldsson, B., Nyström, J., Deen, W. M. (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological Reviews* **88**/2, 451–487.
- [233] Cao, W., Zhou, Q. G., Nie, J., Wang, G. B., Liu, Y., Zhou, Z. M., Hou, F. F. (2011). Albumin overload activates intrarenal renin-angiotensin system through protein kinase C and NADPH oxidase-dependent pathway. *Journal of Hypertension* **29**/7, 1411–1421.
- [234] Nakano, D., Nishiyama, A. (2011). The proximal tubular renin-angiotensin system during albuminuria. *Journal of Hypertension* **29**/7.
- [235] Hosojima, M., Sato, H., Yamamoto, K., Kaseda, R., Soma, T., Kobayashi, A., Suzuki, A., Kabasawa, H., Takeyama, A., Ikuyama, K., Iino, N., Nishiyama, A., Thekkumkara, T. J., Takeda, T., Suzuki, Y., Gejyo, F., Saito, A. (2009). Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology* **150**/2, 871–878.
- [236] Eddy, A. A. (1996 Dec). Molecular insights into renal interstitial fibrosis, United States.
- [237] Genovese, F., Manresa, A. A., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., Boor, P. (2014). The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis & Tissue Repair* **7**/1, 4.
- [238] Liu, Y. (2011). Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews. Nephrology* **7**/12, 684–696.
- [239] Singh, P., Carraher, C., Schwarzbauer, J. E. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual review of cell and developmental biology* **26**, 397–419.
- [240] Levey, A. S., Grams, M. E., Inker, L. A. (2022). Uses of GFR and Albuminuria Level in Acute and Chronic Kidney Disease. *The New England journal of medicine* **386**/22, 2120–2128.
- [241] Eriksen, B. O., Palsson, R., Ebert, N., Melsom, T., van der Giet, M., Gudnason, V., Indridason, O. S., Inker, L. A., Jenssen, T. G., Levey, A. S., Solbu, M. D., Tighiouart, H., Schaeffner, E. (2020). GFR in Healthy Aging: an Individual Participant Data Meta-

- Analysis of Iohexol Clearance in European Population-Based Cohorts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **31**/7, 1602–1615.
- [242] Tonneijck, L., Muskiet, M. H. A., Smits, M. M., van Bommel, E. J., Heerspink, H. J. L., van Raalte, D. H., Joles, J. A. (2017). Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **28**/4, 1023–1039.
- [243] Vupputuri, S., Batuman, V., Muntner, P., Bazzano, L. A., Lefante, J. J., Whelton, P. K., He, J. (2003). Effect of Blood Pressure on Early Decline in Kidney Function Among Hypertensive Men. *Hypertension* **42**/6, 1144–1149.
- [244] Gueler, F., Rong, S., Park, J.-K., Fiebeler, A., Menne, J., Elger, M., Mueller, D. N., Hampich, F., Dechend, R., Kunter, U., Luft, F. C., Haller, H. (2002). Postischemic Acute Renal Failure Is Reduced by Short-Term Statin Treatment in a Rat Model. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**/9.
- [245] Courtoy, P. J., Kanwar, Y. S., Hynes, R. O., Farquhar, M. G. (1980). Fibronectin localization in the rat glomerulus. *The Journal of cell biology* **87**/3 Pt 1, 691–696.
- [246] Li, L., Fu, H., Liu, Y. (2022). The fibrogenic niche in kidney fibrosis: components and mechanisms. *Nature reviews. Nephrology* **18**/9, 545–557.

9 Anhang

9.1 Materialien und Geräte

Material	Hersteller/Lieferant
Aspirator Tube	Sigma-Aldrich
Contour Next Teststreifen	Ascenia Diabetes Care
Deckgläser	Hartenstein
EDTA Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte
Einbettkassetten	DiaPath
Eppendorf-Cups (0,2-2,0 ml)	Sarstedt, Nerbe
Falcon-Röhrchen (15-50 ml)	Sarstedt, Nerbe
Faltenfilter	Hartenstein
Fettstift Immedge Biozol	Vector Laboratories
Filter 100 µm/50 µm	Greiner-Bio-One
Filter 2 µm	Sarstedt
Glaswaren	Schott, Roth
Hämatokrit Kapillaren, diverse	Hirschmann Laborgeräte
Insulinspritzen Micro fine 0,5 ml	BD Medishop
Kanülen, versch. Größen	BD, Braun
LightCycler-96-Well-Platten	Roche
Mikrotomklingen	Epredia
Objektträger „Super Frost Plus“	Hartenstein
Operationsbesteck	FST
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter	Sarstedt, Nerbe
Serologische Pipetten (5-25 ml)	Sarstedt
Skalpellklingen	Heinz Herenz
Spritzen, versch. Größen	BD Discardit, Braun
Verschlusskappen	Sarstedt
Zellkultur-Platte 24 Well	Sarstedt

Material	Hersteller/Lieferant
10 x Reaction Buffer	NIPPON Genetics EUROPE
3 Isobutyl 1-Methyl-Xanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid hydrochlorid (AEBSF)	Sigma-Aldrich
Agarose	Bio & Sell
Ammoniumchlorid	Acros Organics
Ammoniumhydroxid-Lsg (28-30%)	Sigma-Aldrich
Amphotericin B 250 µg/ml	Biochrome GmbH
Bepanthen (Augen- und Nasensalbe)	Bayer
Bouin Lösung	Roth
Bovine fibronectin 1 mg/ml	PromoCell
Brefeldin A 1000x	Thermo Fisher Scientific
BSA	PAN-Biotech
Chloroform	Fisher Scientific
Claciumchlorid	Merck
Collagen aus Kalbshaut in Essigsäure, 0,1 %	Sigma-Aldrich
Collagenase Typ II (255 U/mg)	Worthington
Critoseal	Leica
Dako Mounting Medium	Dako
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
DMEM low glucose GlutaMAX™	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNA Maker 100 bp	NIPPON Genetics Europe
DNA Marker 50 bp	NIPPON Genetics Europe
DNAse I (3441,4 U/mg)	AppliChem
DPBS (no calcium, no magnesium)	Capricorn Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Eisessig	Merck
Enalapril Maleat Salz	Sigma-Aldrich

Enthaarungscreme	Veet
Ethanol	Roth
F-12 (Ham) Nutrient Mixture	ThermoFisher Scientific
FBS	PAN-Biotech
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Sinistrin	Fresenius Kabi
Forskolin	Sigma-Aldrich
Gill´s Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
GoTaq DNA Polymerase	Promega
GoTaq Reaction Buffer Green (5 x)	Promega
HBSS	Gibco
Immersol™ 518f	Carl Zeiss Jena GmbH
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Gibco
Isofluran	Baxter
Isopropanol	Merck
Isoproterenol	Sigma-Aldrich
Ketamin	CP-Pharma
KH ₂ PO ₄	Merck
Maleinsäure	Merck
Meliseptol® rapid (Alkoholische Schnell-desinfektion)	B. Braun
Methylbutan	Sigma-Aldrich
Midori-Green	NIPPON-Genetics EUROPE
NaCl 0,9%, steril	B. Braun
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natronlauge 1 M	Roth
Nukleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM)	Promega
Oligo(dT)-Primer	Promega
Paraffin	Leica
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (P/S) (10,000 U / mL)	Thermo Fischer

Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories
Pferde Serum	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Pronase E 4,000,000 PU/g	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Cayman Chemical
Proteinase K	GeneOn
Rinderalbumin Fraktion in Phosphat-ge-pufferte Salzlösung 7,5%	Gibco
RNAscope Probe – MmRen1	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Hydrogen Peroxide	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Probe – mM-Pdgfrbeta-C2	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Protease Plus	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Target Retrieval Reagent	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope® Wash Buffer Reagent	Advanced Cell Diagnostics
RNase-freies Wasser	Promega
Roti®Histol	Roth
SYBR Green	Roche
Tissue Tek®	Hartenstein
TRIS	Roth
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer 50X pH 8,5	AppliChem
TRIIsure™	Bioline
Triton X-100	Biozol
Trypsin ≥10,000 BAEE units/mg Protein	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,5%) in DPBS 10 x	Capricorn
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich
Weigerts Hämatoxylin Lsg A und B	Roth
Xylazin 20 mg/ml	Serumwerk Bernburg
Xylol	Roth
Zitronensäure Monohydrat	Roth

Assay Kits

Produkt Hersteller / Lieferant

RNAscope® Multiplex Fluorescent V2 Assay Advanced Cell Diagnostics

RNAscope® 2.5 HD™ Assay brown Advanced Cell Diagnostics

Angiotensin I EIA IBL international

Aldosteron IBL international

Kreatinin Assay BioassaySystems Biotrend

Mouse Albumin ELISA Dunn Labortechnik GmbH, ICL (Immunology Consultants Laboratory)

Quick RNA (Micro), Zymo Research

Masson-Goldner staining Kit, Sigma-Aldrich

Primer

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

Gen	Sequenz 5'-3'	Länge
Cre	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG	400bp, wenn Cre positiv
Cre	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC	
mTmG Common	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT	
mTmG Mutant	TCAATGGCGGGGGTCGTT	KO=250 bp
mTmG WT	CGAGGCGGATCACAAGCAATA	WT= 330 bp
PDGFR β Common	CCACCTTGAATGAAGTCAACAC	he = 272 + 320 bp
PDGFR β Mutant	ACATGTCCATCAGGTTCTTGC	ho =320bp

PDGFR β WT	AGCTTGTGGCAGTGTAGCTG	WT = 272bp
Renin1 ^{flox/flox} antisense	ACTGTCAACACCTCTATGCTGGG	KO=667 bp
Renin1 ^{flox/flox} sense	CAGCCTCCTGGCAGCTCTAGCC	WT=519 bp

qRT-PCR

Gen	Sequenz 5'-3'	Länge
β -aktin sense	CCCTAGGCACCAGGGTGTG	
β -aktin antisense	GCTGGGGTGTGAAGGTCTC	282 bp
Aktin sense	CCGCCCTAGGCACCAGGGT	
Aktin antisense	GGCTGGGGTGTGAAGGTCTCAA	286 bp
RPL 32 sense	TGGAGGTGCTGCTGATGTG	
RPL 32 antisense	CGTTGGGATTGGTGAACCTGA	126 bp
Fibronektin 1 sense	AGGTTCGGGAAGAGGTTGTG	
Fibronektin 1 antisense	GGCGTAATGGGAAACCGTGT	104 bp
F 4/80 sense	CTTGGCTATGGGCTTCCAGT	
F 4/80 antisense	GCAAGGAGGACAGAGTTATCGTG	165 bp
Renin sense	AGGGGGTGCTAAAGGAGGAA	
Renin antisense	GATAATGCTGCAGGTCGCTA	102 bp

PDGFR β sense	GTGGAGATT CGCAGGAGGTC	
PDGFR β antisense	ACCGTCAGAGCTCACAGACT	185 bp
Col 1a1 sense	CTGACGCATGGCCAAGAAGA	
Col 1a1 antisense	ATACCTCGGGTTCCACGTC	91 bp
Col 3a1 sense	GGTGGTTTCAGTCAGCTATGG	
Col 3a1 antisense	CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATG	86 bp

Primäre Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
Renin 2	rabbit	1:500	OACA02177	Biozol
Renin 1	goat	1:100	AF4722	R&D Systems
Fibronectin	rabbit	1:600	A0245	DAKO
F 4/80	rat	1:100	MCA497G	Biorad

Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
Alexa Fluor® 488 (Donkey-Anti-Goat)	1:400	A32814	Invitrogen
Alexa Fluor® 488 (Donkey-Anti-Rabbit)	1:400	A32790	Invitrogen
Alexa 647 Fluor® (Donkey-Anti-Goat)	1:400	A32849	Invitrogen
Alexa Fluor® 647 (Donkey-Anti-Rabbit)	1:400	A32795TR	Invitrogen
DAPI	1:400	6335.1	Roth

Fluoreszenzfarbstoffe Multiplex ISH

Name	Verdünnung	Art.-Nr.	Hersteller / Lieferant
TSA Vivid™ Fluorophore 570	1:1000	7526	Tocris
TSA Vivid™ Fluorophore 650	1:1000	7527	Tocris

Puffer und Lösungen

Agarosegel

TAE-Puffer 1 x

Agarose 2 %

Blockierlösung (Immunfluoreszenzfärbung), filtriert:

PBS Puffer „Otto“ 1 x

BSA 1 %

Horse Serum 10 %

Waschlösung (Immunfluoreszenzfärbung), filtriert:

PBS Puffer „Otto“ 1 x

BSA 1 %

DEPC-H₂O:

0,1 % DEPC in H₂O (MilliQ), schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren.

Fixierlösung Perfusion (pH 7,4) filtriert:

PBS 1 x

Paraformaldehyd 4 %

Homogenisierungslösung (Nierengewebe):

Glycerin 5%

EDTA 0,5 M, pH 8,0 10 mM

PMSF 0,1 mM

AEBSF 0,1 mM

Maleatpuffer pH 6,0 für 1 Liter

Tris 5,8 g

Maleinsäure 2,96 g

EDTA 2,96 g

pH Wert Einstellung: NaOH

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

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ 10 mM

NaCl 140 mM

KH_2PO_4 10 mM

TNES Puffer

Tris pH 7,5 10 mM

NaCl 400 mM

EDTA pH 8,0 100 mM

SDS 0,6 %

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

Zitronensäure 1,4 g

Aqua bidest. 50 ml

Blutlyse-Puffer

Ammoniumhydioxid

Tris

FACS-Puffer

PBS

FCS (2%)

DNAse I (15.000 IU/ml)

10 mg DNAse I

1 ml Tris Puffer (40 mM Tris +2 mM MgCl₂)

1 ml Glycerol

Verdaulösung

9,79 mg Pronase E

9,79 mg Kollagenase II

17 ml HBSS

Totfarbstoff

Propidiumiodid 2 mg

H₂O (MilliQ) 2 ml

Coating-Medium 50 ml

F-12 Nut Mix Ham 48,5 ml

Fibronectin (Rind) (1 mg/ml) 500 µl

Kollagen (Kalbshaut) 0,1 % 500 µl

Rinderalbumin 7,5 % 25 µl

P/S 1 ml

Futter:

- Tamoxifenfutter: 400 mg/kg TAM citrate (ssniff Spezialdiäten)

- Adeninfutter: 0,2 % Adenin (Altromin Spezialfutter)

- Niedrigsalz-Diät: ≤0,03 % Na/Cl (ssniff Spezialdiäten)

Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
Accu-Chek	Sensor Roche
Axiovert200m-Mikroskop	Zeiss
Blockcycler „Labcycler“	SensoQuest GmbH
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories
Elektronischer Stößel - Tissue Grinder	Nippon Genetics EUROPE
Elektrophorese Gel System D2/41-2025	Peqlab Biotechnologie
Flammenfotometer BWB-XP	BWB Technologies
Hämatokrit-Zentrifuge "210"	Hettich
Homogenisator "Ultra-Turrax T25"	IKA-Werke
HybEZ™-Ofen	Advanced Cell Diagnostics
Inkubator	Binder
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH
Kryostat CryoStar™ NX70	Thermo Scientific™
LightCycler® 480	Roche
Microplate Reader NOVOSTAR	BMG Labtech
Mikroskop Axiovert200M	Carl Zeiss
Mikroskop Primo Star	Carl Zeiss

Mikroskop Primovert	Carl Zeiss
Mikrotom Rotationsmikrotom RM2265,	Leica
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH
Osmometer	„Osmomat 030“ Gonotec
Perfusionspumpe	Watson-Marlow
Schüttler DOS-10L	NeoLab
Tail-cuff-Blutdruckmesssystem	TSE Deutschland
Tischzentrifuge	NeoLab
UV / VIS-Spektrometer Nanodrop ND-1000	ThermoScientific
Vortexer REAX2000	Heidolph
Zellkulturzentrifuge „Allegra X30R“	Beckmann
Zentrifuge 5417R/5427R	Eppendorf

Verwendete Software

- Microsoft Office Professional Plus 2019
- GraphPad Prism 6
- ZEN 3.0 (blue edition) 2019 von Zeiss
- LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP4
- NanoDrop 1000 Version 3.8.1
- NOVOSTar Software Version 1.30
- MARS Data Analysis Software 2.0
- BioRender.com
- Citavi 6
- PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology) IP-Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- CorelDRAW 2017
- MediBeacon

9.2 Protokolle

Genotypisierung der Mäuse:

- Zugabe von 600 µl TNES Puffer (vorher im 37°C warmen Wasserbad erwärmen) + 10 µl Proteinkinase K (10 mg/ml), 2-3 x schwenken
- Bei 56°C, mind. 3 Std (auch über Nacht möglich) schütteln (550 rpm),
- Zugabe von 166,7 µl NaCl (6 M), 15-20 min schütteln (800 rpm)

- Zentrifugation: 13.000 rpm, 15 min
- Überstandsabnahme (~500 µl) + 500 µl 100 % EtOH (-20°C), 2-3 x schwenken
- Zentrifugation: 13.000 rpm 5 min Raumtemperatur (RT), Überstand absaugen
- Pellet mit 500 µl 80 % EtOH waschen
- Zentrifugation: 13.000 rpm 10 min (RT), Überstand absaugen
- Pellet für 10-15 min bei 37°C trocknen lassen
- Pellet in 45 µl autoklaviertem MilliQ (MQ) Wasser bei 55°C leicht schwenken (300 rpm), 1 Std um Pellet zu lösen
- für Genotypisierung isolierte DNA im Kühlschrank (4°C) lagern

Durch das Auswählen der Primer ist eine Genotypisierung der Versuchstiere hinsichtlich gewünschter Gene möglich.

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein der codierenden Regionen der PDGFR β Cre Rekombinase, sowie dem geflochtenen Ren 1 Gen bzw. tomato Gen in der genomischen DNA der untersuchten Mäuse mit Hilfe folgender PCR-Ansätze und den entsprechenden Amplifizierungsprotokollen überprüft:

PCR-Ansatz für PDGFR β -Cre:

- 5 µl 5 x GoTaq-Puffer
- 1,5 µl Primer sense
- 1,5 µl Primer antisense
- 1,5 µl dNTPs
- 14,875 µl Wasser
- 0,125 µl GoTaq DNA-Polymerase
- 1 µl Isolierte DNA-Probe

Amplifizierungsprotokoll:

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

PCR-Ansatz für Renin1^{flox/flox}:

- 5 µl 5 x GoTaq-Puffer

- 1,5 µl Primer sense
- 1,5 µl Primer antisense
- 1,5 µl dNTPs
- 14,875 µl Wasser
- 0,125 µl GoTaq DNA-Polymerase
- 1 µl Isolierte DNA-Probe

Amplifizierungsprotokoll:

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

PCR-Ansatz für tomato:

- 5 µl 5 x GoTaq-Puffer
- 1,5 µl Common Primer
- 1,5 µl WT reverse
- 1,5 µl WT Mutant reverse
- 1,5 µl dNTPs
- 12,6 µl H2O
- 0,2 µl GoTaq DNA-Polymerase
- 1 µl Isolierte DNA-Probe

Amplifizierungsprotokoll:

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

Das PCR-Produkt wurde im Anschluss auf ein Agarose-Gel (2 % Agarose in TBE-Puffer) aufgetragen und die enthaltenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe geelektrophoretisch, bei einer Spannung von 120 V und über einen Zeitraum von 45 min, aufgetrennt. Mit

Hilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffs (Midori-Green) und eines 100-Basenpaar-Standards konnten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe detektiert werden.

Paraffineinbettung Alkoholreihe

- 30 min	70 % Methanol (RT)
- 30 min	80 % Methanol (RT)
- 30 min	80 % Methanol (RT)
- 30 min	90 % Methanol (RT)
- 30 min	90 % Methanol (RT)
- 30 min	100 % Methanol (RT)
- 30 min	100 % Methanol (RT)
- 30 min	Isopropanol absolut (RT)
- 30 min	Isopropanol absolut (45°C)
- 30-60 min	Isopropanol/Paraffin (1:2) (60°C)

Immunofluoreszenz- Färbungen Gefrierschnitte

Tag 1:

- Vorbereitung: 0,1 % SDS-Lösung auf RT bringen
- Anwärmen der Schnitte 5 min bei RT
- Inkubation der Schnitte 5 min in PBS Otto
- Permeabilisierung der Gewebsschnitte: 5 min 0.1% SDS in PBS Otto
- Waschen 2 x 5min in PBS Otto
- Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift
- Blockieren: 10 min mit 5 % BSA + 0,04 % Triton-X-100 in PBS Otto
- Waschen 2 x 5 min in PBS Otto
- Primärer-Antikörper (AK):
 - ➔ verdünnt in 0,5 % BSA + 0,04 % Triton-X-100 in PBS Otto
 - ➔ Inkubation über Nacht in feuchter Kammer bei 4°C

Tag 2:

- Waschen 2 x 5 min in PBS Otto
- Sekundärer-AK:
 - verdünnt in 0,5 % BSA + 0,04 % Triton-X-100 in PBS Otto
 - Inkubation 1 Std bei RT in feuchter Kammer
- Waschen 2 x 5min in PBS Otto

- Anwärmen Mounting Medium
- Kurzes Eintauchen der Schnitte in destilliertem Wasser
- Konservierung: Mounting Medium auf den Gewebeschnitt geben und ein Deckglas auflegen

RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit (brown)

1. Tag

- 5 µm dicke Gewebeschnitte (innerhalb einer Woche benutzen)
- 1 Std im 60°C Ofen backen

Die nächsten Schritte erfolgen bei RT, es sei denn es ist eine andere Temperatur angegeben

- 2 x 5 min Xylol
 - 2 x 1 min 100 % EtOH
 - Schnitte trocknen lassen ca. 5 min
 - 3-5 Tropfen H₂O₂ je Schnitt, 10 min
 - In Millipore (MQ) Wasser 3-5 x tauchen + Wiederholung
 - Nierenschnitte 15 min in vorher erhitztem 1x konzentriertem „Target retrieval“ kochen
 - Unmittelbar nach dem Kochen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen + Wiederholung
 - Frisches EtOH 100 % 3-5 x eintauchen
 - Gewebe mit Fettstift umrunden, über Nacht im HybEZ Slide Rack trocken
 -
2. Tag
- Zugabe von ca. 3 Tropfen Protease Plus je Schnitt
 - Inkubation bei 40°C im HybEZ-Ofen 30 min, bzw. 15 min bei anschließender Immunfluoreszenzfärbung
 - Waschen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen+ Wiederholung

Hybridisierung:

- Überschüssige Flüssigkeit entfernen, 2-3 Tropfen Renin Sonde auf den Schnitt
- Inkubation für 2 Std bei 40°C im HybEZ-Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 1
- Inkubation für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 2
- Inkubation für 15 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,

- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 3
- Inkubation für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 4
- Inkubation für 15 min bei 40°C im Ofen

Alle weiteren Schritte bei RT

- Waschpuffer für 2 min + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 5
- Inkubation für 30 min
- Waschpuffer für 2 min + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 6
- Inkubation für 15 min inkubieren
- Waschpuffer für 2 min + Wiederholung,

Signaldetektion:

- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen DAB A+DAB B (1:2)
- Inkubation für 10 min
- Waschen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen+ Wiederholung

Option 1: Mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung

- 3 x mit PBS waschen
- Blockieren 1 % BSA 10 % HS in PBS für 45 min RT
- Antikörperlösung in Blockierlösung über Nacht bei 4°C

Sekundärer Antikörper siehe Tag 2 (3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung)

Option 2: Ohne anschließende Immunfluoreszenzfärbung

- Inkubation in 50 % ige Hämatoxylinlösung, 35 Sekunden
- Waschen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen + Wiederholung
- Inkubation in 0,02 % Ammoniumwasser, 10 Sekunden
- Waschen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen
- Inkubation in 70 % ETOH, 2 min
- Inkubation in 95 % ETOH, 2 min
- Inkubation in 95 % ETOH, 2 min
- Inkubation in Xylol, 5 min

Eindeckeln:

- Cytoseal

RNAscope® Multiplex Fluorescent Assay mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung

Die *in situ* Hybridisierung wurde gemäß dem Protokoll von ACD durchgeführt.

1. Tag siehe Methoden Detection Kit Brown
2. Tag:
 - ca. 3 Tropfen Protease Plus je Schnitt
 - Inkubation 15 min bei 40°C im HybEZ-Ofen
 - Waschen: 3-5 x in MQ-Wasser tauchen + Wiederholung

Hybridisierung:

- Überschüssige Flüssigkeit entfernen
- 2-3 Tropfen C1:C2-Sonden (Sonden siehe Anhang) im Verhältnis 50:1 auf den Schnitt
- Inkubation für 2 Std bei 40°C im HybEZ-Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 1
- Inkubation für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 2
- Inkubation für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Ampulle 3
- Inkubation für 15 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen HRP-C1
- Für 15 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Cy3 verdünnt in TSA-Puffer 1:1000
- Für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen HRP-Blocker
- Für 15 min bei 40°C im Ofen
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen HRP-C2
- Für 15 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen Cy5 verdünnt in TSA-Puffer 1:1000
- Für 30 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- Überschüssige Flüssigkeit entfernen: 2-3 Tropfen HRP-Blocker
- Für 15 min bei 40°C im Ofen
- Waschpuffer für 2 min bei RT + Wiederholung,
- 3 x mit PBS waschen

- Blockieren 1 % BSA, 10 % HS in PBS für 45 min RT
- Antikörperlösung in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C

Sekundärer Antikörper siehe Tag 2 Immunfluoreszenzfärbung

Masson-Goldner-Trichrom-Färbeikit

2. Tag nach Bouin'scher Lösung

- Spülen der Objektträger ca. 5 min mit fließendem Leitungswasser
- Inkubation der Objektträger in Weigerts Eisen-Hämatoxylin-Lösung (frisch ansetzen, Lösung A und B, Verhältnis 1:1) 5 min
- 5 min unter fließendem Leitungswasser spülen
- Kurz in VE-Wasser tauchen
- Inkubation der Objektträger in Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung, 5 min
- Kurz in VE-Wasser tauchen
- Inkubation der Objektträger in Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäure-Arbeitslösung, frisch ansetzen, (Verhältnis: Phosphorwolframsäure: Phosphormolybdänsäure: Aqua dest. 1:1:2), 5 min
- Inkubation der Objektträger in Anilinblau 30 min
- Objektträger in 1 % Essigsäure, 2 x eintauchen
- 1 x kurz in VE-Wasser tauchen
- Objektträger in aufsteigende Alkoholreihe Ethanol: 80 % -> 96 % -> 100 %, 1 x kurz eintauchen
- Inkubation der Objektträger 5 min in Rotihistol

Anschließend wurden die Objektträger mit Roti-Histokitt Rotikit und einem Deckglas eingedeckelt und getrocknet.

RNA-Isolation aus dem Nierengewebe

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, abweichende Temperaturen werden angegeben:

- Homogenisierte Nierenhälften in 2 ml Eppis überführen, 5 min bei RT stehen lassen (Proteine denaturieren und lösen sich in Phenol)
- Zugabe von Chloroform: 1/5 des Volumens von TRIsure-Reagenz, danach schwenken
- Zentrifugation: 4°C, 12.000 rpm, 20 min → Phasentrennung: 1. Grüne Phase unten (Phenolphase) Proteine, 2. Weiße Phase (Interphase): DNA + hydrophile Proteine, 3. Durchsichtige Phase: wässriger Überstand mit RNA
- ~ 500 µl wässrigen Überstand abnehmen, in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis stellen
- Fällung: Volumen des Überstandes an Isopropanol 100 % bei RT dazugeben, kurz vortexen, 10 min bei RT stehen lassen

- Zentrifugation: 4°C, 12.000 rpm, 10 min
- Überstand abpipettieren, bei 65°C trocknen lassen
- Glasiges Pellet in 1 ml 75 % Ethanol waschen bei RT, kurz vortexen
- Zentrifugation: 4°C, 7.500 rpm, 5 min
- Überstand abpipettieren bei 65°C restlos trocknen lassen
- Mark/Cortex: In 50-100 µl bzw. Papille in 20 µl Nuklease-freiem Wasser lösen (Je nach Pelletgröße Ziel: 2 µg/µl), vortexen, 2-5 min bei 65°C bei ca. 700 rpm schütteln, um Pellet zu lösen, kurz vortexen, RNA bei -80°C lagern.

RNA-Isolation aus PDGFR β-Zellen (Primärkultur), Quick-RNA Microprep Kits (Zymo Research®)

- Zugabe von 300 µl 100 % EtOH, gut vermischen
- Transfer der Mischung in ein Sammelrörchen der Zymo-Spin™ IC Säule
- Zentrifugation: 14.000 g, 30s
- Säulendurchfluss verwerfen
- Säulen mit 400 µl Waschpuffer waschen
- Zentrifugation 14.000 g, 30s
- Zugabe von 40 µl Mix aus: DNase I (1 U/µl) / Aufschlusspuffer Mix (Verhältnis 1:8) auf jede Säule, Inkubation: 15 Minuten
- Zugabe von 400 µl RNA-Vorbereitungspuffer
- Zentrifugation: 14.000 g, 30s
- Säulendurchfluss verwerfen
- Zugabe von 700 µl RNA Waschpuffer
- Zentrifugation: 14.000 g, 30s
- Zugabe von 400 µl RNA Waschpuffer
- Zentrifugation: 14.000 g, 2 min
- Sammelrörchen mit der Säule auf ein frisches Reaktionsgefäß setzen, um restlichen Waschpuffer aus der Säule zu entfernen
- Zentrifugation: 14.000 g, 1 min
- Sammelrörchen mit der Säule erneut auf ein frisches Reaktionsgefäß setzen
- Zugabe von 12 µl Nuklease-freiem Wasser
- Zentrifugation: 14.000 g, 30 s
- Durchfluss enthält RNA, auf Eis stellen und RNA-Konzentration vermessen

Umschreiben der mRNA in cDNA

- Zugabe von 9 µl (2 µg / 1 µg RNA + ggf. Nuklease-freies Wasser) in 0,2 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 1 µl Oligo (dT)₁₅ Primer: 500 µg/ml
- 5 min, bei 42°C auf Blockheizer → Bindung der Thymin-Basen (komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA)
- Zugabe von 10 µl Mastermix:
 - 2 µl Puffer
 - 2 µl dNTPs 2,5 mM
 - 1 µl Reverse Transkriptase (Scriptase: 200 U/µl)
 - 5 µl H₂O
- Reaktionsgefäß werden in einen Heizblock mit folgendem Programm gestellt

42°C	60 min	cDNA Synthese
90°C	5 min	Inaktivierung der Reverse Transkriptase
4°C	∞	Aufbewahrungstemperatur der cDNA

- Anschließend wurden Cortex und Mark Proben im Verhältnis 1:2 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, alle Proben wurden bei -20 °C weggefroren

Bestimmung der Plasmakonzentration von Renin bzw. Prorenin

Mit Ausnahme von der Trypsinaktivierung wurden alle Arbeiten zur Probenvorbereitung auf Eis durchgeführt, das Plasma von den Enalapril und Niedrigsalz-behandelten Mäusen wurde zuvor 1:10 verdünnt, das Plasma von den Isoproterenol behandelten Mäusen wurde 1:50 verdünnt.

- Ansatz mit Trypsinbehandlung:
 - Zugabe von 10 µl Plasma (1:3 mit Maleatpuffer verdünnt)
 - Zugabe von 10 µl Trypsin 2,5 mg/ml in Maleatpuffer, 5 min, 37°C
 - Zugabe von 50 µl Trypsininhibitor (10 mg/ml in Maleatpuffer) → Trypsin damit abstoppen → Proben auf Eis stellen
- Ansatz ohne Trypsinbehandlung:
 - Zugabe von 10 µl Plasma (1:3 mit Maleatpuffer verdünnt)
 - Zugabe von 10 µl Maleatpuffer
 - Zugabe von 50 µl Trypsininhibitor (10 mg/ml in Maleatpuffer)
- Bei beiden Probenansätzen:

- Zugabe von 26 µl Reninsubstrat (Angiotensinogen)
- Zugabe von 10 µl Generation-Puffer (pH-Wert Einstellung auf 6,0)
- Zugabe von 1 µl PMSF
- Gesamtprobe aufteilen jeweils 53 µl für Kaltwert (4°C) und Warmwert (37°C), Inkubation: 90 min
- nach Inkubation: Zentrifugation: 12.000 rpm, 4°C, 5 min

Danach wurden alle Schritte gemäß des Angiotensin I (Plasma Renin activity) ELISA's durchgeführt:

- 47 µl Standard und Proben (Kalt-und Warmwert) auf die Mikrotiterplatte geben
- Zugabe von 100 µl ANG-I-Biotin
- Schütteln: 1 Std bei 200 rpm
- Waschen: 5 x mit 300 µl Waschpuffer, dazwischen jeweils fest gegen saugfähiges Papier klopfen
- Zugabe von 150 µl der Streptavidin-HRP-Konjugat-Arbeitslösung
- Schütteln 30 min bei 200 rpm
- Waschen: 5 x mit 300 µl Waschpuffer, dazwischen fest gegen saugfähiges Papier klopfen
- Zugabe von 150 µl TMB-Substrat
- Schütteln 15 min bei 200 rpm
- Zugabe von 50 µl TMB-Stopplösung
- Vermessen: Absorption: 450 nm innerhalb von 20 min

Bestimmung der Plasmakonzentration von Aldosteron

- Zugabe von 100 µl Standard, Control und Probe (Proben Verdünnung 1:3,28 mit Standard A) auf Mikrotiterplatte
- Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur
- 100 µl Enzyme Conjugate in jedes Well zugeben, für 10 Sekunden gut schütteln
- Inkubation 60 Minuten bei Raumtemperatur
- Waschen: 3 x mit 300 µl Waschpuffer, dazwischen fest gegen saugfähiges Papier klopfen
- 100 µl „Substrate Solution“ in jedes Well pipettieren
- Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl „Stop Solution“ in jedes Well abstoppen
- Messung der optischen Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei 450 nm innerhalb von 10 min

Albumin-Konzentration im Urin

- Zugabe von 100 µl der Probe und Standard auf die Mikrotiterplatte
- Inkubation der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur, 30 Minuten
- Waschen: 4 x mit 300 µl Waschpuffer, dazwischen fest gegen saugfähiges Papier klopfen
- Zugabe von 100 µl des entsprechend verdünnten Enzym-Antikörper-Konjugats
- Inkubation der Platte bei Raumtemperatur, 30 Minuten
- Waschen: 4 x mit 300 µl Waschpuffer, dazwischen fest gegen saugfähiges Papier klopfen
- Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung
- Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, 10 Minuten
- Zugabe von 100 µl Stopplösung
- Vermessen innerhalb von 30 Minuten (450 nm)

Probenvorbereitung: Renin-Konzentration im Urin

- 5 µl Urin
- 15 µl Maleatpuffer
- 50 µl Trypsininhibitor
- 26 µl Reninsubstrat (1:5 verdünnt),
- 10 µl Generation Buffer
- 1 µl PMSF
- Die Probe wurde in Warm- und Kaltwert aufgeteilt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad (Warmwert) bzw. bei 4°C, auf Eis im Kühlschrank (Kaltwert) inkubiert.
- Nach der Inkubation wurden jeweils 47 µl von jeder Probe auf die 96-Well-Platte des ELISAs pipettiert und weiter nach dem Protokoll des Herstellers (siehe 3.6.1) verfahren.

Probenvorbereitung: Renin-Konzentration im Nierengewebe

- 10 µl Probe (Gewebe im Homogenisierungspuffer)
- 10 µl Maleatpuffer
- 50 µl Trypsininhibitor
- 26 µl Reninsubstrat (unverdünnt)
- 10 µl Generation buffer

- 1 µl PMSF
- Die Probe wurde in Warm- und Kaltwert (53 µl) aufgeteilt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad (Warmwert) bzw. bei 4°C, auf Eis im Kühlschrank (Kaltwert) inkubiert.
- nach Inkubation: Zentrifugation: 12.000 rpm, 4°C, 5 min
- Zugabe von 47 µl der Proben, Standard auf die 96-Well-Platte des ELISAs
- Weitere Schritte siehe Anleitung des Herstellers bzw. 3.6.1

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Niere im Querschnitt	5
Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Nephrons.....	7
Abbildung 3 Schematische Darstellung des systemischen RAAS	11
Abbildung 4 Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines Nierengefrierschnitts einer PDGFR β Cre / mTmG Maus.....	45
Abbildung 5 Glomerulus: Reninprotein-Färbung auf einem Gefrierschnitt einer PDGFR β /mTmG Maus	46
Abbildung 6 ISH Renin mRNA, Renin mRNA (braun), Maßstab Balken 50 µm	47
Abbildung 7 Ausschnitt: Nierenmark Fluoreszenz-mRNA Scope: Renin mRNA, PDGFR β mRNA und anschließende Fluoreszenzfärbung (Pro)-Renin einer diabetischen Maus (WT), Maßstab Balken: 50 µm.....	48
Abbildung 8 Ausschnitt: Nierenmark, ISH Renin mRNA und anschließende Färbung mit Renin (isoliert perfundierte Niere mit Brefeldin A), Maßstab Balken: 50 µm	49
Abbildung 9 Gewichte: Körpergewicht, Gehirngewicht, Nierengewicht, Herzgewicht	50
Abbildung 10 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, gesamte Niere	51
Abbildung 11 Renin-Aktivität im Nierengewebe.....	52
Abbildung 12 Renin-, Prorenin-, Aldosteron-Konzentration im Plasma	53
Abbildung 13 Urin: Osmolarität, Elektrolyt-Konzentration.....	54
Abbildung 14 Albumin-Konzentration im Urin,.....	55
Abbildung 15 systolischer Blutdruck	56
Abbildung 16 Blutzuckerspiegel	57
Abbildung 17 Körpergewicht, relatives Nieren- und Herzgewicht, Adeninnephropathie	58
Abbildung 18 Körpergewicht, relatives Nieren- und Herzgewicht: diabetische Nephropathie	59
Abbildung 19 ISH Renin mRNA (braun), Maßstab Balken 50 µm, Adenin.....	61
Abbildung 20 qPCR Renin mRNA, Cortex, Medulla, Papille.....	62
Abbildung 21 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von Renin, Maßstab Balken 50 µm	63
Abbildung 22 ISH Renin mRNA (braun), Maßstab Balken 50 µm, STZ.....	64

Abbildung 23 qPCR Renin mRNA in Bezug auf β aktin: Cortex, Medulla und Papille	65
Abbildung 24 Renin und Prorenin-Konzentration im Plasma: Adenin	66
Abbildung 25 Renin und Prorenin-Konzentration im Plasma: STZ	67
Abbildung 26 Osmolarität und Elektrolytkonzentration, Adenin	68
Abbildung 27 Osmolarität und Elektrolytkonzentration, STZ	69
Abbildung 28 Renin-Konzentration im Urin	70
Abbildung 29 Albuminausscheidung im Urin	71
Abbildung 30 Adenintiere: qPCR Fibronektin mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille.....	72
Abbildung 31 STZ-Tiere qPCR Fibronektin mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille.....	73
Abbildung 32 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von Fibronektin (violett), DAPI (blau) Maßstabsbalken 100 μ m.....	74
Abbildung 33 Adenintiere: qPCR Col1A1 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille	75
Abbildung 34 Adenintiere: qPCR Col3A1 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille	75
Abbildung 35 Fibrosequantifizierung nach Masson Goldner, Fibrose (blau), Maßstabsbalken 100 μ m	76
Abbildung 36 Adenintiere qPCR F4/80 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille	77
Abbildung 37 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von F4/80 (violett), DAPI (blau), Maßstabsbalken 50 μ m	77
Abbildung 38 STZ-Tiere qPCR F4/80 mRNA in Bezug auf β aktin, Cortex, Medulla, Papille	78
Abbildung 39 Glomeruläre Filtrationsrate Adenin und STZ Tiere.....	79
Abbildung 40 Renin-Konzentration im Plasma	80
Abbildung 41 Renin mRNA Scope, Rein mRNA braun, PDGFR β Ren WT Mäuse	81
Abbildung 42 Renin-Konzentration im Plasma, Isoproterenol (ISO)	82
Abbildung 43 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kultivierten PDGFR β -positiven Zellen, Maßstabsbalken: 50 μ m	83
Abbildung 44 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-9 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells	84
Abbildung 45 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-9 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells	85
Abbildung 46 qPCR Renin mRNA in Bezug auf RPL32, PDGFR β -Zellen vor Stimulation 8-10 Tage kultiviert, 1 n= Mittelwert von mindestens 3 Wells	86

9.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-I-Konversionsenzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
ANG	Angiotensin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aqp	Aquaporin
AQP 2	Aquaporin 2
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Circa
Ca ²⁺	Calcium
CAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

Cl ⁻	Chlorid
Cre	CAMP-response Element
CREB	Bindungsstelle des cAMP-bindende Protein
D.h.	Das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EP	Eicosanoid Prostaglandinrezeptor
EPO	Erythropoetin
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
K	Kalium
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule, Einheit für Druck
MQ	MilliQ Reinstwasser
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
P38 MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor beta
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Prorenin Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RPL32	Ribosomales 60S-Protein L32
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sog.	Sogenannt
TMX	Tamoxifen

9.5 Kongressbesuche

100th Meeting of the German Physiological Society, 30.09. - 02.10.2021, Frankfurt (Poster-Preis):

„Functional Relevance of Renin produced by Renal Interstitial Cells“

Claudia Lehrmann, Anna Federlein, Robert Götz, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn, Katharina Broeker, Philipp Tauber Frank Schweda

European Kidney Summer School (EUKISS), 27.04. - 30.04.2022, Berlin (Poster):

„Functional Relevance of Renin produced by Renal Interstitial Cells“

Claudia Lehrmann, Anna Federlein, Robert Götz, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn, Katharina Broeker, Philipp Tauber Frank Schweda

RENpro Summer School, 28.04. - 29.05.2022, Regensburg (Präsentation und Poster)

„Functional Relevance of Renin produced by Renal Interstitial Cells“

Claudia Lehrmann, Anna Federlein, Robert Götz, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn, Katharina Broeker, Philipp Tauber Frank Schweda

Internationales Symposium „What's new in renal tubular and interstitial pathophysiology“, 30.05. - 31.05.2022, Regensburg (Poster)

„Functional Relevance of Renin produced by Renal Interstitial Cells“

Claudia Lehrmann, Anna Federlein, Robert Götz, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn, Katharina Broeker, Philipp Tauber Frank Schweda

Europhysiology 2022, 16.09. - 18.09.2022, Kopenhagen (Poster)

„Functional Relevance of Renin produced by Renal Interstitial Cells“

Claudia Lehrmann, Anna Federlein, Robert Götz, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn, Katharina Broeker, Philipp Tauber Frank Schweda

9.6 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

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

Regensburg, den 08.01.2024

(Claudia Lehmann)

10 Danksagung

Hiermit möchte ich meinen tiefsten Dank an all die Menschen richten, die mich in den vergangenen Jahren begleitet und mit ihrer großartigen Unterstützung meinen Weg geprägt haben.

An erster Stelle und den größten Dank möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Frank Schweda aussprechen. Seine herausragende wissenschaftliche Betreuung sowie die schnelle und erfolgreiche Lösungsfindung bei Problemen waren entscheidend für das Gelingen meiner Arbeit. Vielen Dank für Deine stets offene Tür und das Vertrauen, das Du mir bei der Versuchsplanung und -durchführung entgegengebracht hast. Besonders hervorheben möchte ich, wie Prof. Dr. Frank Schweda mich nicht nur fachlich, sondern auch im beruflichen Leben entscheidend weitergebracht hat. Seine Unterstützung und Erfahrungen haben meinen beruflichen Werdegang nachhaltig geprägt und waren von unschätzbarem Wert.

Des Weiteren möchte ich meinen aufrichtigen Dank an Prof. Dr. Jens Schlossmann und Prof. Dr. Matthias Mack richten, die mir in meiner Forschungszeit als Mentoren zur Seite gestanden haben. Insbesondere während unserer jährlichen Meetings haben sie wertvolle Tipps und Ratschläge geteilt, die meine Arbeit bereichert haben.

Ein herzliches Dankeschön gebührt auch meiner Arbeitsgruppe, der AG Schweda. Der freundliche und gegenseitige Support im Labor sowie der starke Zusammenhalt haben meine Arbeit außerordentlich bereichert. Ein großes Dankeschön an Anna und Philipp, die mich bei meiner Einarbeitung und bei meiner Arbeit so gut unterstützt haben. An die beiden Kathis und an Rosi richte ich meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Labor. Robert, ein herzliches Dankeschön für Deine Unterstützung bei der Mausperfusion und die großzügige Versorgung mit Kaffee. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an meine Mitstreiterinnen Sabrina und Elena für die gemeinsame Zeit im Büro, in der wir viele Höhen und Tiefen gemeinsam durchstanden haben, sowie für die stets verlässliche Hilfe und Unterstützung.

Ein weiteres Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Physiologie und Molekulare Zellbiologie für die Hilfsbereitschaft und die angenehmen Gespräche in der Mittags- und Kaffee-Pause.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden aus Regensburg, München und Würzburg bedanken, die mich während dieser intensiven Zeit auf so vielfältige Weise unterstützt und begleitet haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, meinen Lebensweg in dieser Art und Weise zu gehen und die mich bedingungslos mein ganzes Leben lang unterstützt haben. Ebenso möchte ich meinem Bruder danken, in dem Wissen, dass er mir immer seine Hilfe und Unterstützung anbietet.