

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie II  
Prof. Dr. Frank Schweda  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

# **Veränderungen der Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems in der Niere unter Hyperglykämie**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin

vorgelegt von  
Antonia Herrmann  
aus Berlin



Aus dem Lehrstuhl für Physiologie II  
Prof. Dr. Frank Schweda  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

# **Veränderungen der Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems in der Niere unter Hyperglykämie**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin

vorgelegt von  
Antonia Herrmann  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda

Zweiter Berichterstatter: PD Dr. Franz Josef Putz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>4</b>
2.1	Anatomie und Physiologie der Niere .....	4
2.2	Das systemische Renin-Angiotensin-System .....	6
2.2.1	Angiotensin-II Rezeptoren.....	8
2.2.2	Der (Pro)Renin Rezeptor .....	8
2.3	Das lokale RAS.....	9
2.4	Diabetes mellitus.....	10
2.4.1	Diabetische Nephropathie .....	11
2.4.2	Das intrarenale RAS im Diabetes mellitus.....	12
2.5	Fragestellung und Zielsetzung .....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
3.1	STZ-Modell .....	14
3.2	Fixierung und Einbettung der Mäusenieren .....	14
3.3	RNAscope Assay In-Situ-Hybridisierung .....	15
3.4	Immunfluoreszenz.....	17
3.5	Mikroskopie.....	18
3.6	Quantitative Real-Time PCR .....	18
3.6.1	Isolation der mRNA .....	18
3.6.2	RT-PCR .....	19
3.7	Zonierung und Mikrodissektion.....	20
3.8	Gelelektrophorese.....	21
3.9	Auswertung .....	21
3.9.1	Auswertung der ISH.....	21
3.9.2	Auswertung der RT-PCR .....	22

# Inhaltsverzeichnis

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
4.1	Angiotensinogen .....	23
4.2	ACE .....	25
4.3	ACE 2 .....	31
4.4	AT <sub>1</sub> -Rezeptor .....	32
4.5	AT <sub>2</sub> -Rezeptor .....	35
4.6	Renin .....	35
4.7	(Pro)Renin Rezeptor .....	38
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>40</b>
5.1	Versuchsaufbau und STZ-Modell .....	40
5.2	Angiotensinogen .....	41
5.3	ACE und ACE2 .....	42
5.4	AT <sub>1</sub> -Rezeptor .....	44
5.5	AT <sub>2</sub> -Rezeptor .....	45
5.6	Renin .....	46
5.7	(Pro)Renin-Rezeptor .....	47
5.8	Fazit .....	48
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>51</b>
7.1	Abkürzungen.....	51
7.2	Materialliste .....	52
7.3	Verzeichnisse.....	55
7.3.1	Abbildungsverzeichnis .....	55
7.3.2	Diagrammverzeichnis.....	56
7.3.3	Tabellenverzeichnis .....	56
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>57</b>
8.1	Eidesstattliche Erklärung.....	65
8.2	Danksagung.....	66

# 1 Einleitung

Das zirkulierende Renin-Angiotensin-System (RAS) ist für die Blutdruckregulation und den Elektrolythaushalt des Menschen unerlässlich. Das RAS unterlag bereits ausführlicher Forschung und wird seit über 20 Jahren medikamentös beeinflusst, um häufige Zivilisationskrankheiten wie Bluthochdruck, Herzinsuffizienz oder die diabetische Nephropathie zu behandeln (17; 61; 81; 87).

Neben dem systemisch zirkulierenden RAS existieren gewebständige lokale RAS, deren Funktionen weit über die des „klassischen“ RAS hinausgehen. Sie sind an Entzündungsreaktionen, der Regulation des Körperfettanteils und vielen anderen organspezifischen Funktionen beteiligt (10; 19; 21) . In vielen Organen und Geweben finden sich mehr oder weniger eigenständige RAS, beispielsweise in den Nebennieren, im zentralen Nervensystem, im Herzen sowie im Fettgewebe (10; 21; 81).

Auch die Niere exprimiert alle Komponenten des RAS (41). Eine Überaktivität des intrarenalen RAS kann über weiter unten genauer erläuterte Prozesse zu Vasokonstriktion, Inflammation und Zellproliferation führen. Solche Entwicklungen des RAS beobachtet man unter anderem bei an Diabetes mellitus (DM) Erkrankten. Eine schwerwiegende Komplikation von DM ist die diabetische Nephropathie (DN), welche die häufigste Ursache für terminale Niereninsuffizienz in den Industrienationen darstellt und vermutlich in Assoziation mit dem intrarenalen RAS steht (33; 41).

Zu Alterationen des intrarenalen RAS unter DM wurden bereits einige Arbeiten verfasst (9; 22; 23; 53), die sich intensiv mit einzelnen Komponenten beziehungsweise Nierenabschnitten befassten (22; 45) . Bis jetzt blieben diese Arbeiten jedoch auf einzelne Komponenten oder isoliert betrachtete Abschnitte der Niere beschränkt. Da eine funktionierende RAS-Kaskade aber nicht nur auf das Vorhandensein seiner Einzelkomponenten, sondern auch auf deren geordnete räumliche Anordnung angewiesen ist, ist eine umfassendere Übersicht für ein tieferes Verständnis des intrarenalen RAS inklusive dessen pathophysiologischer Wirkung im DM notwendig. In dieser Arbeit wurden daher die RAS Komponenten systematisch in der gesamten Niere simultan untersucht. In Zukunft könnten diese Ergebnisse weitere Angriffspunkte in der Erforschung der DN und Hypertonie darstellen.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Nieren sind das zentrale Organ des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Mittels Filtration des Blutes sorgen sie für die Ausscheidung von Stoffwechsel-Endprodukten (sogenannte harnpflichtige Substanzen). Darüber hinaus besitzen sie wichtige endokrine Funktionen, wie die Synthese von Calcitriol für den Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) - Stoffwechsel und Renin für die Blutdruckregulation. Außerdem bilden die Nieren sauerstoffabhängig den Wachstumsfaktor Erythropoetin, welcher die Erythropoese stimuliert.

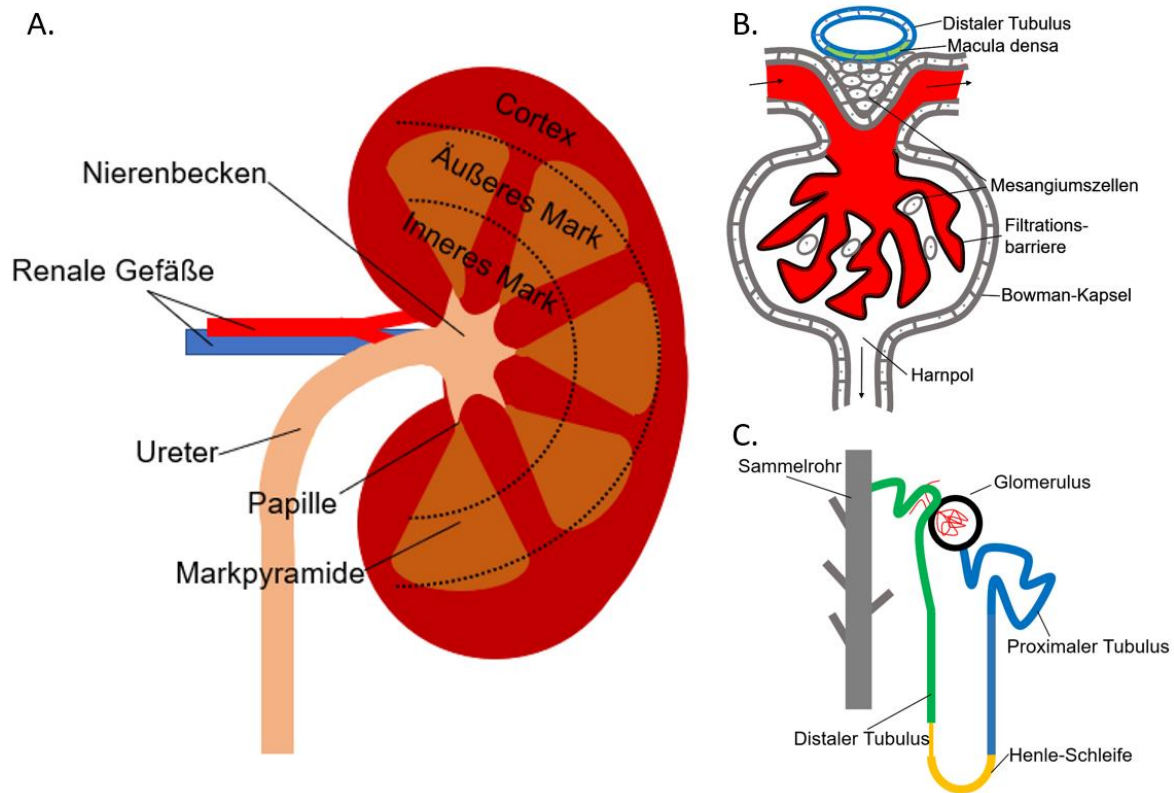
In diesem Abschnitt sind die wichtigsten Aspekte der Anatomie und Physiologie der Niere aufgegriffen worden, die für das Verständnis der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nötig sind. Grundlage hierfür bilden Standardwerke der Anatomie und Physiologie (61; 76; 77), sofern nicht anders angegeben.

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ im retroperitonealem Raum. Eine Niere besteht aus dem äußeren Kortex (Rinde) sowie der äußeren und inneren Medulla (Mark) (Abbildung 1A). Die Medulla besteht beim Menschen aus 10-12 Pyramiden, deren Papillae (Spitzen) gen Nierenbecken weisen (Abbildung 1A). Dort sammelt sich der Harn im Nierenbecken, um durch den Ureter (Harnleiter) in die Vesica urinaria (Harnblase) zu gelangen und schließlich ausgeschieden zu werden.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus einem Glomerulus und dem sich anschließenden Tubulussystem (Abbildung 1C). Der Glomerulus ist aus einem vielfach gewundenem Kapillarknäuel mit einem zu- (Vas afferens) und einem ableitenden (Vas efferens) Gefäß und der Bowman-Kapsel aufgebaut (Abbildung 1B). Pro Minute fließen durchschnittlich 600 mL Blut durch die Nieren, von denen 20 % durch die Filtrationsbarriere der Glomeruli ultrafiltriert werden. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beträgt bei einem gesunden Menschen also ca. 120 mL/min. Die Filtrationsbarriere der Glomeruli besteht von innen nach außen aus dem Endothel der Kapillaren, der Basalmembran und dem Epithel der Bowman-Kapsel.



## Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 1. A. Schematische Darstellung einer Niere. B. Schematische Darstellung eines Glomerulus. C. Schematische Darstellung eines Nephrons** (Eigene Darstellung, erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Die Filtrierbarkeit der sich im Blut befindlichen Moleküle hängt von deren Größe und elektrischer Ladung ab. So gelangen Makromoleküle  $>80$  Kilodalton (kDa) nicht und Proteine mit einer Molekülmasse von ca. 10-70 kDa kaum in das Ultrafiltrat. Durch die negative Ladung der Basalmembran passieren negativ geladene Moleküle (z.B. Albumin) die Filtrationsbarriere schlechter. Das von den Glomeruli gebildete Ultrafiltrat wird Primärharn genannt.

Der Primärharn gelangt über den Harnpol des Glomerulus in das Tubulussystem. Dieses setzt sich aus proximalem Tubulus (PT), Henle-Schleife, distalem Tubulus (DT) und Sammelrohr zusammen. Die Henleschleife unterteilt sich nochmals in die Pars recta des PT, den Intermediärtubulus und die Pars recta des DT. Durch Resorption können im Tubulussystem dem Primärharn spezifische Substanzen (Wasser, Glucose, Ionen etc.) wieder entzogen und durch Sekretion andere Substanzen (Protonen, Ammoniak etc.) hinzugefügt werden. Mittels Kanälen und Transportern in den Zellmembranen, die für jeden Tubulus-Abschnitt spezifisch sind, und dem

Gegenstromprinzip, kann die komplexe Konzentration bis zum Endharn für die aktuellen Bedürfnisse des Körpers optimal angepasst werden.

Die quantitative und qualitative Zusammensetzung des Endharns wird von den Hormonen Aldosteron (siehe 2.2), antidiuretisches Hormon (ADH) und den natriuretischen Peptiden gesteuert. Des Weiteren spielt der tubulo-glomeruläre Rückkopplungsmechanismus durch die juxtaglomerulären Zellen (JGZ), die sich gegenüber dem glomerulären Harnpol befinden, eine bedeutende Rolle. Zum sogenannten juxtaglomerulären Apparat (JGA) zählen die Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen (JGZ) des Vas afferens, die Macula-densa-Zellen des distalen Tubulus desselben Nephrons und die juxtaglomerulären Mesangiumszellen. Sie können die GFR der Zusammensetzung des Harns im frühdistalen Tubulus anpassen.

### **2.2 Das systemische Renin-Angiotensin-System**

Wie bereits erwähnt, ist das systemische RAS für die Regulation des Blutdrucks zuständig. Dabei wirkt es vor allem über Vasokonstriktion und Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts. Es ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Zu Beginn der Kaskade steht das Angiotensinogen (Agt), ein hauptsächlich in der Leber synthetisiertes Plasmaglobulin, dessen Synthese und Freisetzung über Schilddrüsenhormone, Östrogene, Glukokortikoide oder direkt wieder von Angiotensin-II (AngII), dem Endprodukt des RAS, reguliert wird.

Die enzymatische Spaltung von Agt ist der limitierende, also geschwindigkeitsbestimmende Schritt der RAS-Kaskade. Das dafür entscheidende Enzym ist nach seinem Bildungs- und Speicherort benannt: Renin (lateinisch *ren* = Niere). Es wird hauptsächlich in den JGZ der Niere gebildet und dort auch gespeichert. Sobald der Blutdruck fällt, wird Renin in die Blutbahn freigesetzt und spaltet vom Agt zehn Aminosäuren ab. Es entsteht Angiotensin-I (AngI). Als nächstes spaltet das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), welches ubiquitär auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, ein Dipeptid des AngI ab. Am Ende der Kaskade steht nun das biologisch aktive AngII.

ACE ist eine unspezifische Dipeptidase und baut neben AngI weitere Peptide wie Bradykinin, Enkephaline oder die Substanz P ab. Die ACE-verwandte

## Theoretischer Hintergrund

Carboxypeptidase, auch ACE2 genannt, wird in vielen Gewebetypen exprimiert und ist dort auch aktiv (53; 62).

Die höchste Affinität besitzt ACE2 zu AngII, welches es zu Angiotensin (1-7) (Ang (1-7)) spaltet. Ang (1-7) bindet an den Mas-Rezeptor, welcher anti-inflammatorisch und proliferationshemmend wirkt. Die ACE2/Ang (1-7)/Mas-Achse gilt als kontraregulatorische Achse des RAS (62; 83).

Des Weiteren interagiert ACE2 mit dem gleichen Substrat wie das klassische ACE, dem Dekapeptid AngI. Hier spaltet es allerdings – im Gegensatz zu ACE – nur eine Aminosäure (AS) ab, sodass Angiotensin (1-9) (Ang (1-9)) entsteht. Ang (1-9) bindet an den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT<sub>2</sub>-R) (siehe 2.2.1). Des Weiteren kann Ang (1-9) von ACE zu Ang (1-7) gespalten werden (64). Durch den Mas- und den AT<sub>2</sub>-R, sowie den vermehrten Abbau von AngII, wirkt ACE2 auf mehreren Wegen vasodilatatorisch und anti-inflammatorisch (15; 83).

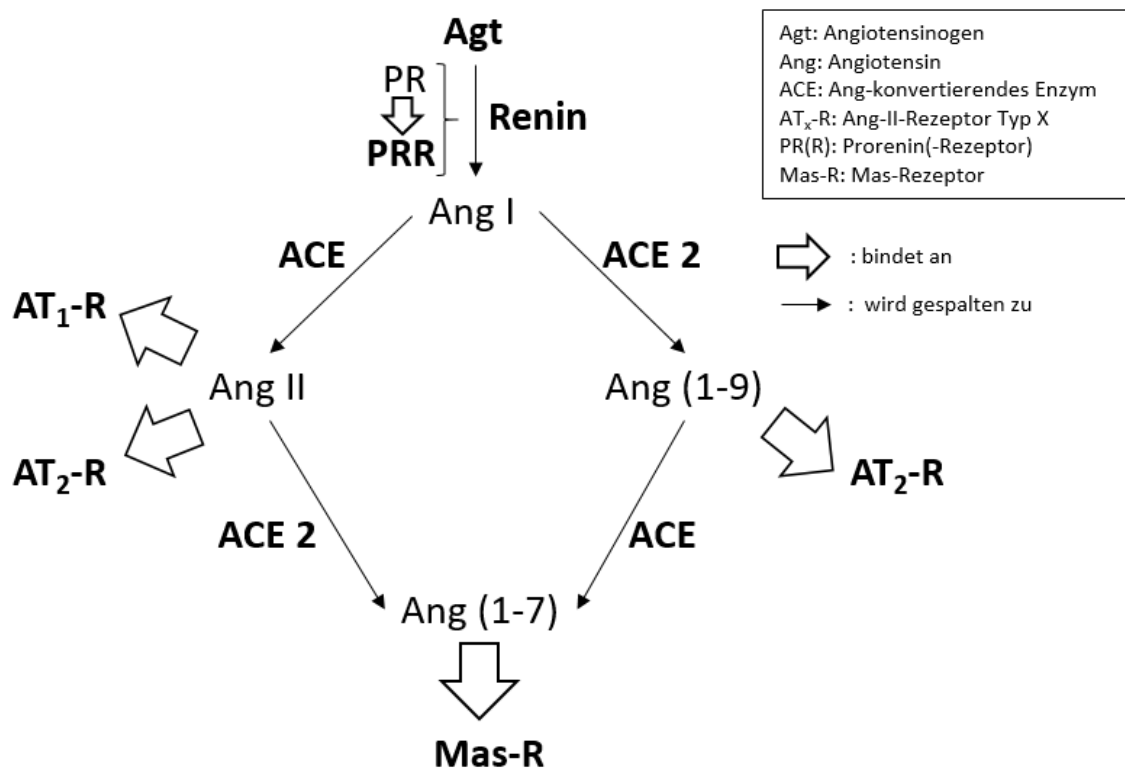


Abbildung 2. Schematische Darstellung des RAS (Eigene Darstellung, erstellt mit Microsoft PowerPoint).

### 2.2.1 Angiotensin-II Rezeptoren

Wie weiter oben beschrieben, entsteht durch die Enzymaktivität des ACE als Endprodukt der RAS-Kaskade AngII. Dieses kann über zwei membranständige Angiotensin-II Rezeptortypen wirken – Typ 1 (AT<sub>1</sub>-R) und Typ 2 (AT<sub>2</sub>-R).

Der G<sub>q</sub>-gekoppelte AT<sub>1</sub>-R wird in Gefäßen, Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Niere und Nebenniere exprimiert. In den glatten Muskelzellen der Gefäßwände bewirkt er via Ca<sup>2+</sup>-Einstrom eine Vasokonstriktion. In den proximalen Tubuli der Niere sorgt der AT<sub>1</sub>-R über Aktivierung des Natrium/Protonen-Austauschers NHE3 für eine verstärkte Natrium- und Wasserrückresorption.

Durch die Bindung von AngII am AT<sub>1</sub>-R kommt es in der Nebenniere zur Aldosteron- und Adrenalinausschüttung. In der Hypophyse wird Vasopressin freigesetzt.

Zusammenfassend führen alle diese Mechanismen zu einem Anstieg des Blutdrucks. Zudem agiert AngII als renaler Wachstumsfaktor und aktiviert andere Wachstumsfaktoren wie den Transforming-Growth-Factor-beta (TGF-β), interstitielle Fibroblasten und mesangiale und tubuläre Zellen. Dies führt zu vermehrter Zellproliferation, vermehrter Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM) und Fibrose. Des Weiteren kann AngII über die Stimulation von Lymphozyten und Monozyten und der dadurch vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu Entzündungsreaktionen beitragen (51). Eine übermäßige AngII-Synthese begünstigt somit profibrotische und proinflammatorische Effekte (22).

Dem AT<sub>1</sub>-R steht der G<sub>i</sub>-gekoppelte AT<sub>2</sub>-R gegenüber. Dieser wirkt durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Bradykinin vasodilatatorisch und durch Antagonisierung von Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen (MAPK) antiinflammatorisch und -fibrotisch. Daneben ist der AT<sub>2</sub>-R maßgeblich an der Embryogenese beteiligt. Ein Gleichgewicht der beiden AngiotensinII-Achsen ist jedoch lebenslang für die Nierengesundheit von Bedeutung (68).

### 2.2.2 Der (Pro)Renin Rezeptor

Der (Pro)Renin Rezeptor (PRR) wurde von Nguyen et al. im Jahr 2002 entdeckt und ist seitdem Objekt zahlreicher Studien (58). Er kommt vor allem im zentralen Nervensystem, dem Herzen, der Plazenta, den Augen und der Niere sowie auf Zellen des Immunsystems vor (32). Neben Renin bindet der PRR reversibel Prorenin (PR),

eine Vorstufe des Renins (35). Durch die Bindung von PR an den PRR wird dieses durch Konformationsänderungen aktiviert und spaltet AngI zu AngII.

Wie bereits erwähnt, katalysiert Renin den limitierenden Schritt bei der Entstehung von AngII. Mit Hilfe des PRR-aktivierten PR kann lokal im Gewebe die AngII-Aktivität signifikant gesteigert und somit die bereits erläuterten AngII-abhängigen profibrotischen und proinflammatorischen Effekte verstärkt werden.

Darüber hinaus werden durch Bindung an den PRR intrazelluläre Signalkaskaden induziert. Hierzu zählen beispielsweise der MAPK-Signalweg, eine wichtige Signaltransduktionskaskade für Zellproliferation und -differenzierung, sowie die pH-regulierende vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) (32; 40; 49; 57).

Des Weiteren fungiert der PRR als Adapter-Protein zwischen der V-ATPase und dem wnt-Rezeptor Komplex. Dieser Komplex ist unter anderem bei der Embryogenese und für die Hämostase von zentraler Bedeutung. Diese Interaktionen unterstreichen die komplexe Wirkungsweise des PRR auf den gesamten Körper (35). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann der PRR zur Fibrose, Hypertonie, kardiovaskulären Erkrankungen, einer gestörten Glucosetoleranz, renaler Schädigung, Übergewicht und anderen Krankheiten mit begünstigen (32).

### **2.3 Das lokale RAS**

Das systemische RAS, wie es in 2.2 beschrieben wurde, stellt einen seit Jahrzehnten bekannten Mechanismus der Blutdruckregulation dar. Als auch in anderen Geweben „ortsfremde“ Komponenten des RAS gefunden wurden, musste diese lineare Vorstellung erweitert werden. Beispielsweise fanden 1971 von Ganten et al. Renin im zentralen Nervensystem (ZNS), während die Renin-Synthese im Uterus bereits bekannt war (24).

Die lokalen oder auch Gewebe-RAS sind bis zur Gegenwart Objekt zahlreicher Forschungsgruppen. Es wurden RAS Komponenten in vielen Gewebetypen und Organen detektiert (63). In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass das Gewebe-RAS im ZNS für die zentrale Blutdruckregulation und Neuroprotektion wichtig ist (21; 27). In der Bauchspeicheldrüse stimuliert es die Insulinsekretion. Ein weiteres Exempel ist das RAS im Fettgewebe, welches das Körpergewicht des Organismus beeinflussen kann (10).

So liegt auch in der Niere ein Gewebe-RAS vor, welches alle RAS Komponenten unabhängig vom zirkulierenden RAS exprimiert und deren physiologischen Funktionen aufrecht erhält (41). Die Zellen des PT bilden Leber-unabhängiges Agt und sezernieren dieses in das tubuläre Lumen. ACE findet sich größtenteils im Bürstensaum der PT, aber auch in Glomeruli und DT (17). Neben der Bildung von Renin in den JGZ findet diese auch in Zellen der PT, Intermediärtubuli und SR statt (80). Die AngII-Konzentration in den PT ist bereits unter physiologischen Bedingungen um ein Vielfaches höher als die des zirkulierenden AngII, sodass diese nicht allein durch Filtration aus dem Plasma zu erklären ist (43).

Es ist häufig schwierig zwischen systemisch zirkulierendem und lokalem RAS zu differenzieren. Jedoch gibt es Hinweise, dass die beiden Systeme sowohl parallel als auch konträr reguliert werden können. So reagieren sowohl das systemische als auch das intrarenale RAS ähnlich auf eine veränderte Salz-Zufuhr, während sich die beiden bei Diabetes mellitus und einigen Hypertonieformen gegensätzlich verhalten (19; 37; 67).

### **2.4 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus (DM) ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal die chronische Hyperglykämie darstellt. Ätiologisch ist dies auf einen gestörten Insulinstoffwechsel zurückzuführen.

Beim DM Typ 1 sind >80 % der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen der Bauspeicheldrüse destruiert, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Der Krankheitsbeginn ist meist im Jugendalter und hauptsächlich autoimmun oder idiopathisch begründet (33).

Dem DM Typ 2 liegt eine Insulinresistenz, ein sekretorischer Defekt sowohl der  $\beta$ -Zellen als auch der Glucagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen im Pankreas, sowie eine verminderte Sekretion und Wirkung Glukagon-ähnlicher Peptide zugrunde. Glukagon-ähnliche Peptide, wie z.B. das Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1), sind gastrointestinale Hormone, die die Insulinfreisetzung und das Sättigungsgefühl regulieren (54). Die Ursachen für DM Typ 2 liegen häufig in Überernährung und Bewegungsmangel begründet, ein Zustand, wie er bei vielen Menschen in Industrienationen vorliegt. Mit DM Typ 2 assoziiert ist das metabolische Syndrom, welches durch die Trias Adipositas, Hypertonie und Dyslipoproteinämie definiert ist (33).

DM ist eine weltweit epidemische Erkrankung. Laut der International Diabetes Federation waren 2021 weltweit rund 537 Millionen Erwachsene und mehr als 1,2

Millionen Kinder und Jugendliche erkrankt. Für das Jahr 2045 werden 643 Millionen Diabetiker und Diabetikerinnen prognostiziert (33). Diabetes ist die häufigste Ursache für Erblindung, Herzinfarkte, Schlaganfälle und chronisches Nierenversagen (88).

### 2.4.1 Diabetische Nephropathie

Die Diabetische Nephropathie (DN) ist eine der gravierendsten Komplikationen des DM und in Europa und den USA mit etwa 40 % der häufigste Grund für eine Dialyse-Pflichtigkeit. Die Prävalenz beträgt bei Diabetikern vom Typ 2 ca. 10 %, bei Diabetikern vom Typ 1 sogar 15 % (33).

Die DN ist eine chronische renale Schädigung durch eine diabetische Stoffwechsellage, die mit einer persistierenden Albuminurie (>300 mg/d) einhergeht. Die GFR ist zu Beginn der Erkrankung, noch bevor histologische Veränderungen sichtbar werden, aufgrund von renaler Hypertrophie und glomerulärer Hyperfiltration zunächst erhöht. Im Krankheitsverlauf nimmt die GFR mit zunehmender Albuminurie kontinuierlich ab (56). Die DN ist mit einem proportional zur Menge des ausgeschiedenen Albumins steigenden kardiovaskulären Risiko verbunden. Weiterhin korreliert die Schwere der DN mit der Erkrankungsdauer und der Qualität der Blutzucker-Einstellung. Histologisch wird die DN in vier Stadien eingeteilt (Tabelle 1, (33)):

I	Verbreiterung der GBM in der Elektronenmikroskopie
II	Mesangiale Expansion in > 25 % des Mesangiums
III	Noduläre Sklerose (Kimmelstiel-Wilson)
IV	Fortgeschrittene diabetische Glomerulosklerose in > 50 % der Glomeruli

Tabelle 1. Histologische Einteilung der DN. (Darstellung nach (33)) GBM=glomeruläre Basalmembran

Die wichtigste Therapiemaßnahme gegen das Fortschreiten einer DN ist ein frühzeitiger Beginn mit einer anti-hypertensiven Medikation. Auch wenn nur ein leicht erhöhter Blutdruck besteht, ist die Senkung des Blutdrucks von immenser Bedeutung, da vor allem bei DM Typ 2 eine Hypertonie den Progress der DN rapide aggraviert. Hierfür haben sich Inhibitoren des RAS - ACE-Hemmer (ACE-I) und AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten (ARB) - als wirksamste Pharmazeutika etabliert (18; 34; 83). Sie können das Voranschreiten einer DN hemmen, reduzieren das kardiovaskuläre Risiko und können somit die Gesamtmortalität signifikant senken (44).

### 2.4.2 Das intrarenale RAS im Diabetes mellitus

Wie bereits beschrieben, ist die DN eine schwerwiegende Komplikation des DM und bestimmt maßgeblich das Mortalitätsrisiko. Des Weiteren steigt ihre Prävalenz seit Jahren an und belastet neben den persönlichen Individuen auch sozioökonomisch die Gesellschaft (28). Somit ist es von besonderer Bedeutung den Pathomechanismus der Entwicklung der DN genau zu verstehen.

Unter anderem wird die Zunahme von EZM und die Verbreiterung der GBM, wie für die DN charakteristisch, durch sogenannte *advanced glycation end products* (AGEs) erklärt. AGEs sind Endprodukte einer nicht-enzymatischen, irreversiblen Glykierung von reduzierenden Zuckern mit Aminogruppen von Proteinen, Fetten oder Nukleinsäuren. Diese lagern ab, akkumulieren und schädigen die Niere dauerhaft (73).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Pathogenese der DN ist das lokale RAS in der Niere. Da AngII stark vasokonstriktorisch, proinflammatorisch und profibrotisch wirkt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein aktiviertes RAS an der DN beteiligt sei. Dafür sprechen intrarenal erhöhte AngII Level bei Diabetikern (66). Gleichzeitig sind Ang-II-abbauende Faktoren wie ACE2 bei einer bestehenden Nierenschädigung geschwächt, was schließlich in einer Niereninsuffizienz enden kann (19).

Interessanterweise findet man sowohl im diabetischen Tiermodell als auch in Diabetes-Patienten normale bis leicht erniedrigte Reninkonzentrationen im Plasma, obwohl Renin bei einem aktivierten systemischen RAS erhöht sein müsste. Gleichzeitig werden paradoxerweise erhöhte PR-Konzentrationen im Plasma bei Diabetikern gemessen (18). Weiterhin ist bekannt, dass Patienten mit chronischer Nierenschädigung erhöhte intrarenale PRR-Level aufweisen und diese am Prozess der Schädigung beteiligt sind (47). Über die PRR in der Niere kann das Plasma-PR für eine Aktivierung des Gewebe-RAS sorgen, sodass lokal vermehrt AngII gebildet wird. Daneben stehen auch RAS-unabhängige, die DN begünstigende Effekte zur Diskussion, die durch den PRR ausgelöst werden, da PRR wie bereits kurz erläutert an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt ist (25). So wird beispielsweise die renale Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch die Bindung von PR an den PRR über einen AngII-unabhängigen Signalweg stimuliert (22; 49).



## 2.5 Fragestellung und Zielsetzung

In der Niere besteht parallel zum systemischen RAS ein lokales, eigenständiges RAS. Dieses intrarenale RAS scheint in Patienten mit DM aktiviert zu sein, da erhöhte AngII-Level in diabetischen Nieren gemessen wurden. Des Weiteren verbessert die frühzeitige medikamentöse RAS Blockade das Outcome von Diabetikern mit renaler Schädigung signifikant, was zusätzlich für einen Zusammenhang zwischen einem aktivierten intrarenalen RAS und DM spricht.

Es bestehen weiterhin Wissenslücken zur genauen Lokalisation der renalen Bildung aller wichtigen RAS Komponenten und dessen Änderungen unter chronischer Hyperglykämie, obwohl bereits erste Untersuchungen bezüglich einzelner Komponenten des intrarenalen RAS im Kontext des DM erfolgten.

Um diese Lücken zu schließen und somit den Einfluss des intrarenalen RAS auf DM und insbesondere die DN besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die renale Genexpression von Agt, Renin, ACE, ACE2, PRR, AT<sub>1</sub>-R und AT<sub>2</sub>-R bei Mäusen mit chronischer Hyperglykämie untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Der Bildungsort dieser RAS Komponenten wurde dabei durch In-situ-Hybridisierung, welche die spezifische messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) markierte, und partieller immunhistochemischer Kennzeichnung von proximalem Tubulus, Sammelrohr und distalem Tubulus beurteilt. Zusätzlich wurden die mRNA Konzentrationen in zonierten beziehungsweise mikrodisszierten Nieren mit Hilfe von RT-PCR gemessen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 STZ-Modell

Bei fünf der insgesamt acht Versuchsmäuse, die für die In-situ-Hybridisierung (ISH) verwendet wurden, wurde künstlich mit Streptozocin (STZ) ein DM-Typ 1 induziert. STZ ist ein von Bakterien produziertes Glukosamin, welches spezifisch die  $\beta$ -Zellen in der Bauchspeicheldrüse destruiert. Somit wurde ein absoluter Insulin-Mangel herbeigeführt (14). Der STZ-erzeugte DM bestand bei den Tieren 8 Wochen bevor die Nieren zur histologischen Aufarbeitung sowie für PCR-Untersuchungen entnommen wurden.

Die anderen drei Mäuse wurden nicht mit STZ behandelt und unter denselben Bedingungen gehalten. Sie stellten die Kontrollgruppe dar, um die Veränderung der RAS Komponenten qualitativ und quantitativ einordnen zu können. Die STZ-Applikation und anschließende Betreuung der Versuchsmäuse erfolgte durch die Unterstützung von Dr. rer. nat. Anna Federlein (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg). Alle Tierexperimente sind von der lokalen Genehmigungsbehörde (Regierung von Unterfranken) im Rahmen eines Tierversuch-Antrags genehmigt worden.

### 3.2 Fixierung und Einbettung der Mäusenieren

Um das Nierengewebe auf das RNAscope Assay vorzubereiten, wurde es formalinfixiert und Paraffin-eingebettet (FFPE). Dazu wurden die Nieren zunächst von Robert Götz (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg) mit einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung perfusionsfixiert, sodass autolytische Reaktionen in den entnommenen Nieren unterbunden wurden. Nur durch die Perfusionsfixation wird das Gewebe in seiner möglichst ursprünglichen Form erhalten und konservierbar. Anschließend wurde das Gewebe für 16 bis 32 Stunden in 10 %-igem neutral gepuffertem Formalin (NBF) bei Raumtemperatur nachfixiert. Es folgte eine mindestens 12-stündige Lagerung in 70 %-igem Methanol. Danach wurde das Gewebe in Kapseln eingebettet und durch eine konzentrationsaufsteigende Alkoholreihe entwässert:

- 2 x 30 Minuten 70 % Methanol (RT)
- 2 x 30 Minuten 80 % Methanol (RT)

## Ergebnisse

- 2 x 30 Minuten 90 % Methanol (RT)
- 2 x 30 Minuten 100 % Methanol (RT)
- 2 x 30 Minuten 100 % Isopropanol (RT)
- 1 x 30 Minuten 100 % Isopropanol (45 °Celsius (°C))
- 1 x 30 Minuten Isopropanol/Paraffin (1:2) - Gemisch (55°C)
- 2 x 24 Stunden Paraffin (60 °C)

Anschließend konnten die Präparate in Paraffin eingebettet, im Wasserbad für wenige Stunden abgekühlt und somit konserviert werden. Die Gewebeaufarbeitung bis zu diesem Punkt wurde von Dr. rer. nat. Anna Federlein durchgeführt (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg).

### 3.3 RNAscope Assay In-Situ-Hybridisierung

Das RNAscope Assay (Advanced Cell Diagnostics, ACD) ist eine spezifische In-Situ-Hybridisierung (ISH), die das Signal der zu detektierenden mRNA amplifiziert, während es Störsignale im Hintergrund supprimiert.

Maximal sieben Tage bevor die Hybridisierung stattfinden sollte, wurden die in Paraffinblöcken eingebetteten Mäusenieren an einem Mikrotom in 5 µm dünne Lamellen geschnitten, in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und mit Hilfe einer Wärmeplatte auf Superfrost-Plus-Objektträgern aufgebracht.

Am ersten Tag der ISH wurde zuerst der Großteil des Paraffins durch Backen bei 60 °C von den Objektträgern heruntergeschmolzen. Der Rest wurde durch je 2-maliges Waschen mit Xylol (10 Minuten) und Ethanol 100 % (1 Minute) entfernt.

Nach der Entparaffinierung wurde mit Hilfe von Wasserstoffperoxid die endogene Peroxidase blockiert. Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten mit *Target Retrieval* im Dampfgarer erhitzt. Das *Target Retrieval* ist ein Puffersystem, welches mögliche, durch die Gewebefixation entstandene, intermolekulare Vernetzungen wieder löst. Damit die Amplifizierungsflüssigkeiten auf dem Gewebe blieben, wurde mit einem Fettstift eine hydrophobe Barriere um das Gewebe gezogen.

Am zweiten Tag wurde der letzte Schritt zur Vorbereitung des Gewebes durchgeführt. Das Gewebe wurde 15 Minuten mit Protease Plus behandelt, sodass die Zellwände für die ISH-Sonden durchlässig wurden.

Der erste Schritt der eigentlichen ISH stellte eine zweistündige Inkubation der Sonden bei 40 °C in einer feuchten Kammer dar. In dieser Zeit banden die Sonden (~ 20

## Ergebnisse

Basenpaare) spezifisch an die RNA. Die folgenden Amplifikationsschritte wurden nach Anleitung der Firma ACD durchgeführt.

Zur Detektion einer einzelnen mRNA wurde das BROWN RNAscope Kit mit folgendem Protokoll verwendet (Tabelle 2). Die Sonde zeigte sich lichtmikroskopisch braun.

<b>Amplifikation</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
<b>1</b>	30 min	40 °C
<b>2</b>	15 min	40 °C
<b>3</b>	30 min	40 °C
<b>4</b>	15 min	40 °C
<b>5</b>	45 min	RT
<b>6</b>	15 min	RT
<b>Signal</b>	10 min	RT
<b>Hämatoxylin</b>	2 min	RT
<b>Reinstwasser</b>	~5 sec (2x)	RT
<b>Ethanol (70 %)</b>	2 min	RT
<b>Ethanol (100 %)</b>	2 min	RT
<b>Xylol</b>	5 min	RT

Tabelle 2. Protokoll des BROWN RNAscope Kit (Quelle: ACD).

Zur Detektion von zwei mRNA auf einem Schnitt wurde das DUPLEX RNAscope Kit mit folgendem Protokoll verwendet (Tabelle 3). Lichtmikroskopisch zeigte sich eine der Sonde rot, die andere grün.

<b>Amplifikation</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
<b>1</b>	30 min	40 °C
<b>2</b>	15 min	40 °C
<b>3</b>	30 min	40 °C
<b>4</b>	15 min	40 °C
<b>5</b>	30 min	RT
<b>6</b>	15 min	RT
<b>Rotes Signal</b>	10 min	RT
<b>7</b>	15 min	RT
<b>8</b>	30 min	40 °C

## Ergebnisse

<b>9</b>	30 min	RT
<b>10</b>	15 min	RT
<b>Grünes Signal</b>	10 min	RT
<b>Hämatoxylin</b>	30 sec	RT
<b>Reinstwasser</b>	~5 sec (2x)	RT

**Tabelle 3. Protokoll des DUPLEX RNAscope Kit** (Quelle: ACD).

Zwischen den Amplifikationsschritten wurden die Schnitte mit RNAscope Waschpuffer jeweils zweimal für 2 Minuten gewaschen.

Nach dieser Behandlung konnten die Objektträger mit Serva Mounting Medium eingedeckelt werden. Nachdem sie getrocknet waren, standen sie der durchlichtmikroskopischen Untersuchung zur Verfügung.

Bei Nagetieren gibt es 2 Subtypen des AT<sub>1</sub>-R, den AT<sub>1A</sub>-R und den AT<sub>1B</sub>-R (20). In dieser Arbeit wurde der AT<sub>1A</sub>-R untersucht, da nur dieser in der Niere exprimiert wird (13).

### 3.4 Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz (IF) werden Antigen-Antikörper-Reaktionen genutzt, um spezifische Proteine zu markieren und im zweiten Schritt sichtbar zu machen.

Die primären Antikörper (AK) sind so konzipiert, dass sie an einer bestimmten Stelle des zu detektierenden Proteins, wie an einem Antigen, binden. Der sekundäre fluorophormarkierte AK bindet an den primären Antikörper, sodass schließlich der Immunkomplex mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden kann. Die IF ist eine etablierte Technik zum qualitativen Nachweis zellulärer Strukturen.

Um die einzelnen Nephronabschnitte genau abgrenzen zu können, wurde die ISH partiell mit folgendem IF-Protokoll ergänzt (Tabelle 4).

<b>Substrat</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
<b>Reinstwasser (2x)</b>	Je 5 min	RT
<b>PBS<sup>*</sup> (3x)</b>	Je 5-10 min	RT
<b>Blockierlösung<sup>**</sup></b>	60 min	RT
<b>Primär-AK in Blockierlösung</b>	Über Nacht	4 °C
<b>PBS + 1 % BSA (3x)</b>	Je 5 min	RT

## Ergebnisse

<b>Sekundär-AK in</b>	90 min	RT
<b>Blockierlösung</b>		
<b>PBS (3x)</b>	Je 5 min	RT

**Tabelle 4. IF-Protokoll** (Quelle: Arbeitsgruppe Prof. F. Schweda, Universität Regensburg). \*) *phosphate-buffered saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung). \*\*) 1 % BSA (bovines Serumalbumin) + 10 % Pferdeserum in PBS

Da der Sekundärantikörper äußerst lichtempfindlich ist und nicht austrocknen darf, wurden die letzten Schritte in einer dunklen, feuchten Kammer durchgeführt.

Abschließend wurden die Objektträger mit vorgewärmtem DAKO-Mounting Medium eingedeckelt und bei 4 °C gelagert bis das Medium ausgehärtet war.

Eine Liste der verwendeten Antikörper hängt dieser Arbeit an (siehe 7.2).

### 3.5 Mikroskopie

Die Nierenschnitte wurden mit Hilfe eines Axiovert200M-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage analysiert und dokumentiert. Alle Aufnahmen wurden mit der Software ZEN lite (2012) von Zeiss getätigt. Für die Aufnahmen der ISH-Schnitte wurde die Farbkamera AxioCam105 color verwendet. Wenn zusätzlich eine IF-Färbung angefertigt wurde, erfolgte außerdem eine Aufnahme mit der Schwarz-Weiß-CCD-Kamera AxioCam MRm und einem passenden Fluoreszenzfilter. Dadurch wurden die sekundären Antikörper (Cy2 und Cy5) angeregt und das zurückgesendete Emissionslicht konnte aufgenommen werden.

### 3.6 Quantitative Real-Time PCR

#### 3.6.1 Isolation der mRNA

Um die mRNA mittels quantitativer Realtime Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) analysieren zu können, musste die mRNA zunächst aus dem Gewebe und den Zellen extrahiert werden. Dies erfolgte mit der TRIsure-Reagenz von Biotek. Durch Zugabe von Chloroform wurde die Lösung in drei Phasen aufgetrennt: in eine Phenol-, eine Protein- und eine wässrige Phase, in der die RNA gelöst war. Diese wurde unter Zuhilfenahme von Isopropanol ausgefällt, zentrifugiert und getrocknet. Das so entstandene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C und in Nuklease-

## Ergebnisse

freiem Wasser gelöst gelagert. Den Prozess der mRNA-Isolation führte Dr. rer. nat. Anna Federlein (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg) durch.

### 3.6.2 RT-PCR

Die quantitative RT-PCR erlaubt es, Aussagen über die quantitative mRNA Expression eines Gens zu treffen.

Da die für die PCR eingesetzten Polymerasen nur mit DNA als Ausgangsmolekül interagieren können, musste die mRNA zunächst durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese konnte anschließend mit Hilfe der PCR vermehrt werden.

Der erste Schritt der PCR war die Denaturierung der cDNA durch Erhitzen auf 95 °C, sodass sich nun die Primer anlagern konnten. Für jedes Gen wurde ein Primer-Paar verwendet, welches spezifisch an ein Gen band, um nur diese Stelle der DNA zu amplifizieren. Ausgehend von den Primern wurden jeweils zwei neue komplementäre DNA-Stränge durch die Polymerasen synthetisiert. Während jedes Amplifikationsschritts der PCR lagerten sich ein zuvor dem Master Mix hinzugefügter DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff an die doppelsträngige DNA an. Da die Menge des angelagerten Farbstoffs proportional zur Menge der entstandenen DNA war, konnte nach jedem Amplifikationsschritt die DNA *quantitativ in Real-Time* photometrisch gemessen werden.

Aus der Zunahme der Intensität der Emission und dem Vergleich mit einer Standardkurve, die vorab durch eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen berechnet wurde, konnte die relative Expression ermittelt und anschließend auf das Ribosomale Protein L32 (RPL32) normiert werden. RPL32 ist ein sogenanntes Housekeeper-Gen. Es wird konstitutiv exprimiert und wurde als konstant angenommen.

Nach Beendigung der Amplifikation wurde der Schmelzpunkt der entstandenen doppelsträngigen Kopien ermittelt. Hierbei wurde das Reaktionsgemisch erneut stark erhitzt, sodass die Doppelstränge in Einzelstränge zerfielen und das Fluoreszenzsignal erlosch. Wenn nur, wie es im Idealfall sein sollte, ein Produkt entstanden war, wurde genau ein Schmelzpunkt gemessen. Dieser Schritt wurde als Qualitätskontrolle der abgelaufenen RT-PCR angeschlossen.

## Ergebnisse

Zur Messung wurde 1 µl cDNA mit 9 µl Master Mix gemischt (Tabelle 5). Die RT-PCR wurde mit dem Lightcycler LC480 von Roche und dem Lightcycler 480<sup>®</sup> SYBR Green I Master Kit durchgeführt (Tabelle 6).

### MasterMix

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

Tabelle 5. Zusammensetzung des MasterMix (Quelle: Roche).

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

Tabelle 6. Protokoll der RT-PCR (Quelle: Roche).

### 3.7 Zonierung und Mikrodisektion

Die in der RT-PCR untersuchten Nierenproben wurden zu einem Teil in Kortex, Mark und Papille zoniert. Der andere Teil ist mit Hilfe eines Stereomikroskops und einer Mikroskopiernadel in einzelne Nephronsegmente isoliert worden, sodass Glomeruli, kortikale Tubuli und medulläre Tubuli differenziert voneinander beurteilt werden konnten. Sowohl die Zonierung als auch Mikrodisektion erfolgte durch die Unterstützung von Dr. rer. nat. Anna Federlein (AG Prof. Schweda, Institut für Physiologie, Universität Regensburg).



### 3.8 Gelelektrophorese

Um die Primer, die für die RT-PCR verwendet wurden, auf ihre Spezifität zu prüfen, wurde jeder Primer (siehe 7.2) durch eine herkömmliche PCR vermehrt und das Produkt anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieses Gel lief bei einer Spannung von 120 V für 30 min, sodass sich die DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe auftrennten. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff (Midori Green) wurden diese sichtbar gemacht und die Größe anhand eines 50-Basenpaar-Standards bestimmt.

### 3.9 Auswertung

#### 3.9.1 Auswertung der ISH

Die Auswertung der ISH erfolgte durch das Axiovert200M-Mikroskop. Zur Quantifizierung der glomerulären ACE und AT<sub>1</sub>-R Expression wurden jeweils ca. 100 Glomeruli pro Versuchstier ausgezählt und ihr mRNA Signal bewertet. Die Bewertung der Glomeruli orientierte sich anhand dem Score, der von ACD zur Auswertung der ISH zur Verfügung gestellt wird (Tabelle 7). Es erfolgte die Berechnung des Mittelwerts mit dazugehörigem Standardfehler. Anschließend wurde eine statistische Auswertung mittels Zwei-Stichproben-t-Test durchgeführt, um die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz zu prüfen. Das Signifikanzniveau wurde auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  festgelegt. Die Ergebnisse wurden in Boxplot-Säulendiagrammen graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit Hilfe von Microsoft Excel 2010.

Für die Zielgene Agt, ACE2, AT<sub>2</sub>-R, Renin und PRR konnte nur in einzelnen oder keinen Glomeruli und insgesamt nur wenig Signal detektiert werden, sodass eine manuelle Auszählung keinen Zugewinn an Informationen versprach. Quantitative Daten der ISH wurden hier auf Grund dessen nicht erhoben.

Score	Kriterien
0	Kein Signal
1	1-3 Punkte je Zelle
2	4-9 Punkte je Zelle
3	10-15 Punkte je Zelle, <10 % der Punkte zu Clustern verschmolzen
4	>15 Punkte je Zelle, >10 % der Punkte zu Clustern verschmolzen

Tabelle 7. Auswertung der mRNA in Glomeruli anhand mikroskopischer Aufnahmen der ISH (Quelle: ACD).

## Ergebnisse

Die restlichen Nephronsegmente wurden durch Dokumentation und Vergleich der Versuchstiere untereinander mittels Mikroskopierens ausgewertet.

Zur eindeutigen Zuordnung, wurden für die Agt, ACE und AT<sub>1</sub>-R Expression für den proximalen Tubulus, den distalen Tubulus und für das Sammelrohr (SR) spezifische Antigene mittels IF angefärbt, um die Lokalisation der mRNA Expression zu spezifizieren. Die genannten Komponenten zeigten die höchste tubuläre Expression, sodass hier eine Untersuchung der Nephronsegment-spezifischen Synthese sinnvoll erschien. Folgende Proteine wurden für die IF-Färbung herangezogen (Tabelle 8).

<b>Nephronsegment</b>	<b>Antigen</b>	<b>Funktion des Antigens</b>
<b>Proximaler Tubulus</b>	Megalin	Endozytose von Makromolekülen
<b>Sammelrohr</b>	Aquaporin 2 (AQP)	Wasser-Resorption
<b>Distaler Tubulus</b>	Calbindin	Ca <sup>2+</sup> -Transport

Tabelle 8. Zuordnung der Antigene bezüglich Nephronsegment und Funktion (16) (61) (31).

### 3.9.2 Auswertung der RT-PCR

Die Werte der RT-PCR wurden mit der zugehörigen LightCycler-Software und Microsoft Excel aufgezeichnet, verarbeitet und ausgewertet. Zunächst wurden die Werte des Zielgens mit der Formel  $2^{-\Delta C_p}$  (Cp Zielgen – Cp Housekeeping-Gen) normiert. Für die Normierung wurde das Housekeeping-Gen RPL32 verwendet. Cp steht für den *Crossing point*. Dieser Punkt beschreibt den Zeitpunkt, an dem genügend Fluoreszenz-Farbstoff an die synthetisierte cDNA gebunden hat, sodass die Emissionen detektierbar werden.

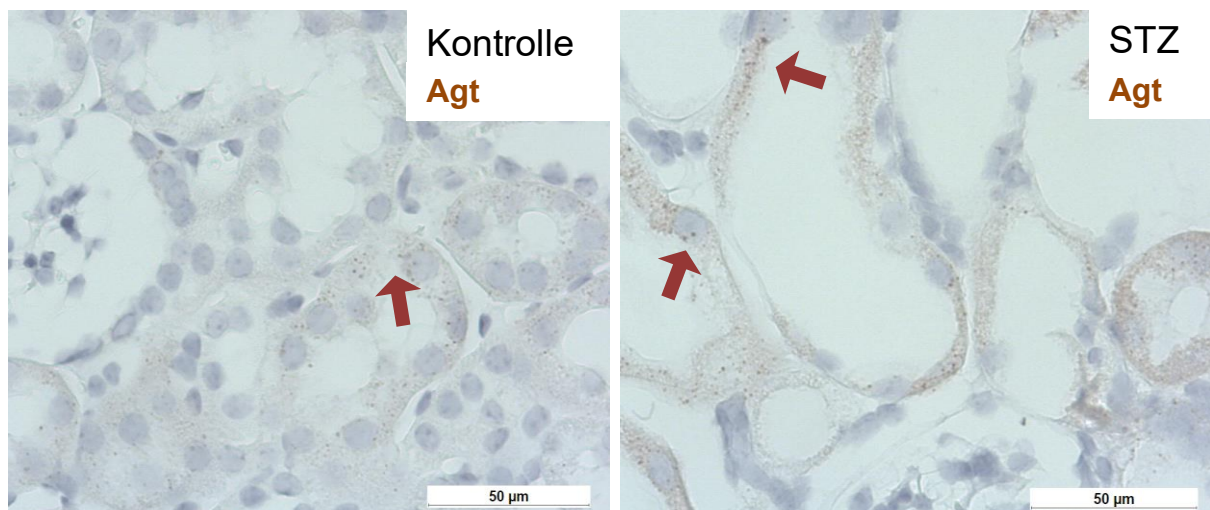
Es erfolgte die Berechnung des Mittelwerts mit dazugehörigem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 3.9.1 beschrieben. Die statistische Auswertung und deren graphische Darstellung in Form von Boxplot-Säulendiagrammen wurde mit Microsoft Excel 2010 durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Mit dieser Arbeit sollte die Expression des intrarenalen RAS in den verschiedenen Nephronsegmenten dargestellt werden. Der Schwerpunkt lag auf den Veränderungen des intrarenalen RAS bei chronischer Hyperglykämie. Hierfür wurde die Genexpression ausgewählter Komponenten des RAS sowohl mit ISH als auch mit RT-PCR im STZ-Mausmodell und Kontrolltieren untersucht.

### 4.1 Angiotensinogen

Agt mRNA wurde mittels ISH vor allem – sowohl in den STZ- als auch in den Kontrollnieren – im Kortex detektiert (Abbildung 3). In der Gruppe der STZ-Tiere zeigte sich das mRNA Signal leicht erhöht. Die Intensität des Signals ließ gen Papille kontinuierlich nach und war dort kaum mehr nachzuweisen. Mit Hilfe der ISH und anschließender IF-Färbung mit Megalin konnte die mRNA Expression von Agt überwiegend den proximalen Tubuli zugeordnet werden (Abbildung 4A). Die glomeruläre Expression (nicht dargestellt) und die tubuläre Expression in den anderen Nephronabschnitten fiel sehr gering aus, sodass auf eine manuelle Auszählung beziehungsweise weitere IF verzichtet wurde.

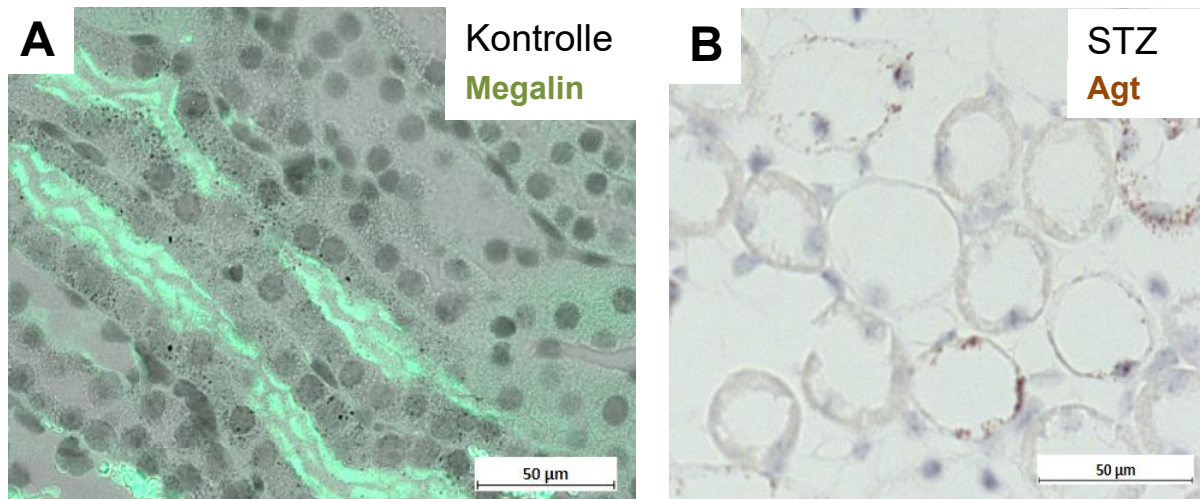


**Abbildung 3. BROWN RNAscope Assay mit Agt (braun, exemplarische Pfeile), mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung). Vergleich der kortikalen mRNA-Expression von Agt zwischen einem Kontrolltier und einem STZ-Tier.**

Neben den proximalen Tubuli fand sich in der Niere eines STZ-Tieres zusätzlich Agt Signal gen Papille in einzelnen lumenführenden Strukturen, welche sich standardmorphologisch am ehesten Intermediärtubuli zuordnen lassen (Abbildung

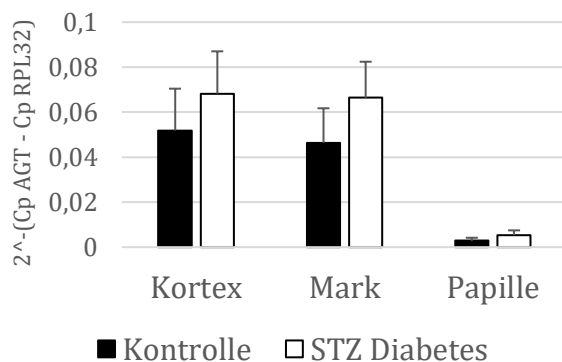
## Ergebnisse

4B). In der Kontrollgruppe konnte kein Signal in ähnlichen Strukturen nachgewiesen werden (nicht dargestellt).



**Abbildung 4. BROWN RNAscope Assay mit Agt (braun),** mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung). **A.** Zusätzliche IF mit Megalin (grün) bei einem Kontrolltier zur Darstellung der proximalen Tubuli, in denen die meiste mRNA-Expression lokalisiert war. **B.** Agt-mRNA in der Papille bei einem STZ-Tier, am ehesten Intermediärtubuli entsprechend.

Bereits durch die Auswertung der ISH-Mikroskopie konnte ein Anstieg der Agt Synthese im STZ-Modell durch mikroskopisches Vergleichen vermutet werden. Mit Hilfe der RT-PCR zeigte sich ebenfalls der Trend eines Anstiegs der Agt mRNA in allen separat gemessenen Teilen der zonierten Nieren, jedoch waren die p-Werte in allen Messungen weit von der definierten Irrtumswahrscheinlichkeit entfernt und die Standardabweichungen hoch (Diagramm 1). Da PT vor allem im Kortex, aber auch im Mark lokalisiert sind, könnte dieser mögliche Trend mit der vermuteten erhöhten mRNA Expression erklärt werden.



**Diagramm 1 qRT-PCR Analyse von Agt-mRNA (Zonierung).** Kortex: WT (Wildtyp)= $5,18 \pm 1,9 \times 10^{-2}$  vs STZ= $6,82 \pm 1,9 \times 10^{-2}$  ( $p=0,56$ ), Mark: WT= $4,64 \pm 1,5 \times 10^{-2}$  vs STZ= $6,64 \pm 1,6 \times 10^{-2}$  ( $p=0,41$ ), Papille: WT= $2,85 \pm 1,4 \times 10^{-3}$  vs STZ= $5,36 \pm 2,1 \times 10^{-3}$  ( $p=0,43$ ).

### 4.2 ACE

Bei den ISH mit ACE und ACE2 wurde das RNAscope Assay DUPLEX verwendet, welches zwei Sonden in einem Schnitt detektiert. Diese wurden in rot und grün dargestellt. Die grüne Sonde detektierte die Expression von ACE, die rote Sonde die Expression von ACE2.

Das grüne ACE mRNA Signal konnte in beiden Gruppen sowohl im Kortex als auch im Mark detektiert werden. Beim Übergang zur Papille brach das ACE-detektierende Signal abrupt ab (Abbildung 5). In der diabetischen Niere zeigte sich ein vermindertes Signal bei gleichem Verteilungsmuster (Abbildung 5 unten). Das rote Signal der ACE2 mRNA ist auf Abbildung 5 aufgrund der geringeren Expression nicht erkennbar (siehe 4.3).

Im direkten Vergleich mittels ISH zeigte sich im Kortex der STZ-Tiere auch bei höherer Vergrößerung ein geringeres tubuläres Signal als in den Kontrolltieren (Abbildung 6 oben). Um die tubuläre Expression klar lokalisieren zu können, wurden der ISH IF-Färbungen mit den Antikörpern Megalin, Aquaporin2 und Calbindin angeschlossen. Um die Fluoreszenz-Aufnahmen in Abbildung 6 unten und Abbildung 7 durchführen zu können, wurden die histologischen Schnitte inklusive der ISH-Sonden mit einer Schwarz-Weiß-Kamera abgelichtet, sodass die Sonden auf den Bildern beide schwarz und somit nicht mehr differenzierbar sind. Zur vereinfachten Auswertung wurde aufgrund der geringen tubulären ACE2 Expression das gesamte tubuläre ISH-Signal als ACE mRNA interpretiert. Hier zeigte sich die meiste ACE Expression in den PT, was auch zu dem abrupt abbrechenden Verteilungsmuster der Übersichtsaufnahmen passt. Weder in den DT noch den SR war eindeutiges ISH-Signal zu finden (Abbildung 7). Auch das Interstitium zeigte keine klare Expression.

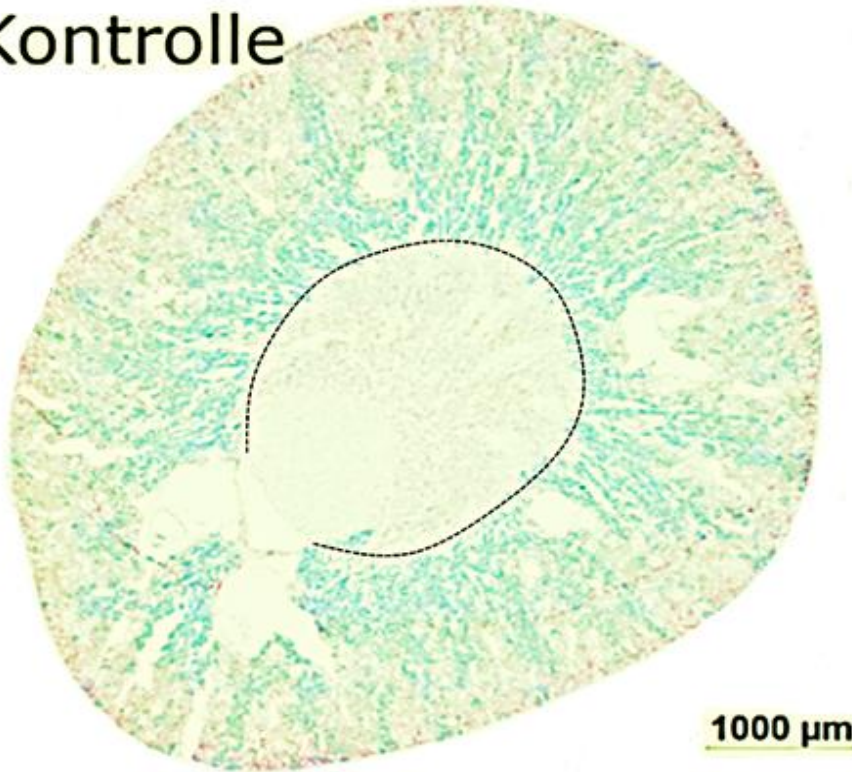
Gleichzeitig ergab sich der Eindruck, dass die glomeruläre Verteilung der ACE mRNA in den STZ-Tieren interessanterweise leicht anstieg (Abbildung 8A). Da hier die glomeruläre Expression von ACE mRNA in beiden Versuchsgruppen stark genug war, wurde mittels manueller Auszählung diese Impression verifiziert. Die Auszählung ergab einen signifikanten Anstieg des ACE mRNA Signals von  $22,7 \pm 4,0$  % positiven glomerulären Zellen in der Kontrollgruppe (n=89) auf  $41,2 \pm 1,7$  % bei den STZ-Tieren (n=119) (Abbildung 8B). Diese vermehrte ACE Expression zeigte sich auch in der RT-PCR Analyse mit mikrodisszezierten Nieren, hier waren die Werte jedoch statistisch nicht signifikant (Diagramm 3A. Glomeruli WT= $2,44 \pm 0,6 \times 10^{-3}$  vs STZ= $6,04 \pm 2,3 \times 10^{-3}$ ; p=0,18). Des Weiteren konnte in der Duplex-ISH bei einem Kontroll-Tier in einem

## Ergebnisse

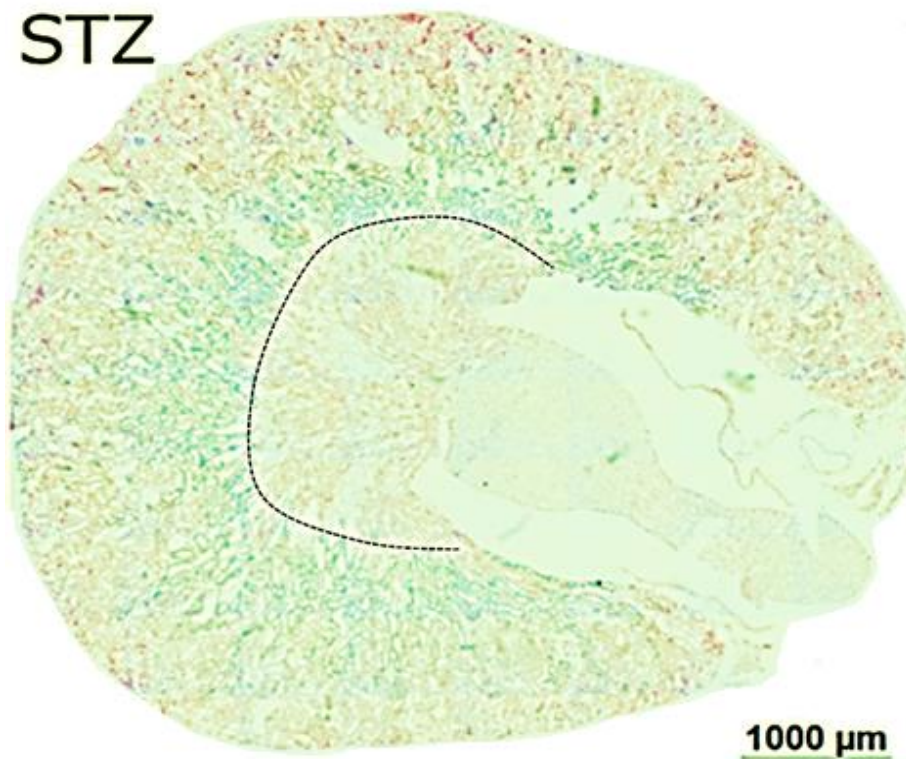
größeren Gefäß ACE mRNA gesichtet werden (Abbildung 9), während dies im STZ-Modell nicht der Fall war.



## Kontrolle

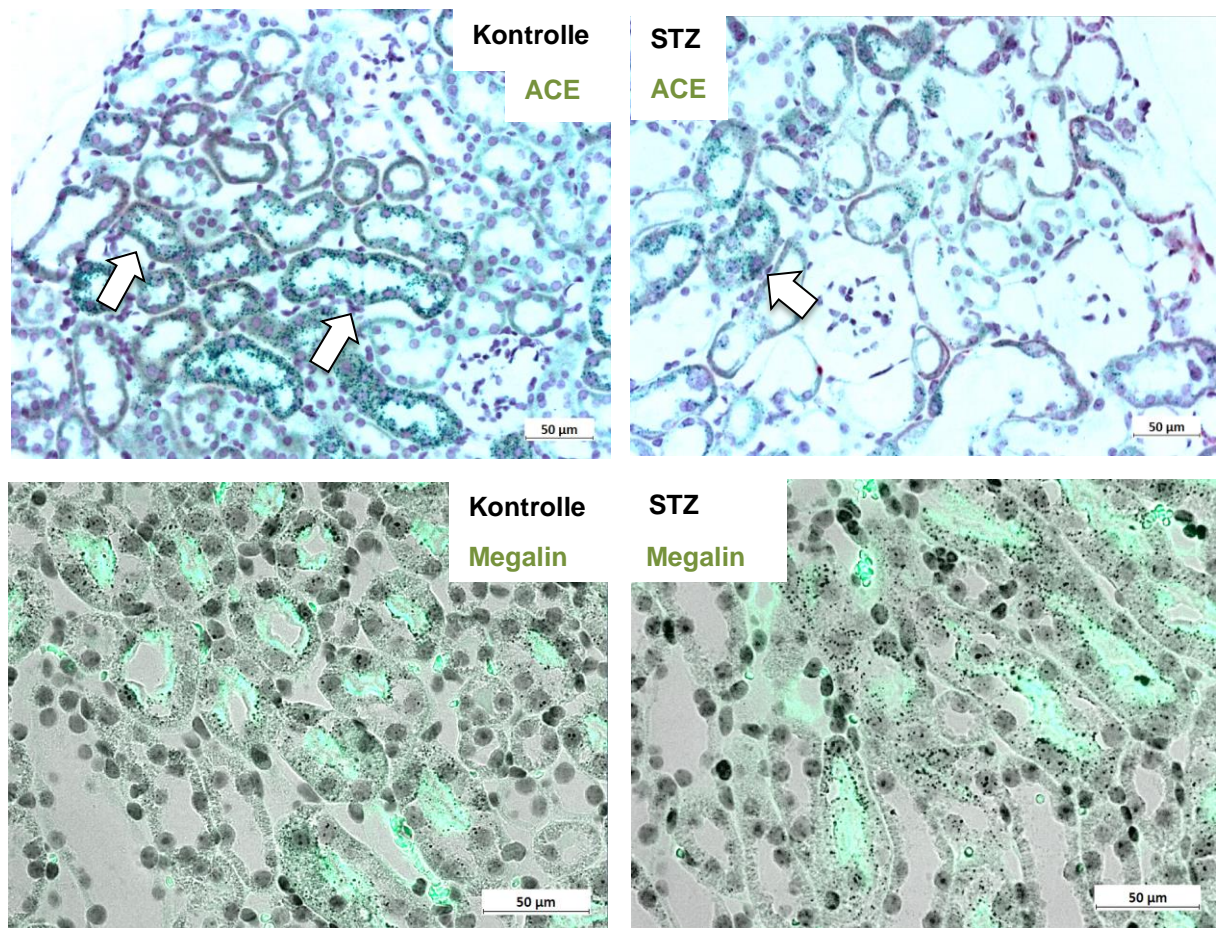


## STZ



**Abbildung 5. Übersichtsaufnahmen einer Diabetes- und einer Kontrollniere mit DUPLEX RNAScope Assay mit ACE (grün)- und ACE2 (rot)-Sonde (100x Vergrößerung).** Aufgrund der geringen Expression und Vergrößerung war in diesen Übersichtsaufnahmen fast nur die grüne ACE-Sonde zu sehen, welche in der STZ-Gruppe schwächer ausfiel und in beiden Gruppen abrupt abbrach (gestrichelte Linie).

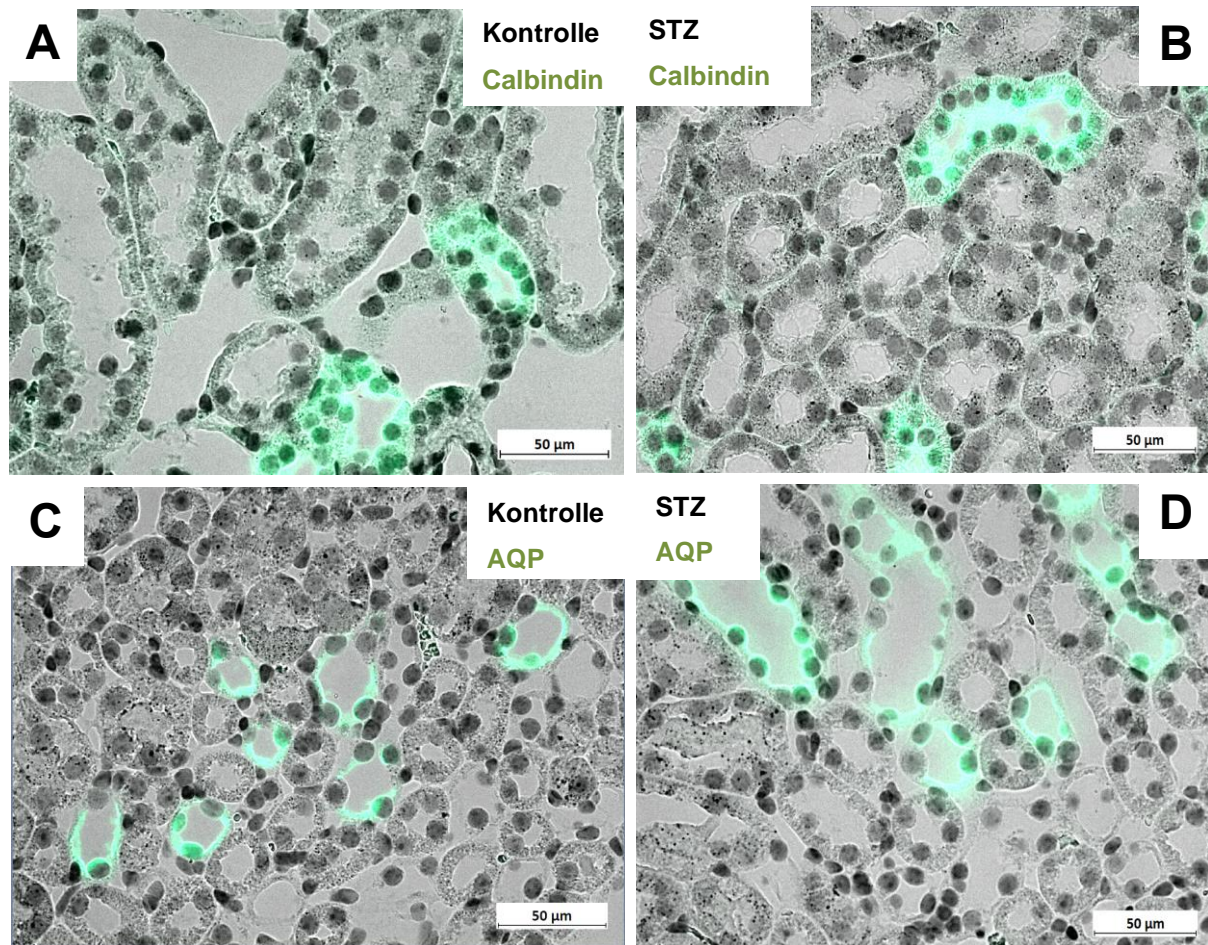
## Ergebnisse



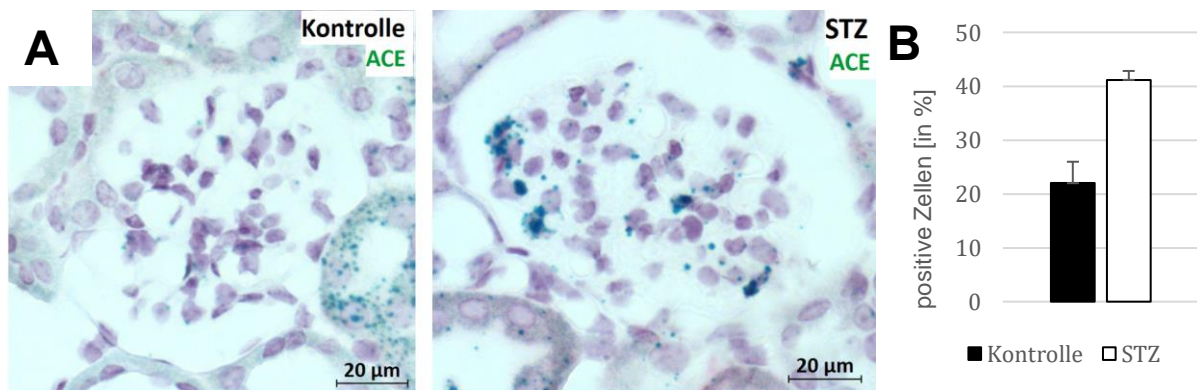
**Abbildung 6. DUPLEX RNAscope Assay mit ACE/ACE2, Cortex, mikroskopische Aufnahmen (200x Vergrößerung).** Im direkten Vergleich der ACE Expression in den PT (Pfeile) sieht man eine verminderte ACE-Expression in den STZ-Mäusen (oben). Bei der ISH und anschließender IF mit dem Antikörper Megalin zeigten sich die ACE-exprimierenden Tubuli positiv (unten).



## Ergebnisse

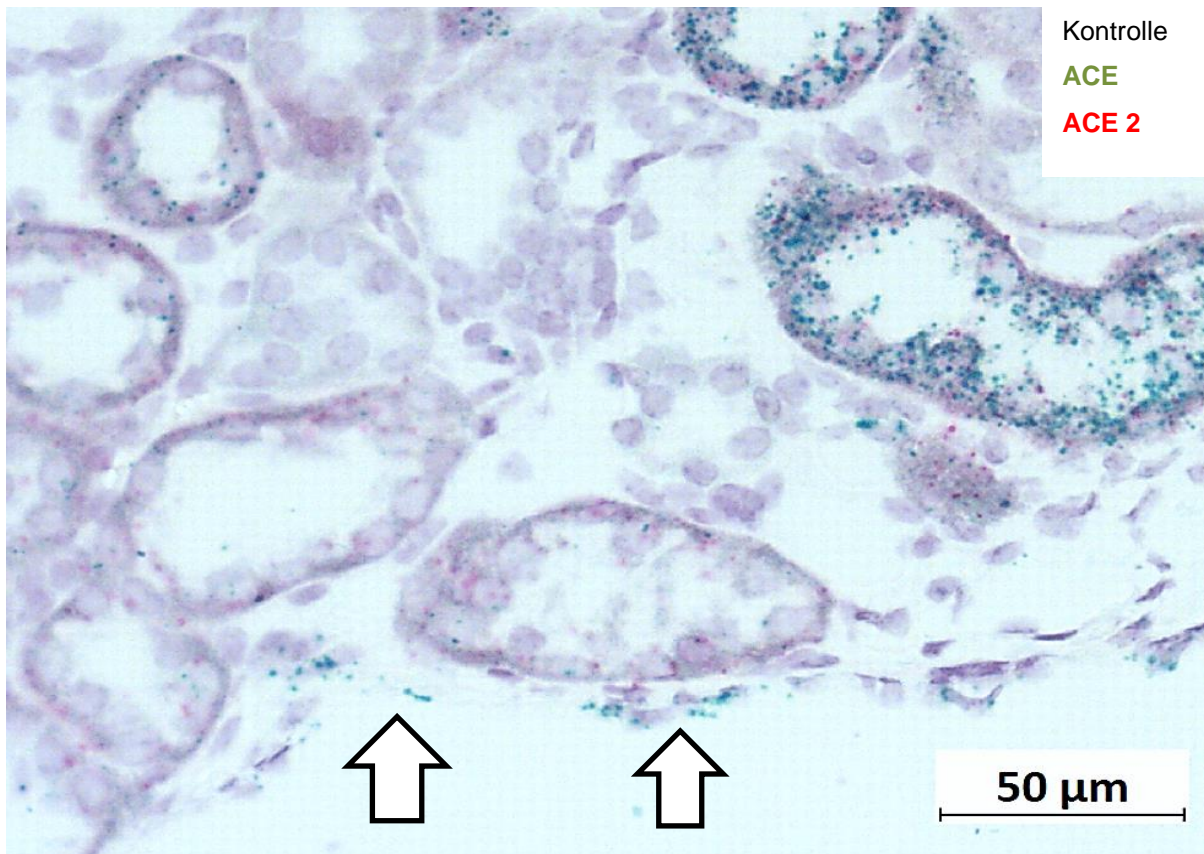


**Abbildung 7. DUPLEX RNAscope Assay mit ACE/ACE2 + IF mit Nephronsegment-spezifischem AK,** mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung). **A.+B.** Vergleich der ACE Expression in den distalen Tubuli (Calbindin). **C.+D.** Vergleich der ACE Expression in den Sammelrohren (AQP). Es zeigte sich in keiner Gruppe ISH-Signal in den DT oder SR.

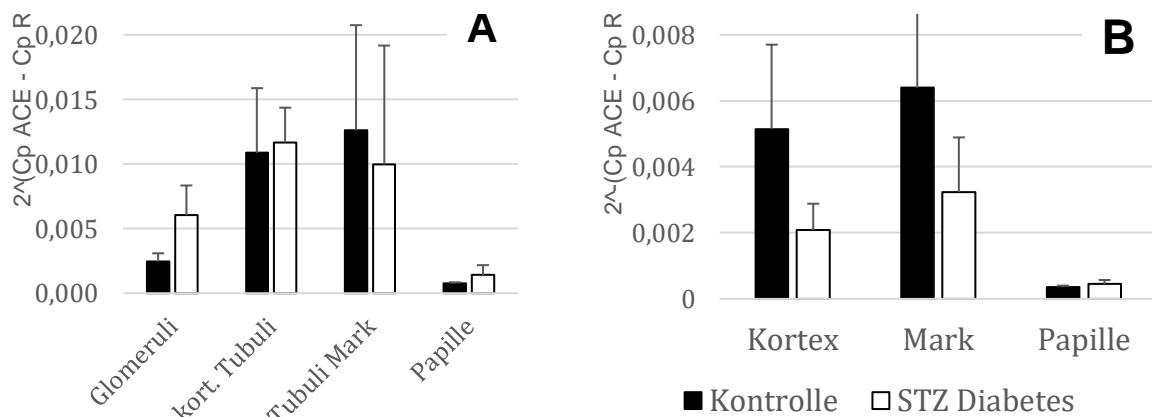


**Abbildung 8. Glomeruläre Expression von ACE-mRNA. A. DUPLEX RNAscope Assay** mit ACE- (grün) und ACE2-Sonde (rot, hier nicht zu sehen) in glomerulären Zellen der Kontroll- und STZ-Gruppe, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung). **B. Diagramm 2.** Darstellung im Box-Plot-Diagramm (K=22,7±4,0 %, n=89 vs STZ=41,2±1,7 %, n=119 ; p<0,01).

## Ergebnisse



**Abbildung 9. DUPLEX RNAscope Assay mit ACE (grün) und ACE2 (rot) im Kortex bei einer Kontroll-Maus,** mikroskopische Aufnahmen (200x Vergrößerung). Darstellung der Expression von ACE mRNA im Gefäß in der unteren Bildhälfte (Pfeile).



**Diagramm 3. qRT-PCR mit ACE mRNA. A. Mikrodissektion.** Glomeruli: WT= $2,44 \pm 0,6 \times 10^{-3}$  vs STZ= $6,04 \pm 2,3 \times 10^{-3}$  ( $p=0,18$ ); Kortikale Tubuli: WT= $1,09 \pm 0,5 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,17 \pm 0,3 \times 10^{-2}$  ( $p=0,88$ ); Tubuli Mark: WT= $1,26 \pm 0,8 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,0 \pm 0,9 \times 10^{-2}$  ( $p=0,86$ ); Papille: WT= $0,76 \pm 0,01 \times 10^{-3}$  vs STZ= $1,4 \pm 0,8 \times 10^{-3}$  ( $p=0,44$ ). **B. Zonierung.** Kortex: WT= $5,14 \pm 2,6 \times 10^{-3}$  vs STZ= $2,09 \pm 0,8 \times 10^{-3}$  ( $p=0,25$ ); Mark: WT= $6,39 \pm 2,7 \times 10^{-3}$  vs STZ= $3,23 \pm 1,7 \times 10^{-3}$  ( $p=0,33$ ); Papille: WT= $3,58 \pm 0,4 \times 10^{-4}$  vs STZ= $4,50 \pm 1,2 \times 10^{-4}$  ( $p=0,60$ ).

In der RT-PCR war die kortikale Expression unter chronischer Hyperglykämie wie in der ISH tendenziell - wenn auch nicht signifikant und mit großen Standardabweichungen - vermindert (Zonierete Nieren, Kortex: WT= $5,14 \pm 2,6 \times 10^{-3}$  vs STZ:  $2,09 \pm 0,8 \times 10^{-3}$ ,

## Ergebnisse

$p=0,25$ ). Es sollte bei den Messungen im Kortextgewebe der zonierten Nieren bedacht werden, dass neben den Glomeruli auch die Tubuli und interstitiellen Zellen mit gemessen wurden und sich diese Messungen somit nur bedingt für die Differenzierung zwischen Nephronsegmenten eignen. Da allerdings die PT absolut gesehen einen Großteil des kortikalen Gewebes ausmachen, könnte der Abfall der ACE-Expression bei den STZ-Tieren vorrangig durch die PT bedingt sein. In der Messung der Tubuli der mikrodisszierten Nieren wurden Werte mit einer sehr hohen Streuung gemessen (z. B. Kortikale Tubuli: WT= $1,09 \pm 0,5 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,17 \pm 0,3 \times 10^{-2}$ ,  $p=0,88$ ; Diagramm 3 A.), sodass hierzu keine validen Aussagen getroffen werden konnten. Deckungsgleich zur ISH waren auch in der Papille, wo die meisten SR lokalisiert sind, die Messungen mittels RT-PCR in beiden Gruppen auf einem sehr niedrigen Niveau gleich (Zonierte Nieren, Papille: WT= $3,58 \pm 0,4 \times 10^{-4}$  vs STZ= $4,50 \pm 1,2 \times 10^{-4}$ ,  $p=0,60$ , Diagramm 3 B.).

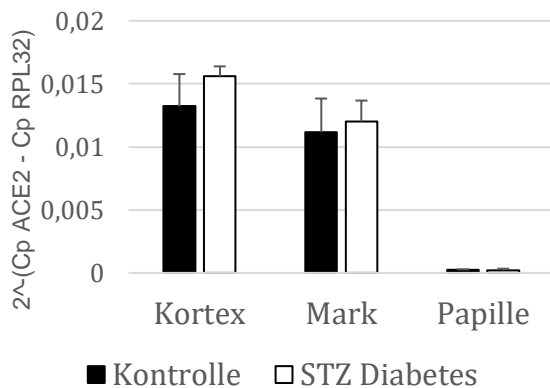
### 4.3 ACE 2

Die ACE2 ISH-Sonden zeigten durchgehend ein schwächeres Signal als die ACE ISH-Sonden. In den Glomeruli zeigte sich in der ISH keine ACE2 Expression (Abbildung 8). Aufgrund dessen wurde keine manuelle Auszählung angeschlossen. Auch in den Papillen beider Gruppen zeigte sich nur minimales ISH-Signal, welches sich nicht sicher von Artefakten abgrenzen ließ (nicht dargestellt). Aufgrund der ubiquitär geringen Expression von ACE2 wurde auf eine kombinierte ISH mit IF verzichtet, da sich hiervon keine weiteren Erkenntnisse versprochen wurden.

Auch die gemessenen Konzentrationen in der RT-PCR der zonierten Nieren waren gering. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen oder Trends zwischen den beiden Gruppen (Diagramm 4). In den mikrodisszierten Nieren waren die Messungen nicht valide, da wiederholte Messungen keinen Unterschied zwischen den Messungen der ACE2 mRNA und der Negativkontrolle mit Wasser detektieren konnten (nicht dargestellt). Die Konzentrationen waren hier also so gering, dass sie nicht messbar waren.



## Ergebnisse



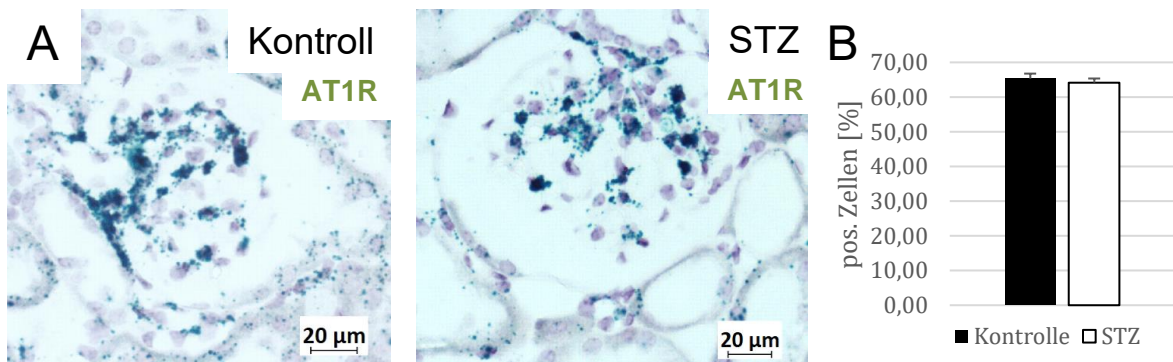
**Diagramm 4. RT-PCR von ACE2 mRNA.** In der Papille ließen sich nur sehr geringe Mengen nachweisen (Papille: WT= $2,37 \pm 1,0 \times 10^{-4}$  vs STZ= $2,12 \times 10^{-4}$ ;  $p=0,83$ ). In Kortex und Mark wurde in beiden Gruppen mehr Signal detektiert. In beiden Zonen war die Expression unter STZ gering erhöht: Kortex: WT= $1,32 \pm 0,6 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,56 \pm 0,4 \times 10^{-2}$  ( $p=0,73$ ); Mark: WT= $1,12 \pm 0,6 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,2 \pm 0,4 \times 10^{-2}$  ( $p=0,91$ ).

### 4.4 AT<sub>1</sub>-Rezeptor

AT<sub>1</sub>R mRNA konnte in beiden Gruppen größtenteils in den Glomeruli - hier bildmorphologisch vor allem in den Endothelzellen sowie intra- und extraglomerulären Mesangiumszellen (Abbildung 10) - und den proximalen Tubuli detektiert werden. Hierbei zeigte sich die Expression in den PT bei der Kontrollgruppe etwas stärker. Kleinere Mengen ließen sich zusätzlich in beiden Gruppen im Interstitium nachweisen (Abbildung 11), während in den Sammelrohren und distalen Tubuli keine AT<sub>1</sub>-R mRNA detektierbar war. Da die Lokalisation des ISH-Signals in der Kontroll- und in der STZ-Gruppe unverändert blieb und in der Kontrollgruppe etwas deutlicher ausfiel, wurde die IF zur Identifizierung der Nephronsegmente mit Kontrolltieren durchgeführt. Es bestätigte sich die positive Expression in den PT, während sich in DT und SR negativ zeigten (Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14).

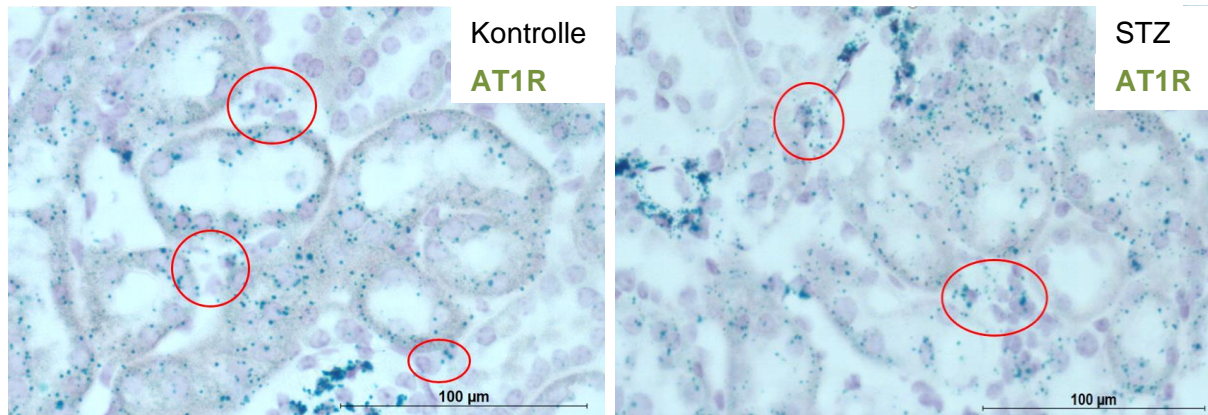
Bei den STZ-Tieren ließ sich in der RT-PCR Analyse ebenfalls eine nicht signifikante Verminderung der AT<sub>1</sub>-R Expression in den kortikalen Tubuli erkennen, wie es auch schon in den ISH-Aufnahmen angenommen worden war. Der Trend der geringeren Expression bei den STZ-Tieren ließ sich aufgrund der hohen Standardabweichungen bei insgesamt niedrigen Konzentrationen nicht statistisch beweisen, jedoch war in allen Kompartimenten der Trend einer verringerten Expression in den STZ-Mäusen zu messen (z.B. kortikale Tubuli: WT= $8,0 \pm 2,0 \times 10^{-3}$  vs STZ= $3,53 \pm 1,1 \times 10^{-3}$ ,  $p=0,09$ ). Die glomeruläre AT<sub>1</sub>-R Expression blieb in der RT-PCR gleichzeitig unverändert (Diagramm 6). Auch die manuelle Auszählung der Glomeruli, welche sich in der ISH positiv darstellten, ergab keine Veränderungen der Kontrollgruppe mit  $65,32 \pm 1,44$  % gegenüber den STZ-Tieren mit  $64,16 \pm 1,17$  % (Abbildung 10 B).

## Ergebnisse

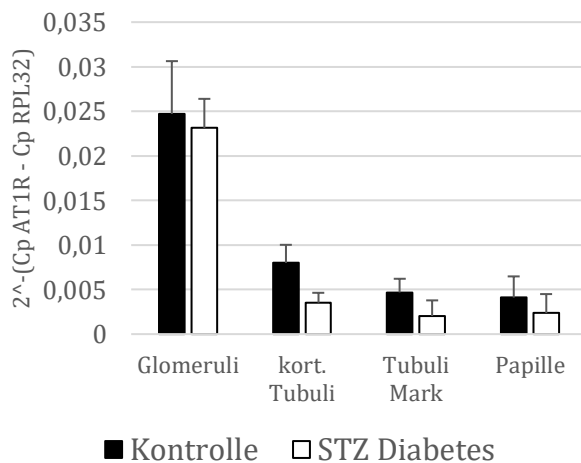


**Abbildung 10. Vergleich der kortikalen AT1-R-Expression eines Kontrolltiers mit einem STZ-Modell.**

DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R Sonde (grün) bei einem Kontroll- (links) und einem STZ-Tier (rechts), mikroskopische Aufnahmen (200x Vergrößerung). **B. Diagramm 5.** Darstellung der manuellen Auszählung von Glomeruli im Box-Plot Diagramm (K: 65,32±1,44%, n=90 vs STZ: 64,19±12,2%, n=118; p=0,54).



**Abbildung 11. DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R Sonde (grün) bei einem Kontroll- (links) und einem STZ-Tier (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung). Interstitielle AT1R mRNA Expression (rote Einkreisung).**



**Diagramm 6. RT-PCR von AT1-R mRNA bei mikrodissezierten Nieren.** Der Trend der geringeren Expression bei den STZ-Tieren ließ sich aufgrund der hohen Standardabweichungen bei insgesamt niedrigen Konzentrationen nicht statistisch beweisen, jedoch war in allen Kompartimenten eine verringerte Expression in den STZ-Mäusen zu sehen. Glomeruli: WT=2,47±0,6 × 10<sup>-2</sup> vs STZ=2,31±0,3 × 10<sup>-2</sup> (p=0,82); Kortikale Tubuli: WT=8,0±2,0 × 10<sup>-3</sup> vs STZ=3,53±1,1 × 10<sup>-3</sup> (p=0,09); Tubuli Mark: WT=4,68±1,5 × 10<sup>-3</sup> vs STZ=2,03±1,8 × 10<sup>-3</sup> (p=0,36); Papille: WT=4,1±2,4 × 10<sup>-3</sup> vs STZ=2,37±2,1 × 10<sup>-3</sup> (p=0,60).

## Ergebnisse

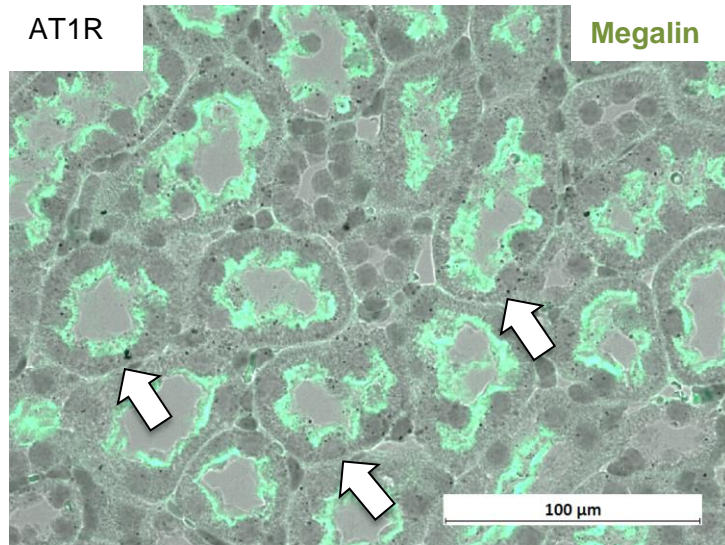


Abbildung 14. DUPLEX RNAScope Assay mit AT<sub>1</sub>-R (Pfeile) mit Megalin-IF in grün bei einem Kontrolltier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

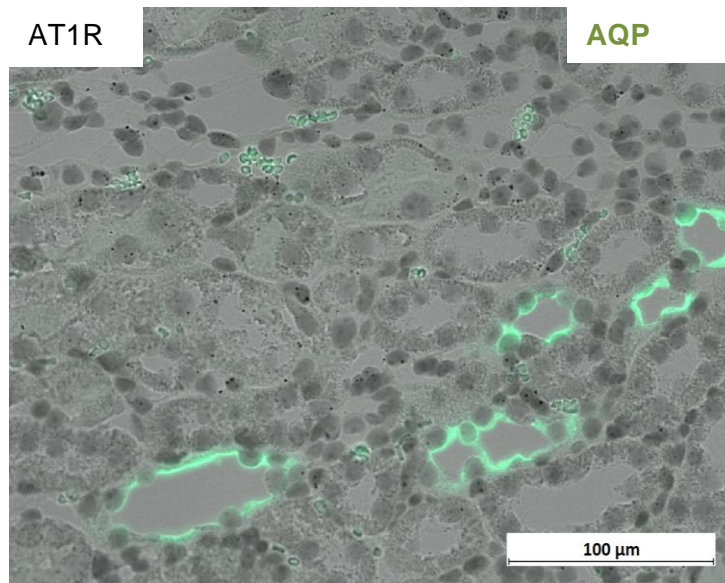


Abbildung 13. DUPLEX RNAScope Assay mit AT<sub>1</sub>-R mit Aquaporin-IF in grün bei einem Kontrolltier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

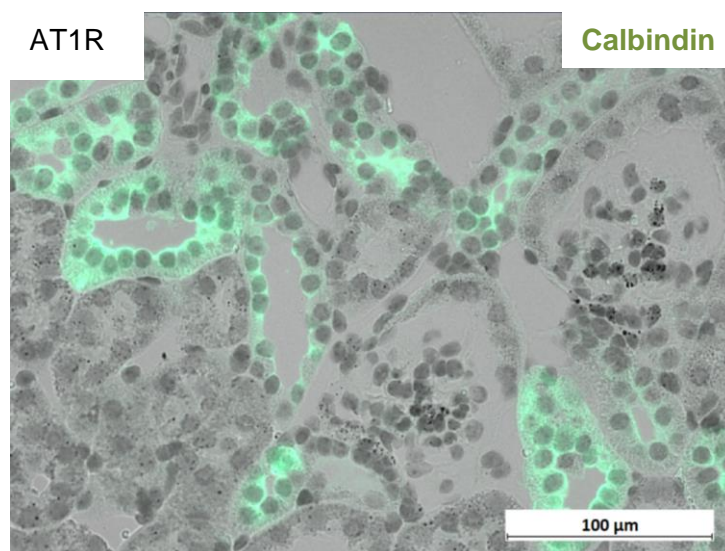


Abbildung 12. DUPLEX RNAScope Assay mit AT<sub>1</sub>-R mit Calbindin-IF in grün bei einem Kontrolltier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

### 4.5 AT<sub>2</sub>-Rezeptor

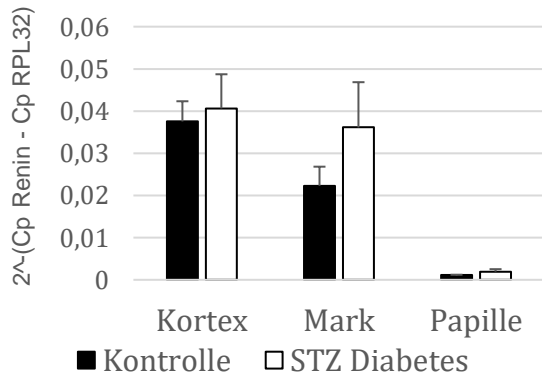
Weder in der ISH noch in der RT-PCR konnte eindeutige Expression von AT<sub>2</sub>-R mRNA in der Niere nachgewiesen werden. Die Schnitte der ISH zeigten in keinem der Nierensegmente - unabhängig von Kontroll- oder STZ-Gruppe - eindeutiges Signal, welches sich von Artefakten abgrenzen ließ. Zusätzlich zeigte sich in parallel durchgeführten Versuchen auch kein Signal in einer Positivkontrolle mit Kleinhirngewebe aus Mäuseembryonen. Die per RT-PCR Analyse ermittelten Konzentrationen in den einzelnen Nierenabschnitten unterschieden sich nicht von denen der mit Wasser durchgeführten Negativkontrolle, waren also sehr gering.

### 4.6 Renin

Wie es physiologisch zu erwarten war, zeigten die Mäuse der Kontrollgruppe das meiste ISH-Signal in den JGZ. Daneben stellten sich jedoch auch einzelne interstitielle Zellen als positiv dar. Bei den STZ-Tieren konnte sowohl im Bereich der JGZ des Vas afferens als auch in interstitiellen Zellen ein deutlich stärkeres Signal nachgewiesen werden. Bereits in den Übersichtsaufnahmen der Nieren ließ sich der Anstieg der Renin mRNA im JGA erkennen. Bei höherer Vergrößerung zeigte sich zusätzlich die deutlich höhere Expression in der Medulla (Abbildung 15). Da in den Glomeruli kein signifikantes Renin-Signal zur Darstellung kam, wurde auf eine Auszählung verzichtet. Die Beobachtungen der ISH waren mit den Messungen in der RT-PCR des zonierten Nierengewebes kongruent. So zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Renin mRNA in der Medulla (WT=2,23 ±0,45 x10<sup>-2</sup> vs STZ=3,6±1,07 x10<sup>-2</sup>, p=0,32, Diagramm 7). Dieser Anstieg kann auf den Anstieg in den Interstitiumszellen zurückgeführt werden, da die interstitiellen Zellen mit etwa 40 % einen Großteil der Medulla ausmachen. Der leichte Anstieg der Renin mRNA im Kortex könnte wiederum auf die vermehrte Expression in den JGZ hinweisen. Die Änderung fiel hier im Vergleich mit der Medulla geringer aus (WT=3,75±0,48 x10<sup>-2</sup> vs STZ=4,06±0,8 x10<sup>-2</sup>, p=0,77, Diagramm 7). Es sollte jedoch bedacht werden, dass im Kortex auch viele PT, DT und Glomeruli in der Messung der zonierten Nieren miterfasst und gemessen wurden, welche in den Messungen keine sichere Expression zeigten.

## Ergebnisse

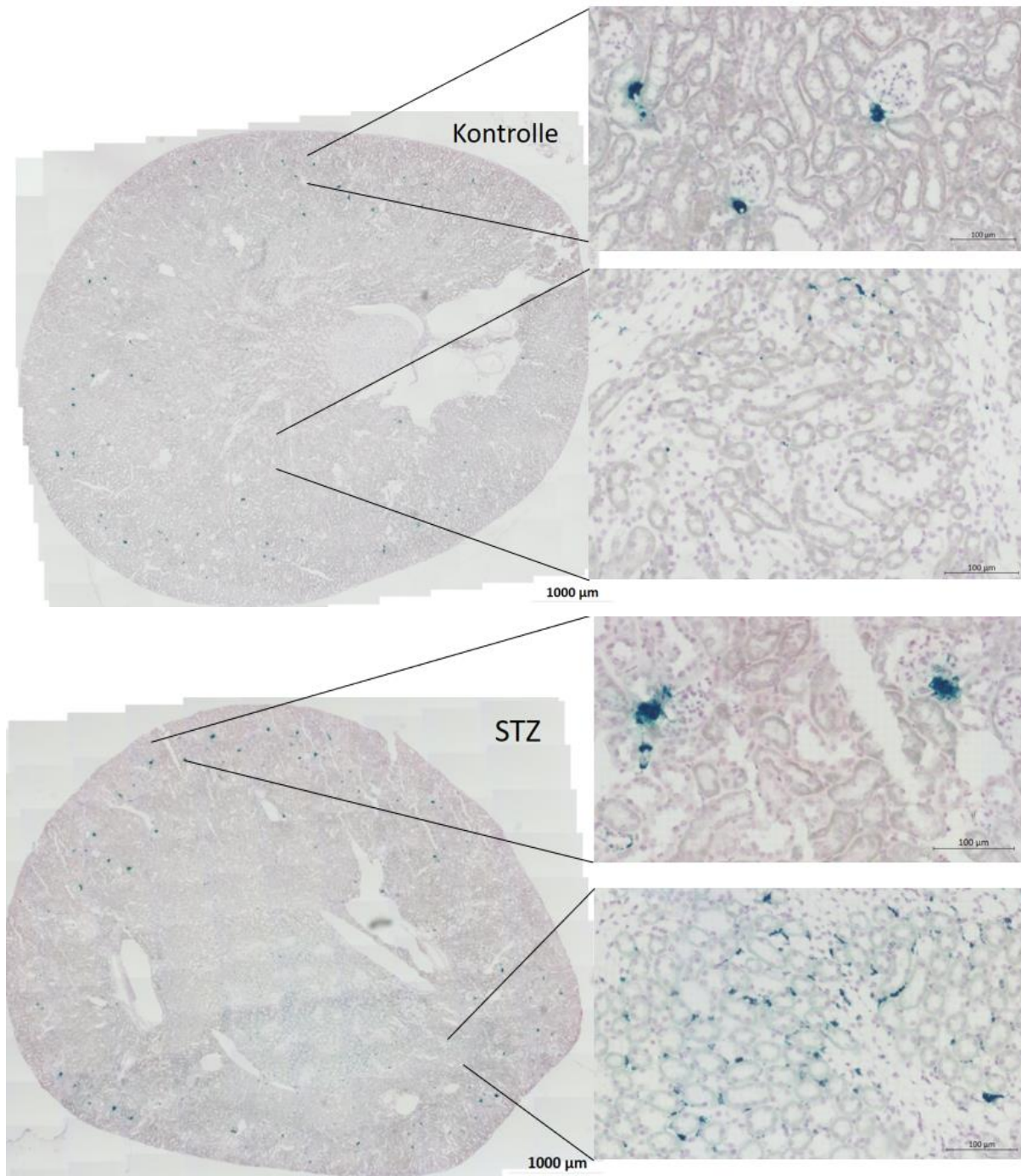
Des Weiteren konnte in Gefäßen von STZ-Tieren Renin mRNA detektiert werden (Abbildung 16), während sich Signal in Gefäßen der Kontrollgruppe nicht sicher von Artefakten abgrenzen ließ (nicht dargestellt).



**Diagramm 7. qRT-PCR von Renin mRNA** aus zonierten Nieren. Kortex:  $K=3,75 \pm 0,48 \times 10^{-2}$  vs  $STZ=4,06 \pm 0,8 \times 10^{-2}$  ( $p=0,77$ ); Mark:  $K=2,23 \pm 0,45 \times 10^{-2}$  vs  $STZ=3,6 \pm 1,07 \times 10^{-2}$  ( $p=0,32$ ); Papille:  $K=1,1 \pm 0,0001 \times 10^{-3}$  vs  $STZ=2,0 \pm 0,6 \times 10^{-2}$  ( $p=0,32$ )

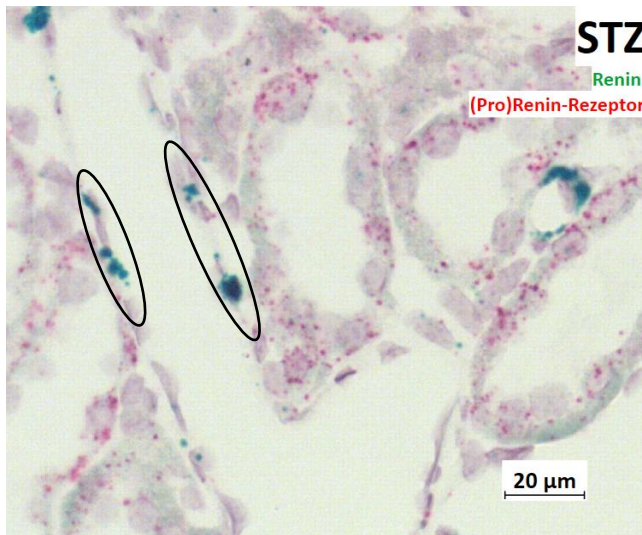


## Ergebnisse



**Abbildung 15. Renale Renin-Expression in Kontrollgruppe (oben) und STZ-Gruppe (unten).** DUPLEX RNAScope Assay mit Renin (grün) und PRR (rot, in der Darstellung nicht zu sehen), mikroskopische Aufnahmen: Übersicht (links, 100x Vergrößerung), Kortex (rechts oben, 200x Vergrößerung) und Mark (rechts unten, 200x Vergrößerung).

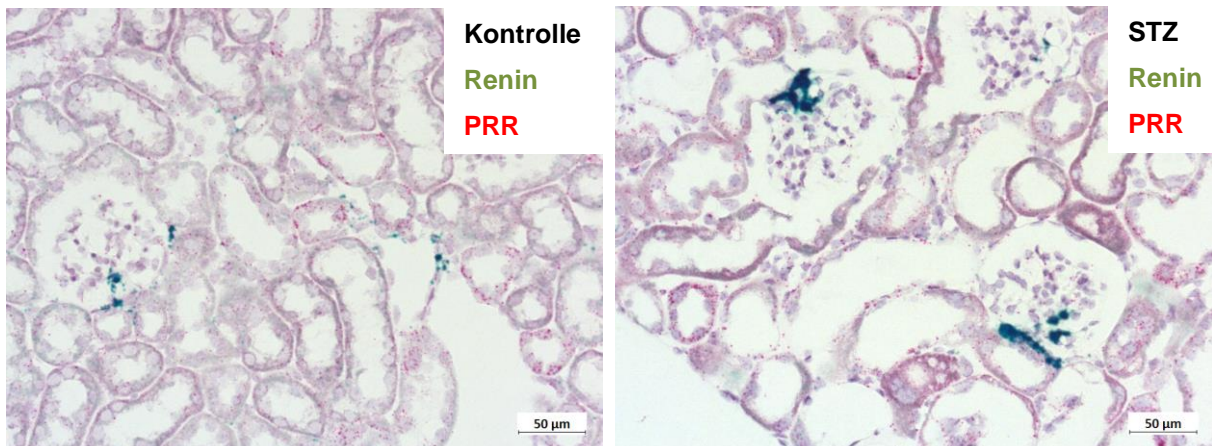
## Ergebnisse



**Abbildung 16. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin und PRR bei einem STZ-Tier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).** Im Endothel fanden sich sowohl Renin- als auch PRR-exprimierende Zellen (exemplarische Einkreisung).

### 4.7 (Pro)Renin Rezeptor

Das mRNA-Signal des PRR fand sich in der ISH ubiquitär in den Nieren beider untersuchter Gruppen. Im Kortex wurde vor allem in den Glomeruli und kortikalen Tubuli ein fein verteiltes Signal detektiert (Abbildung 17).

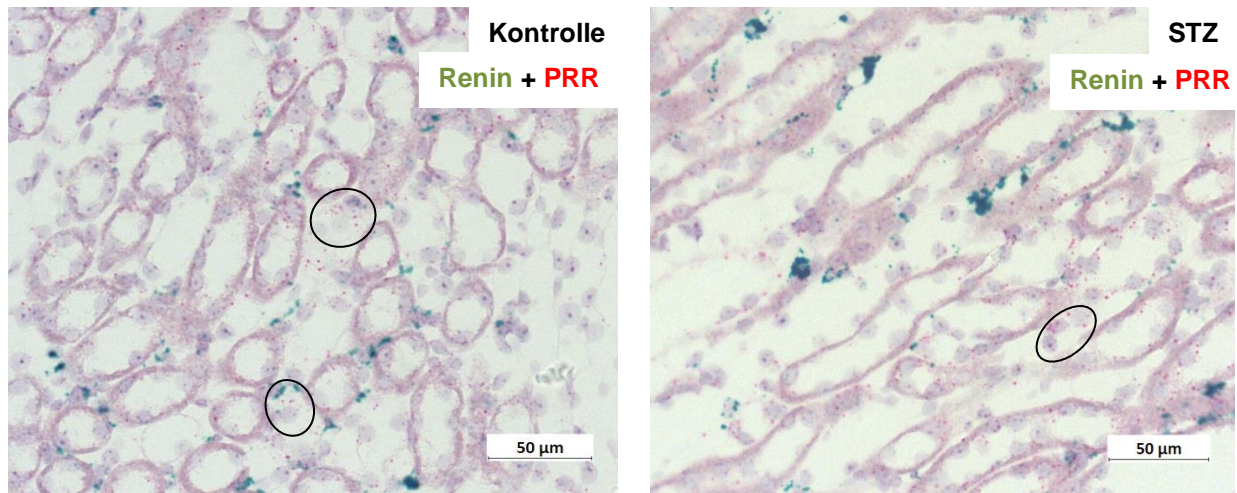


**Abbildung 17. Kortikale Expression von PRR mRNA. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin- und PRR-Sonde im Kortex eines Kontroll- (links) und eines STZ-Tiers (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).**

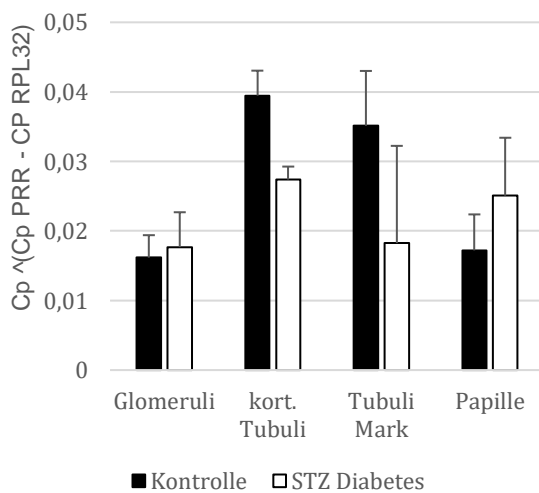
In den mikroskopischen Aufnahmen der Medulla konnte zudem in beiden Gruppen eine Expression im Interstitium festgestellt werden (Abbildung 18) während das Signal innerhalb der Gefäße nicht eindeutig war (nicht dargestellt). Es bestanden in der ISH keine visuellen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Eine manuelle Auszählung bei ähnlichen, eher geringem Verteilungsmuster der renalen PRR mRNA Expression wurde nicht durchgeführt, da sich hiervon kein vermehrter Erkenntnisgewinn versprochen wurde. Auch in den RT-PCR Analysen ließen sich

## Ergebnisse

aufgrund hoher Varianz der Konzentrationen innerhalb der Gruppen keine eindeutigen Unterschiede zwischen WT- und STZ-Gruppe in den Nierensegmenten nachweisen (Diagramm 8).



**Abbildung 18. Medulläre Expression von PRR-mRNA. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin (grün)- und PRR (rot) -Sonde im Kortex eines Kontroll- (links) und eines STZ-Tiers (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung). Es fanden sich neben PRR-exprimierenden Tubuli-Zellen auch interstitielle Zellen, welche durch die PRR-Sonde markiert wurden (exemplarische Einkreisung).**



**Diagramm 8. RT-PCR von PRR-mRNA** aus mikrodissezierten Nieren. Aufgrund der partiell sehr hohen Standardfehler ließen sich keine eindeutigen Veränderungen zwischen Kontroll- und STZ-Mäusen beobachten. Glomeruli: WT= $1,62 \pm 0,32 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,77 \pm 0,50 \times 10^{-2}$  ( $p=0,81$ ); Kortex: WT= $3,95 \pm 0,36 \times 10^{-2}$  vs STZ= $2,74 \pm 0,19 \times 10^{-2}$  ( $p=0,02$ ); Mark: WT= $3,51 \pm 0,79 \times 10^{-2}$  vs STZ= $1,83 \pm 1,40 \times 10^{-2}$  ( $p=0,33$ ); Papille: WT= $1,72 \pm 0,52 \times 10^{-2}$  vs STZ= $2,51 \pm 0,83 \times 10^{-2}$  ( $p=0,45$ ).



## 5 Diskussion

### 5.1 Versuchsaufbau und STZ-Modell

Ziel dieser Arbeit war es die Expression ausgewählter Komponenten des RAS in den unterschiedlichen Zelltypen der Niere beziehungsweise den Nephronsegmenten systematisch zu lokalisieren und zu quantifizieren. Es wurden Änderungen im STZ-Modell untersucht, um so Rückschlüsse auf Pathologien des RAS in einer aufgrund von chronischer Hyperglykämie erkrankten Niere ziehen zu können.

Hierfür wurde das STZ-Mausmodell mit normoglykämischen WT-Mäusen verglichen. Da STZ die pankreatischen beta-Zellen destruiert und somit zu einem absoluten Insulinmangel führt, bildet es vor allem die Situation eines Typ1 Diabetes ab (29). Dennoch weisen auch Typ2-Diabetiker Parallelen mit dem STZ-Modell auf. So leiden beide Gruppen unter chronischer Hyperglykämie und haben ein deutlich erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer DN (82). Auch wenn die DN einer multifaktoriellen Pathogenese unterliegt, korreliert sie vorrangig mit einer chronischen Hyperglykämie, die in dieser Arbeit simuliert wurde. Spezifische Unterschiede zwischen DM Typ1 und Typ2 fanden aus Praktikabilitätsgründen keine gesonderte Berücksichtigung.

Zudem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das STZ-Modell zum Schweregrad der Hyperglykämie, Albuminurie und den histologischen Charakteristika einer DN gut korreliert. Es ist also eine gute Methode, um die DN adäquat abbilden zu können (59). Somit war das STZ-Mausmodell eine valide und etablierte Methode für die Fragestellung dieser Arbeit. Dennoch dürfen Beobachtungen an Versuchstieren selbstverständlich nicht direkt auf den Menschen übertragen werden, da es sich um Spezies unterschiedlicher Ordnungen handelt. Nakatani et al. konnten jedoch auch in Menschen mit DM Typ 2 mit und ohne DN in klinischen Studien eine erhöhte Aktivität des intrarenalen RAS beobachten (55), wie wir es auch im Mausmodell sehen. Es können also durchaus Tierversuche bei der bestehenden Fragestellung zu einem basalen Verständnis beitragen.

Viele Patienten mit einer DM Typ2 Erkrankung sind komorbide, was eine weitere Divergenz zu dem Versuchsaufbau dieser Arbeit ist. Laut einer retrospektiven Studie, die 2016 von Iglay, Hannachi et al. veröffentlicht wurde, litten 97,5 % der diabetischen Probanden mindestens an einer und 88,5 % mindestens an zwei Komorbiditäten. Hierbei waren die häufigsten Entitäten Bluthochdruck, Adipositas, Hyperlipidämie,

chronische Nierenerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen (36). Es stellt in multimorbiden Patientenkohorten eine große Schwierigkeit dar, die einzelnen Krankheiten getrennt voneinander zu betrachten, da diese auf größtenteils unbekannt Weise miteinander interagieren (46).

Dieser Aspekt wurde bewusst nicht in den Aufbau dieser Arbeit aufgenommen. Um die komplexen Interaktionen einer multifaktoriellen Erkrankung wie des DM aufklären zu können, bedarf es zunächst der Grundlagenforschung, die die Faktoren - wie beispielsweise die Hyperglykämie - isoliert betrachtet. Genau dies ist in dieser Arbeit geschehen. Sie untersuchte die DN getrennt von anderen Krankheiten und hatte zum Ziel, die komplexe Pathogenese unter dem Aspekt des intrarenalen RAS bei chronischer Hyperglykämie genauer zu untersuchen. In weiteren Schritten sollten die einzelnen Mechanismen, die in diesem und ähnlichen Forschungsansätzen aufgedeckt wurden und werden, genutzt werden, um entitätsübergreifende Zusammenhänge besser verstehen zu können.

### **5.2 Angiotensinogen**

Agt wurde vor allem in den proximalen Tubuli mit einem Anstieg im STZ-Modell detektiert und bekräftigt damit die Ergebnisse einer früheren Arbeit bei Ratten im STZ-Modell (48). In einer anderen Studie konnten bei transgenen Mäusen, die Angiotensinogen isoliert in proximalen Tubuli überexprimierten, Hinweise dafür gefunden werden, dass intrarenal gebildetes Agt auch ohne Aktivierung des systemischen RAS die Niere schädigt (72). Dies legt einen direkten Zusammenhang des intrarenalen RAS mit der DN beziehungsweise chronischer Nierenschädigung nahe.

Eine erhöhte Agt-Exkretion über den Urin konnte im Zusammenhang sowohl mit Bluthochdruck als auch DM Typ 1 und 2 beim Menschen nachgewiesen werden (74). Die ausgeschiedene Menge an Agt verhielt sich dabei direkt proportional zu dem Schweregrad der Nierenschädigung (70). Es wurde basierend auf dieser Erkenntnis bereits ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt, um die renale Agt-Exkretion bei Patienten messen zu können, sodass nicht-invasiv Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand der Nieren geschlossen werden können. Die Agt-Exkretion ist somit ein effektiver Biomarker, um ein aktiviertes intrarenales RAS frühzeitig, kostengünstig und risikoarm zu erfassen (42).

Aktuell ist im klinischen Alltag die Albuminurie der Parameter für das Monitoring der DN (7). Jedoch wurde inzwischen belegt, dass das Vorliegen eines aktivierten intrarenalen RAS die Entwicklung einer DN frühzeitig detektieren kann (70). Da eine frühzeitige pharmakologische Intervention mit RAS-Hemmern sowohl einfach umsetzbar ist, als auch das klinische Outcome signifikant verbessert (89), sollte erwogen werden die Messung der renalen Agt-Exkretion mittels ELISA im klinischen Alltag zu etablieren.

Des Weiteren zeigten sich im STZ-Modell fokal Agt mRNA exprimierende Zellen, die standardmorphologisch am ehesten dem Intermediärtubulus entsprechen. Dieselben Strukturen waren in der Kontrollgruppe durchgängig negativ. Satou et al. beschrieben, dass sich in diabetischen Tieren die Agt Synthese vom PT weiter bis auf die DT ausweiten kann (74). Somit erscheint das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass lediglich im STZ-Modell Agt mRNA im mutmaßlichen Intermediärtubulus detektiert wurde, plausibel, da der Intermediärtubulus den proximalen mit dem distalen Tubulus verbindet (74). Es lässt zu dem die Hypothese zu, dass mit länger bestehender Hyperglykämie auch in dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit die Agt mRNA Synthese bis in den distalen Tubulus weiter fortgeschritten wäre.

### **5.3 ACE und ACE2**

In dieser Arbeit konnte ACE mRNA in den Glomeruli und PT beider Gruppen sowie in Gefäßen eines Kontrolltiers nachgewiesen werden. Die Papille zeigte keine ACE Expression. Diese Ergebnisse sind passend zu vorangegangenen Studien (26; 53). Des Weiteren fand sich vergleichend eine durchgehend geringere Expression von ACE2. In den Glomeruli und der Papille konnte in beiden Versuchsgruppen keinerlei ACE2 Signal detektiert werden. In einer Studie aus dem Jahr 2013 konnte bei diabetischen Mäusen mittels immunhistochemischer Färbung weniger glomeruläres ACE2 bei simultan erhöhter tubulärer ACE2 Expression festgestellt werden (79). Dies konnte in dieser Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden, da die ACE2 Expression zu niedrig war.

Gemeinsam weisen alle diese Beobachtungen auf eine Dysbalance zwischen der ACE-Ang(1-7)-AT<sub>1</sub>-R- und ACE2/Ang(1-9)/AT<sub>2</sub>-R-Achse hin. Dieses Ungleichgewicht würde wiederum zu proinflammatorischen und -fibrotischen Effekten führen (2), wie sie bei der DN dominieren. Die Hypothese einer Imbalance der ACE/ACE2-Ratio bei

## Diskussion

Patienten mit einer DN wurde bereits 2008 von Mizuiri et al. postuliert (52). ACE-Inhibitoren (ACE-I) können diese Imbalance teilweise ausgleichen, da diese nur ACE hemmen, mit ACE2 jedoch nicht interagieren (30). Da ACE-I bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz aufgrund der Gefahr einer Hyperkaliämie nur zurückhaltend eingesetzt werden, sollte eine frühzeitige Medikation bei Diabetikern individuell erwogen werden, da zu diesem Zeitpunkt das Risiko einer Hyperkaliämie signifikant geringer ausfällt, da die Nierenfunktion noch nicht zu stark eingeschränkt ist. Der Progress der Erkrankung kann damit gehemmt werden (26). Klinische Studien zeigten, dass eine frühe Intervention mit ACE-I für ein besseres Outcome bei Diabetikern, welche ein erhöhtes Risikoprofil hinsichtlich einer renalen Schädigung aufweisen, sorgen kann (3; 65). Dieses erhöhte Risiko könnte beispielsweise mittels Messung renaler Agt-Exkretion, wie unter 5.2 erläutert, frühzeitiger erfasst werden.

Des Weiteren zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die ACE mRNA Expression bei STZ-Tieren in den Glomeruli erhöht und im tubulären System erniedrigt. Ähnliches konnten Anderson et al. in moderat hyperglykämischen, diabetischen Ratten zeigen: während sich die tubuläre ACE Expression verringerte, intensivierte sich die immunhistochemische Färbung in den Glomeruli und Gefäßen (4). Ähnliche Änderungen konnten in Zellkulturen mit chronischer Hyperglykämie in Zusammenhang gebracht werden. Während mesangiale Zellen in einer 30mM Glukoselösung erhöhte ACE mRNA Level aufwiesen, war die ACE-Aktivität in SR-Zellen in einem hyperglykämischen Milieu erniedrigt (45). Verschiedene Studien legten nahe, dass das renale ACE sowohl bei der Entstehung von der DN als auch bei Hypertension und anderen Nierenschädigungen eine Schlüsselrolle einnimmt (26). Fuchs et al. entdeckten beispielsweise, dass ACE neben der weithin bekannten Funktion AngI in AngII zu spalten, auch Affinität zu einem weiteren Substrat besitzt: N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin (Ac-SDKP). Dieses wird durch ACE in inaktive Fragmente zerlegt. Ac-SDKP schützt über verschiedene molekulare Mechanismen die Niere vor Fibrose bei renaler Schädigung (23). Der Anstieg von Ac-SDKP in Plasma und Urin bei einer Behandlung mit ACE-Inhibitoren könnte unter anderem die nephroprotektive Wirkung dieses Pharmakons erklären (90). Das Fehlen von ACE2 in den Glomeruli, wie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, und die weiter oben erläuterte Beobachtung von erniedrigten glomerulären bei erhöhten tubulären ACE2 Konzentration in diabetischen Mäusenieren (79) könnte die akzentuiert glomeruläre Schädigung der DN mit erklären. In einer anderen Studie wurde die alterierte ACE/ACE2-Ratio bei

Diabetikern noch deutlicher: hier verringerte sich die IHC-Färbung für ACE2 in den Glomeruli und im Tubulointerstitium, während die Färbeintensität für ACE zunahm (52).

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die DN und hier im Speziellen die glomeruläre Schädigung durch eine alterierte ACE/ACE2-Ratio begünstigt wird. Diese Hypothese könnte wünschenswerterweise durch weiterführende Studien geprüft werden und weiter in einen klinischen Kontext gesetzt werden.

### **5.4 AT<sub>1</sub>-Rezeptor**

AT<sub>1</sub>-R mRNA konnte in Glomeruli, Interstitiumszellen und in proximalen Tubuli nachgewiesen werden. In einer vergleichenden Studie mit der RNAscope Technik fanden sich ähnliche AT<sub>1</sub>-R mRNA Expressionsmuster in den Glomeruli und im Interstitium bei Nieren von Mäusen, Ratten und Menschen (75). Interessanterweise wurde in menschlichen Nieren jedoch keine mRNA in proximalen Tubuli nachgewiesen (75). Diese Beobachtung verdeutlicht erneut die bereits erläuterte Schwierigkeit von Untersuchungen bei Tieren direkt auf den Menschen schließen zu können.

Bei STZ-Tieren ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine Verminderung in den proximalen Tubuli, aber keine Veränderungen in den Glomeruli erkennen. Auch in einer Zellkulturstudie konnte ein Rückgang der AT<sub>1</sub>-R mRNA Expression in glomerulären endothelialen Zellen in hyperglykämischem Milieu vermerkt werden (66). In Untersuchungen von Nierenstanzen von acht Patienten mit diabetischer Nephropathie waren die AT<sub>1</sub>-R mRNA Konzentrationen ebenfalls deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Es wurden in dieser Studie auch Proben von Menschen mit anderen chronischen Nierenerkrankungen untersucht, welche ebenfalls eine signifikant niedrigere AT<sub>1</sub>-R Genexpression aufwiesen. Daraus wurde geschlossen, dass ein Zusammenhang zwischen der erniedrigten renalen AT<sub>1</sub>-R mRNA Expression und chronischen Nierenerkrankungen im Allgemeinen bestehen könnte (85).

AngII wirkt über den AT<sub>1</sub>-R proliferativ auf das Tubulointerstitium und die Glomeruli, sodass vor allem in diesen Bereichen eine Fibrose entsteht. Des Weiteren wirkt AngII in der efferenten Arteriole vasokonstriktorisch (12; 87). Diese Effekte schädigen die Niere bei einer chronischen Nierenerkrankung. Es könnte somit sein, dass die



beobachtete Herunterregulierung von AT<sub>1</sub>-R mRNA eine Art "Schutzmechanismus" des Körpers darstellt, um die Auswirkungen unangemessen hoher AngII-Level, die durch ein aktiviertes RAS entstehen, abzumildern. Die Therapie mit ARBs wie Losartan kann die Nierenfunktion von Patienten mit DM Typ 2 signifikant verbessern kann (11). Diese zusätzliche medikamentöse AT<sub>1</sub>-R-Blockade, wie sie bereits zur Standardtherapie der DN gehört, könnte diesen postulierten "Schutzmechanismus" zusätzlich unterstützen.

### **5.5 AT<sub>2</sub>-Rezeptor**

Vorangegangene Studien beschrieben einen Rückgang der AT<sub>2</sub>-R Expression bei an DM erkrankten Ratten (9; 78; 86). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht repliziert werden, da in mehreren Versuchsansätzen keine AT<sub>2</sub>-R mRNA gemessen werden konnte (vgl. 4.5).

Als mögliche Fehlerquelle für die nicht zu messende AT<sub>2</sub>-R mRNA wäre es möglich, dass die verwendeten Schnitte zu lange lagerten bis sie untersucht wurden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die FFPE-Gewebeproben etwa 3 Jahre alt. Laut Hersteller der ISH-Sonden (ACD) ist es möglich Proben zu verwenden, die über 25 Jahre alt sind. Es sollte jedoch bedacht werden, dass eine ohnehin schon geringe RNA-Konzentrationen durch zeitliche Degradation unter die Nachweisgrenzen fallen könnte. Auch in der RT-PCR konnte keine AT<sub>2</sub>-R mRNA gemessen werden, da die Konzentrationen für eine Messung zu gering waren. Bei wiederholten Versuchen unterschieden sich die AT<sub>2</sub>-R mRNA Signale nicht von der Negativkontrolle mit Wasser.

Eine andere mögliche Fehlerquelle könnte das Design der ISH-Sonde sein. Dafür spräche, dass zeitgleich im selben Labor ISH-Experimente mit AT<sub>2</sub>-R Sonden an Kleinhirnparenchym gesunder Mäuseembryos stattfanden. Bei identischem Versuchsaufbau, frischeren Gewebeproben und denselben Materialien konnte auch hier keine AT<sub>2</sub>-R mRNA nachgewiesen werden. Laut Literatur besteht hier jedoch zumindest bei Rattenembryonen mittels ISH und postnatalen Mäusen acht Tage nach der Geburt mittels Autoradiographie, Immunhistochemie und IF eine bereits nachgewiesene detektierbare Expression (5; 60).

Es empfiehlt sich, die Versuche mit einer neu designten ISH-Sonde, welche an eine andere Basenpaar-Sequenz bindet, und gegebenenfalls frischeren Gewebeproben zu

wiederholen. Eine Wiederholung der Versuche war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zu realisieren.

### 5.6 Renin

Renin mRNA konnte bei Kontrolltieren in den Zellen des JGA und teilweise im Tubulointerstitium gefunden werden. In der ISH wurde ein Anstieg bei STZ-Tieren in beiden Bereichen detektiert. Diese Ergebnisse waren mittels RT-PCR reproduzierbar, jedoch waren die gemessenen Werte nicht signifikant.

Die Spaltung von Angt in AngII durch Renin kommt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der RAS-Kaskade eine besondere Bedeutung zu. Die Menge an aktivem Renin und produziertem AngII korreliert also. Da AngII gesichert an der Vermehrung von EZM – und damit auch an der Glomerulosklerose der DN – beteiligt ist, steht folglich auch Renin mit diesem Pathomechanismus in direktem Zusammenhang (71). Seit 2007 besteht die Möglichkeit mit direkten Renin-Inhibitoren (DRI) wie Aliskiren das RAS bei Patienten zu hemmen. Es wirkt ähnlich blutdrucksenkend wie die etablierten Standard-Medikamente aus den Gruppen der ACE-I oder ARB (39). Zusätzlich reduzieren Renin-Inhibitoren die Plasma-Renin-Aktivität (PRA), welche als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse gilt (84).

Die Behandlung von DM-Patienten mit DRI auch im Zusammenhang mit der DN sind noch nicht abschließend mit ausreichend Studien untersucht. In einem Review-Artikel aus dem Jahr 2012 wurden beispielsweise reno-protective Effekte von Aliskiren beschrieben. So zeigten Untersuchungen mit zwei verschiedenen diabetischen Rattenmodellen eine verringerte Albuminurie unter DRI-Therapie. Des Weiteren wiesen auch Typ-2-Diabetiker mit erhöhter Albuminurie durch Aliskiren einen Rückgang der Albuminurie auf. Und in der AVOID (Aliskiren in the Evakuation of Proteinuria in Diabetes) Studie wurde ein Rückgang der Proteinurie bei zusätzlicher Aliskiren-Gabe bei antihypertensiver Therapie mittels ARB, beta-Blocker und Kalziumkanal-Blockern beschrieben (38). In einer systemischen Metaanalyse aus dem Jahr 2019, welche eine Analyse und zwei post-hoc Analysen einschloss, wurde jedoch eine nicht-signifikant erhöhte Mortalität bei dualer RAS-Blockade bei Diabetikern gegenüber der Monotherapie hingewiesen (8). Des Weiteren wurde im Rahmen der AQUARIUS (Atherosclerosis Regression Intravascular Ultrasound Study) Studie von 2013 vermutet, dass DRI in einer diabetischen Stoffwechsellage schlechter wirken

können, da bei Diabetikern die PRA erniedrigt ist und dem Pharmakon somit Angriffspunkte fehlen (8). Gleichzeitig sorgt die lokal erhöhte Renin-Aktivität in der Niere bekanntermaßen für einen Progress der DN (22). Eine experimentelle Etablierung einer organspezifischen renalen Applikation von DRI wäre wünschenswert, um überprüfen zu können, ob DRI so für Diabetiker einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Therapien böten. Falls beispielsweise durch lokal renal wirkende DRI der Verlauf einer DN verbessert werden könnte, wäre diese DRI-Monotherapie gegenüber anderen RAS-Hemmer eine denkbare Alternative.

### **5.7 (Pro)Renin-Rezeptor**

Der PRR konnte im Rahmen dieser Arbeit in den Glomeruli, in allen Tubulus-Segmenten sowie in interstitiellen Zellen detektiert werden. Dies deckt sich auch mit vorangegangenen Untersuchungen in Ratten (1; 32).

In der ISH-Mikroskopie zeigten sich keine visuellen Alterationen in der STZ-Gruppe. Aufgrund mangelnder Qualität konnten mittels der RT-PCR keine validen Messungen erbracht werden. In anderen Studien konnte jedoch bereits ein PRR-Anstieg bei Patienten mit DM sowohl systemisch als auch lokal renal nachgewiesen werden (6; 69). Über das aktivierte intrarenale RAS erhöht sich auch die Aktivität des PRR und unterstützt schließlich lokal vermehrt profibrotische und proinflammatorische Effekte. Darüber hinaus ist bekannt, dass der PRR durch die Stimulation von Zytokinen wie beispielsweise TNF- $\alpha$  oder IL-1  $\beta$  auch RAS-unabhängig an der Entwicklung und Progression der DN beteiligt ist (47; 49). Insgesamt spielt der PRR eine komplexe Schlüsselrolle in der Entwicklung und Aggravation der DN und könnte somit ein wichtiger Angriffspunkt für zukünftige Therapieoptionen sein (50). Es gibt bereits erste Hinweise, dass DRI und ARB auch hier ansetzen könnten: durch die Hemmung der Renin-Aktivität kommt es kompensatorisch zu einer Erhöhung der Plasma-Renin-Konzentration (PRC). Durch einen negativen Feedback-Mechanismus wird durch die erhöhte PRC der PRR herunterreguliert, wodurch dieser weniger AngII abhängig und unabhängig wirken kann (38).

### 5.8 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es die mRNA Expression von Agt, Renin, ACE, ACE2, PRR, AT<sub>1</sub>-R und AT<sub>2</sub>-R in der Niere zu lokalisieren und etwaige Veränderungen unter chronischer Hyperglykämie zu vergleichen. Abschließend sollte ein Überblick des intrarenalen RAS unter diabetischen Stoffwechselbedingungen stehen. Dies konnte vor allem für ACE, AT<sub>1</sub>-R, Renin und Agt realisiert werden. Jedoch zeigten auch die Beobachtungen bei den restlichen Komponenten mögliche zukünftige Forschungswege auf.

Die Komponenten des intrarenalen RAS können durch chronische Hyperglykämie aktiviert werden und bieten wie oben diskutiert vielversprechende Möglichkeiten zur frühzeitigen Diagnostik, sowie mehrere Angriffspunkte für innovative Therapieoptionen. Ausnahmen stellen dabei die ACE und AT<sub>1</sub>-R Expression in den proximalen Tubuli dar. Hier wurde eine Abnahme der Expression festgestellt. Alle anderen Messungen zeigten ein unveränderte oder vermehrte mRNA Synthese. Auch Endothel- und Interstitiumszellen waren durch die chronische Hyperglykämie affiziert (Tab. 9). Vor allem der interstitielle Anstieg an Renin mRNA zeigte sich eindrücklich.

Mit einem Beitrag zum besseren Verständnis des intrarenalen RAS bei chronischer Hyperglykämie könnte diese Arbeit Anstöße für weitere Fragestellungen bieten, um schließlich einen umfassenden Überblick über das gesamte intrarenale RAS bei DM zu erhalten und somit die Morbidität und Mortalität von Diabetikern perspektivisch senken zu können.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die mRNA Expression von Agt, AT<sub>1</sub>-R, AT<sub>2</sub>-R, ACE, ACE2, Renin und PRR mittels ISH und RT-PCR in Mäusenieren untersucht. Dabei wurden hyperglykämische STZ-Mäuse als diabetisches Modell mit einer normoglykämischen Kontrollgruppe verglichen.

Glomerulär erfolgte vor allem der Nachweis von AT<sub>1</sub>-R und ACE mRNA. Interessant war hier vor allem die Veränderung der ACE Expression, die in den Glomeruli und in den PT gegenläufig imponierte: während die Glomeruli eine vermehrte Expression von ACE mRNA zeigten, fiel diese in den PT ab. Es könnte ein Zusammenhang zwischen der glomerulär erhöhten ACE mRNA Expression und der DN bestehen, da vor allem die Glomeruli bei der DN geschädigt werden.

In den PT fand sich die stärkste Agt Expression, die unter chronischer Hyperglykämie zusätzlich stimuliert wurde. Sie ist ein früh zu detektierender Marker der DN. Umgekehrt verhielt es sich bei der Expression von ACE und AT<sub>1</sub>-R. Unter diabetischer Stoffwechsellage war die entsprechende mRNA in den PT vermindert. Die PRR Expression zeigte sich in beiden Gruppen ähnlich.

Des Weiteren fand sich in den DT und SR in beiden Gruppen unverändert viel PRR mRNA, wohin gegen die anderen RAS Komponenten hier nicht lokalisiert wurden.

Wie zu erwarten, fand sich eine starke Renin Expression in den juxtaglomerulären Zellen, die durch chronische Hyperglykämie weiter stimuliert wurde. Interstitielle Zellen exprimierten AT<sub>1</sub>-R, Renin und PRR mRNA. Während die interstitielle Renin mRNA Synthese bei chronischer Hyperglykämie angeregt wurde, blieben die anderen detektierten RAS Komponenten unverändert. In den intrarenalen Gefäßen fand sich nur bei STZ-Tieren eine Renin Expression. Neben einem einzelnen ACE exprimierendem Gefäß eines Kontrolltiers fand sich keine weitere vasale Expression.

## Zusammenfassung

Die beiden folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen (Tabelle 9 und Tabelle 10).

		Glomerulus	PT	DT	SR	Gefäß	Interstitium
<b>Agt</b>	K		++				
	STZ		+++				
<b>AT<sub>1</sub>-R</b>	K	++	++				+
	STZ	++	+				+
<b>AT<sub>2</sub>-R</b>	K						
	STZ						
<b>ACE</b>	K	+	+++			+	
	STZ	++	++				
<b>ACE 2</b>	K	-					
	STZ	-					
<b>Renin</b>	K	++ (in JGZ)					++
	STZ	+++ (in JGZ)				+	+++
<b>PRR</b>	K	++	++	+	+		+
	STZ	++	++	+	+		+

**Tabelle 9. Übersicht der mRNA Expression des intrarenalen RAS einer Kontrollgruppe und im STZ-Modell.** Leeres Feld: keine (detektierbare) mRNA; +: mäßig mRNA; ++: viel mRNA; +++: sehr viel mRNA

		Glomerulus	PT	DT	SR	Gefäß	Interstitium
<b>Agt</b>			↑				
<b>AT<sub>1</sub>-R</b>			↓				
<b>AT<sub>2</sub>-R</b>							
<b>ACE</b>		↑	↓				
<b>ACE 2</b>							
<b>Renin</b>		↑(in JGZ)					↑
<b>PRR</b>							

**Tabelle 10. Übersicht der Veränderungen des intrarenalen RAS im STZ-Modell.** Leeres Feld: unveränderte mRNA Expression/ keine Aussage möglich, ↓: Abnahme der mRNA, ↑: Zunahme der mRNA,

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
<b>ACD</b>	Advanced Cell Diagnostics
<b>ACE (2)</b>	Angiotensin-konvertierendes Enzym (2)
<b>ACE-I</b>	ACE-Hemmer/ACE-Inhibitor
<b>Ac-SDKP</b>	N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Proline
<b>ADH</b>	antidiuretisches Hormon
<b>AGEs</b>	Advanced glycation end products
<b>Agt</b>	Angiotensinogen
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Ang I/II/(1-7)/(1-9)</b>	Angiotensin I/II/(1-7)/(1-9)
<b>AQP</b>	Aquaporin 2
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AT<sub>1</sub>-R</b>	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
<b>ARB</b>	AT <sub>1</sub> -R-Antagonist/Blocker
<b>AT<sub>2</sub>-R</b>	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium-Ion
<b>Cp</b>	Crossing point
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DN</b>	diabetische Nephropathie
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DRI</b>	Direkter Renin-Inhibitor
<b>DT</b>	Distaler Tubulus
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent Assay
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FFPE</b>	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
<b>GBM</b>	glomeruläre Basalmembran
<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like Peptide
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>ISH</b>	In-Situ-Hybridisierung
<b>JGA</b>	Juxtaglomerulärer Apparat
<b>JGZ</b>	juxtaglomeruläre Zellen
<b>K</b>	Kontrolle
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>MAP-Kinase</b>	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
<b>NBF</b>	neutral gepuffertes Formalin
<b>NI</b>	Niereninsuffizienz
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PR</b>	Prorenin
<b>PRA</b>	Plasma-Renin-Aktivität
<b>PRC</b>	Plasma-Renin-Konzentration
<b>PRR</b>	(Pro)Renin-Rezeptor
<b>PT</b>	Proximaler Tubulus
<b>RAS</b>	Renin-Angiotensin-System

## Anhang

<b>(m)RNA</b>	(messenger) Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>RPL32</b>	ribosomales Protein L32
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	quantitative RealTime-Polymeraskettenreaktion
<b>SR</b>	Sammelrohr
<b>STZ</b>	Streptozocin
<b>TGF-β</b>	Transforming-Growth-Factor-beta
<b>V-ATPase</b>	vakuoläre H <sup>+</sup> -Adenosintriphosphatase
<b>vs</b>	versus
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 7.2 Materialliste

### Verbrauchsmaterial und Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
<b>RNAscope® H2O2&amp;Protease Plus Reagents</b>	Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA)
<b>RNAscope® 2.5 HD Detection Reagent - BROWN</b>	Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA)
<b>RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection Reagents</b>	Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA)
<b>RNAscope®Target Retrieval Reagents</b>	Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA)
<b>RNAscope®Wash Buffer Reagents</b>	Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA)
<b>VectaMount® Permanent Mounting Medium</b>	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)
<b>ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen</b>	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)
<b>Dako Glycergel Mounting Medium</b>	Dako North America Inc (Carpinteria, CA, USA)
<b>Xylol (Isomere)</b>	Carl Roth GmgH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Ammonium hydroxide solution (28.0-30.0% NH3 basics)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
<b>Ethanol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
<b>DPBS (1x)</b>	Gibco by Life Technologies (Paisley, Großbritannien)
<b>Albumin bovine</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
<b>Horse serum</b>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<b>LightCycler® 480 Multiwell Plate 96</b>	Roche (Basel, Schweiz)
<b>LightCycler® 480 SYBR Green I Master H</b>	nerbe plus GmbH (Winsen, Deutschland)
<b>6x DNA Loading Dye</b>	Fermentas GmbH (Sankt Leon-Rot, Deutschland)
<b>Multiply -Pro Gefäß 0,2mL</b>	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. (Nümbrecht, Deutschland)



## Anhang

<b>Midori Green Advance DNA Stain</b>	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren, Deutschland)
<b>FastGene 50bp DNA Ladder</b>	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren, Deutschland)
<b>Universal Agarose</b>	Bio & Sell GmbH (Feucht, Deutschland)
<b>TRISure</b>	Bioline (London, Großbritannien)

### Sonden

Alle verwendeten ISH-Sonden stammen von der Firma Advanced Cell Diagnostics (Newark, CA, USA).

	REF	LOT
<b>RNAscope® Probe Mm-Agt</b>	426941	19059A
<b>RNAscope® Mm-Ren1</b>	433461	19059A
<b>RNAscope® Probe Mm-Ace</b>	442731	18218A
<b>RNAscope® Probe Mm-Agtr1a-O1</b>	481161	18348A
<b>RNAscope® Probe Mm-Agtr2</b>	403991	18298A
<b>Postivkontrolle</b>		
<b>AT1b-Rezeptor</b>		
<b>RNAscope® Probe Mm-Atp6ap2-C2</b>	429931-C2	19059A
<b>RNAscope® Mm-Ace2-C2</b>	417081-C2	19059A

### Antikörper

Antikörper	prim/sek	Spezies	Art.-Nr.	Verdünnung	Firma
<b>Aquaporin-2</b>	Primär	goat	sc-9882	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
<b>Megalin</b>	Primär	mouse	sc-515772	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
<b>Calbindin</b>	Primär	mouse	300	1:200	Swant (Marly, Schweiz)
<b>Cy-2</b>	Sekundär	Donkey-Anti-Mouse	715-225-150	1:400	Jackson Immuno Research / Dianova (Ely, Großbritannien)
<b>Cy-5</b>	Sekundär	Donkey-anti-goat	705-175-147	1:400	Jackson Immuno Research / Dianova (Ely, Großbritannien)

### Geräte

Gerät	Firma
<b>Compact Line OV4 (umgebaut)</b>	Biometra (Göttingen, Deutschland)
<b>Dampfgarer</b>	Brown (Neu-Isenburg, Deutschland)
<b>Wasserbad</b>	Haake Technik GmbH (Vreden, Deutschland)
<b>Zentrifuge 5417R</b>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
<b>Tischzentrifuge</b>	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
<b>Vortex REAX2000</b>	Heidolph Instruments GmbH&co. KG (Schwabach, Deutschland)
<b>LightCycler® 480</b>	Roche (Basel, Schweiz)

## Anhang

### Primer

Die Primer für die RT-PCR wurden von der Firma biomers.net GmbH synthetisiert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol / µl erstellt.

<b>Renin</b>	5'-AGGGGGTGCAGGAGGAA-3'
	5'-GATAATGCTGCGGGTCGCTA-3'
<b>ACE</b>	5'-ACCCTAGGACCTGCCAATCT-3'
	5'-CGTGAGGAAGCCAGGATGTT-3'
<b>ACE2</b>	5'-CAGCTGAGGCCGTTGTATGA-3'
	5'-TGTAGCCATCTGCCTCT-3'
<b>Angiotensinogen</b>	5'-TGTCTAGGTT...CTGAAG-3'
	5'-GATGTATACG...CCCCAG-3'
<b>(Pro)Renin-Rezeptor</b>	5'-GTTTTGCAGT...TCCCAG-3'
	5'-TTGAAACAGG...TACGGA-3'
<b>AT1a-Rezeptor</b>	5'-TCACCAGATC...TTTTGA-3'
	5'-AGAGTTAAGG...TGCTTT-3'
<b>AT2-Rezeptor</b>	5'-CAGCAGCCGT...GATAAT-3'
	5'-TATCTGATGG...GAGCAA-3'
<b>RPL-32</b>	5'-TGGAGGTGCTGCTGATGTG-3'
	5'-CGTTGGGATTGGTGACTCTGA-3'

### Verwendete Software

- Microsoft Office 10, Microsoft Paint
- Axiovision Zen lite 2012 „blue edition“, Zeiss
- LightCycler 480 SW 1.5
- Gimp 2.10.14
- PubMed von NCBI (National Center for Biotechnology)
- Citavi 6

### 7.3 Verzeichnisse

#### 7.3.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. A. Schematische Darstellung einer Niere. B. Schematische Darstellung eines Glomerulus. C. Schematische Darstellung eines Nephrons (Eigene Darstellung, erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Abbildung 2. Schematische Darstellung des RAS (Eigene Darstellung, erstellt mit Microsoft PowerPoint).

Abbildung 3. BROWN RNAScope Assay mit Agt (braun, exemplarische Pfeile), mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung). Vergleich der kortikalen mRNA-Expression von Agt zwischen einem Kontrolltier und einem STZ-Tier.

Abbildung 4. BROWN RNAScope Assay mit Agt (braun), mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung). A. Zusätzliche IF mit Megalin (grün). B. Agt-mRNA in der Papille bei einem STZ-Tier, am ehesten Intermediärtubuli entsprechend.

Abbildung 5. Übersichtsaufnahmen einer Diabetes- und einer Kontrollniere mit DUPLEX RNAScope Assay mit ACE (grün)- und ACE2 (rot)-Sonde (100x Vergrößerung).

Abbildung 6. DUPLEX RNAScope Assay mit ACE/ACE2 + IF mit Nephronsegment-spezifischem AK, mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung).

A. Abbildung 7. Glomeruläre Expression von ACE-mRNA. DUPLEX RNAScope Assay mit ACE- (grün) und ACE2-Sonde (rot, hier nicht zu sehen) in glomerulären Zellen der Kontroll- und STZ-Gruppe, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 8. DUPLEX RNAScope Assay mit ACE (grün) und ACE2 (rot) im Kortex, mikroskopische Aufnahmen (400x Vergrößerung).

A. Abbildung 9. Vergleich der kortikalen AT1-R-Expression eines Kontrolltiers mit einem STZ-Modell, mikroskopische Aufnahmen (200x Vergrößerung).

Abbildung 10. DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R-Sonde (grün) bei einem Kontroll- (links) und einem STZ-Tier (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 11. DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R-Sonde (grün) bei einem Kontroll- (links) und einem STZ-Tier (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 12. DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R mit Aquaporin-IF in grün bei einem Kontrolltier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 13. DUPLEX RNAScope Assay mit AT1-R mit Calbindin-IF in grün bei einem Kontrolltier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 14. Renale Renin-Expression in Kontrollgruppe (oben) und STZ-Gruppe (unten). DUPLEX RNAScope Assay mit Renin (grün) und PRR (rot, in der Darstellung nicht zu sehen), mikroskopische Aufnahmen: Übersicht (links, 100x Vergrößerung), Kortex (rechts oben, 200x Vergrößerung) und Mark (rechts unten, 200x Vergrößerung).

Abbildung 15. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin und PRR bei einem STZ-Tier, mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Abbildung 16. Kortikale Expression von PRR-mRNA. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin- und PRR-Sonde im Kortex eines Kontroll- (links) und eines STZ-Tiers (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

## Anhang

Abbildung 17. Medulläre Expression von PRR-mRNA. DUPLEX RNAScope Assay mit Renin (grün)- und PRR(rot)-Sonde im Kortex eines Kontroll- (links) und eines STZ-Tiers (rechts), mikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

### 7.3.2 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1. qRT-PCR mit Agt-mRNA (Zonierung).

Diagramm 2. Darstellung im Box-Plot-Diagramm ( $K=23\pm 4\%$  vs  $STZ=41\pm 2\%$ ,  $p=0,08$ ).

Diagramm 3. qRT-PCR mit ACE-mRNA. A. Mikrodissektion, B. Zonierung.

Diagramm 4. RT-PCR von ACE2-mRNA.

Diagramm 5. Darstellung Darstellung im Box-Plot-Diagramm.

Diagramm 6. RT-PCR von  $AT_1R$ -mRNA bei mikrodissezierten Nieren.

Diagramm 7. qRT-PCR von Renin-mRNA aus zonierten Nieren.

Diagramm 8. qRT-PCR von PRR-mRNA aus mikrodissezierten Nieren.

### 7.3.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Histologische Einteilung der DN. (Darstellung nach (10))

Tabelle 2. Protokoll des BROWN RNAScope Kit (Quelle: ACD).

Tabelle 3. Protokoll des DUPLEX RNAScope Kit (Quelle: ACD).

Tabelle 4. IF-Protokoll (Quelle: Arbeitsgruppe Prof. F. Schweda, Universität Regensburg)

Tabelle 5. Zusammensetzung des MasterMix (Quelle: Roche).

Tabelle 6. Protokoll der RT-PCR (Quelle: Roche).

Tabelle 7. Auswertung der mRNA in Glomeruli anhand mikroskopischer Aufnahmen der ISH (Quelle: ACD).

Tabelle 8. Zuordnung der Antigene bezüglich Nephronsegment und Funktion (4,49,50).

Tabelle 9. Übersicht der mRNA-Expression des intrarenalen RAS einer Kontrollgruppe und im STZ-Modell (Eigene Darstellung).

Tabelle 10. Übersicht der Veränderungen des intrarenalen RAS im STZ-Modell.

### 8 Literaturverzeichnis

1. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K, Connelly KA, Yuen D, Trogadis J, Herzenberg AM, Kuliszewski MA, Leong-Poi H, Gilbert RE (2009)  
The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney.  
*Hypertension* 54, 261–269
2. Alcantara Santos R de, Guzzoni V, Silva KAS, Aragão DS, Paula Vieira R de, Bertencello N, Schor N, Aimbire F, Casarini DE, Cunha TS (2021)  
Resistance exercise shifts the balance of renin-angiotensin system toward ACE2/Ang 1-7 axis and reduces inflammation in the kidney of diabetic rats.  
*Life Sci* 287, 120058
3. Amann B, Tinzmann R, Angelkort B (2003)  
ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1.  
*Diabetes care* 26, 2421–2425
4. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR (1993)  
Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations.  
*Am J Physiol* 265, F477-86
5. Arce ME, Sánchez SI, Aguilera FL, Seguin LR, Seltzer AM, Ciuffo GM (2011)  
Purkinje cells express Angiotensin II AT(2) receptors at different developmental stages.  
*Neuropeptides* 45, 69–76
6. Arthur G, Osborn JL, Yiannikouris FB (2021)  
(Pro)renin receptor in the kidney: function and significance.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 320, R377-R383
7. Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB (2008)  
Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander?  
*Diabetes care* 31 Suppl 2, S194-201
8. Bjerre HL, Christensen JB, Buus NH, Simonsen U, Su J (2019)  
The role of aliskiren in the management of hypertension and major cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis.  
*J Hum Hypertens* 33, 795–806
9. Bonnet F, Candido R, Carey RM, Casley D, Russo LM, Osicka TM, Cooper ME, Cao Z (2002)  
Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade.  
*J Hypertens* 20, 1615–1624
10. Borghi F, Seva-Pessoa B, Grassi-Kassisse DM (2016)  
The adipose tissue and the involvement of the renin-angiotensin-aldosterone system in

## Anhang

- cardiometabolic syndrome.  
Cell Tissue Res 366, 543–548
11. Brenner BM, Cooper ME, Zeeuw D de, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S (2001)  
Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy.  
The New England journal of medicine 345, 861–869
  12. Burns KD (2000)  
Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney.  
Am J Kidney Dis 36, 449–467
  13. Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD (1994)  
Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse.  
Am J Physiol 267, E260-7
  14. Chambers M (2020-08-13T14:58:17.000Z)  
ChemIDplus - 18883-66-4 - AGRCPNMCOXLKFO-BDVNFPICSA-N - Streptozocin [USAN:INN] - Similar structures search, synonyms, formulas, resource links, and other chemical information.  
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/18883-66-4>, 13.08.2020.375Z
  15. Chawla T, Sharma D, Singh A (2010)  
Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy.  
World J Diabetes 1, 141–145
  16. Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK (1998)  
Megalin-mediated endocytosis in renal proximal tubule.  
Renal failure 20, 191–199
  17. Culver S, Li C, Siragy HM (2017)  
Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme: the Old and the New.  
Curr Hypertens Rep 19, 80
  18. Deinum J, Rønn B, Mathiesen E, Derkx FH, Hop WC, Schalekamp MA (1999)  
Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus.  
Diabetologia 42, 1006–1010
  19. Elham Bahreini, Mohsen Nabi-Afjadi (2021)  
Molecular Mechanisms Involved in Intrarenal Renin-Angiotensin and Alternative Pathways in Diabetic Nephropathy - A Review.  
The Review of Diabetics Studies 17
  20. Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S (1992)  
Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes.  
Biochem Biophys Res Commun 184, 1067–1073
  21. Farag E, Sessler DI, Ebrahim Z, Kurz A, Morgan J, Ahuja S, Maheshwari K, John Doyle D (2017)

## Anhang

- The renin angiotensin system and the brain: New developments.  
J Clin Neurosci 46, 1–8
22. Federlein A (2018)  
Die funktionelle Rolle des tubulären Renin-Systems
23. Fuchs S, Xiao HD, Cole JM, Adams JW, Frenzel K, Michaud A, Zhao H, Keshelava G, Capecchi MR, Corvol P, Bernstein KE (2004)  
Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice.  
The Journal of biological chemistry 279, 15946–15953
24. Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky K, Boucher R, Genest J (1971)  
Renin in dog brain.  
American Journal of Physiology-Legacy Content 221, 1733–1737
25. Geisberger S, Maschke U, Gebhardt M, Kleinewietfeld M, Manzel A, Linker RA, Chidgey A, Dechend R, Nguyen G, Daumke O, Muller DN, Wright MD, Binger KJ (2015)  
New role for the (pro)renin receptor in T-cell development.  
Blood 126, 504–507
26. Giani JF, Veiras LC, Shen JZY, Bernstein EA, Cao D, Okwan-Duodu D, Khan Z, Gonzalez-Villalobos RA, Bernstein KE (2021)  
Novel roles of the renal angiotensin-converting enzyme.  
Molecular and cellular endocrinology 529, 111257
27. Goldstein B, Speth RC, Trivedi M (2016)  
Renin-angiotensin system gene expression and neurodegenerative diseases.  
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 17
28. Gunter Wolf, Peter R. Mertens (2014)  
Diabetische Nephropathie.  
Springer Medizin Verlag GmbH & Springer Verlag GmbH, Teile von SpringerNature
29. Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA, Vorotelyak EA, Vasiliev AV (2018)  
Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus and Rodent Experimental Models.  
Acta Naturae 10, 24–33
30. Hamming I, van Goor H, Turner AJ, Rushworth CA, Michaud AA, Corvol P, Navis G (2008)  
Differential regulation of renal angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 during ACE inhibition and dietary sodium restriction in healthy rats.  
Experimental Physiology 93, 631–638
31. Hemmingsen C (2000)  
Regulation of renal calbindin-D28K.  
Pharmacology & Toxicology 87 Suppl 3, 5–30
32. Hennrikus M, Gonzalez AA, Prieto MC (2017)  
The prorenin receptor in the cardiovascular system and beyond.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 314, H139-45
33. Herold G. (2019)  
Innere Medizin, Köln

## Anhang

34. Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM (1981)  
Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus.  
*Kidney Int* 19, 410–415
35. Ichihara A, Yatabe MS (2019)  
The (pro)renin receptor in health and disease.  
*Nat Rev Nephrol* 15, 693–712
36. Iglay K, Hannachi H, Joseph Howie P, Xu J, Li X, Engel SS, Moore LM, Rajpathak S (2016)  
Prevalence and co-prevalence of comorbidities among patients with type 2 diabetes mellitus.  
*Current Medical Research and Opinion* 32, 1243–1252
37. Inger C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs J-L (2002)  
Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats.  
*Am J Physiol Renal Physiol* 283, F995-1002
38. Jagadeesh G, Balakumar P, Stockbridge N (2012)  
How well do aliskiren's purported mechanisms track its effects on cardiovascular and renal disorders?  
*Cellular signalling* 24, 1583–1591
39. Jensen C, Herold P, Brunner HR (2008)  
Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment.  
*Nat Rev Drug Discov* 7, 399–410
40. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Meer EJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J (2008)  
The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes.  
*Hypertension* 51, 1597–1604
41. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007)  
The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease.  
*Pharmacol Rev* 59, 251–287
42. Kobori H, Urushihara M (2013)  
Augmented intrarenal and urinary angiotensinogen in hypertension and chronic kidney disease.  
*Pflugers Arch* 465, 3–12
43. L Gabriel Navar, Kenneth D Mitchell, Lisa M Harrison-Bernard, Hiroyuki Kobori, and Akira Nishiyama (2001)  
Review: Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states
44. L. Merker et al. (2021)  
Nephropathy in Diabetes
45. Leite APO, Aragão DS, Nogueira MD, Pereira RO, Jara ZP, Fiorino P, Casarini DE, Farah V (2019)  
Modulation of renin angiotensin system components by high glucose levels in the culture of collecting duct cells.  
*Journal of cellular physiology* 234, 22809–22818



## Anhang

46. Lenzen-Schulte M (2017)  
Multimorbidität: Wenn Krankheiten interagieren.  
Deutsches Ärzteblatt
47. Li Z, Zhou L, Wang Y, Miao J, Hong X, Hou FF, Liu Y (2017)  
(Pro)renin Receptor Is an Amplifier of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Kidney Injury and Fibrosis.  
Journal of the American Society of Nephrology : JASN 28, 2393–2408
48. Liu Y, Li L, Qiu M, Tan L, Zhang M, Li J, Zhu H, Jiang S, Su X, Li A (2019)  
Renal and cerebral RAS interaction contributes to diabetic kidney disease.  
Am J Transl Res 11, 2925–2939
49. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM (2010)  
(Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation.  
Clin Exp Pharmacol Physiol 37, 277–282
50. Matavelli LC, Siragy HM (2015)  
AT2 receptor activities and pathophysiological implications.  
Journal of cardiovascular pharmacology 65, 226–232
51. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001)  
Angiotensin II and renal fibrosis.  
Hypertension 38, 635–638
52. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, Shibuya K, Hase H, Aikawa A (2008)  
Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls.  
Am J Kidney Dis 51, 613–623
53. Mizuiri S, Ohashi Y (2015)  
ACE and ACE2 in kidney disease.  
World J Nephrol 4, 74–82
54. MLP (Hrsg) (2006)  
Biochemie.  
Thieme, Stuttgart
55. Nakatani S, Ishimura E, Naganuma T, Nakatani A, Ichii M, Fukumoto S, Mori K, Emoto M, Nakatani T, Inaba M (2014)  
Poor glycemic control and decreased renal function are associated with increased intrarenal RAS activity in Type 2 diabetes mellitus.  
Diabetes research and clinical practice 105, 40–46
56. Nazar CMJ (2014)  
Diabetic nephropathy; principles of diagnosis and treatment of diabetic kidney disease.  
Journal of Nephro pharmacology 3, 15–20
57. Nguyen G (2006)  
Renin/prorenin receptors.  
Kidney Int 69, 1503–1506
58. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D (2002)  
Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to

## Anhang

- renin.  
J Clin Invest 109, 1417–1427
59. Noshahr ZS, Salmani H, Khajavi Rad A, Sahebkar A (2020)  
Animal Models of Diabetes-Associated Renal Injury.  
Journal of Diabetes Research 2020, 9416419
  60. Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortés C (1999)  
Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain.  
The Journal of comparative neurology 407, 193–206
  61. Pape, Silbernagl, Kurtz (Hrsg) (2014)  
Physiologie.  
7. Aufl. Thieme, Stuttgart
  62. Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY (2016)  
Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure.  
Circ Res 118, 1313–1326
  63. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006)  
Physiology of local renin-angiotensin systems.  
Physiol Rev 86, 747–803
  64. Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, Lavandero S (2020)  
Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease.  
Nature Reviews. Cardiology 17, 116–129
  65. Pedersen MM, Hansen KW, Schmitz A, Sørensen K, Christensen CK, Mogensen CE (1992)  
Effects of ACE inhibition supplementary to beta blockers and diuretics in early diabetic nephropathy.  
Kidney Int 41, 883–890
  66. Peng H, Xing Y-F, Ye Z-C, Li C-M, Luo P-L, Li M, Lou T-Q (2014)  
High glucose induces activation of the local renin-angiotensin system in glomerular endothelial cells.  
Molecular Medicine Reports 9, 450–456
  67. Price DA, Porter LE, Gordon M, Fisher ND, De'Oliveira JM, Laffel LM, Passan DR, Williams GH, Hollenberg NK (1999)  
The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy.  
Journal of the American Society of Nephrology : JASN 10, 2382–2391
  68. Prof. Dr. med. Peter Altmeyer (2020)  
AT2-Rezeptor.  
Altmeyers Enzyklopädie
  69. Quadri SS, Cooper C, Ghaffar D, Vaishnav H, Nahar L (2021)  
The Pathological Role of Pro(Renin) Receptor in Renal Inflammation.  
Journal of experimental pharmacology 13, 339–344
  70. Reverte V, Gogulamudi VR, Rosales CB, Musial DC, Gonsalez SR, Parra-Vitela AJ, Galeas-Pena M, Sure VN, Visniauskas B, Lindsey SH, Katakam PVG, Prieto MC (2020)  
Urinary angiotensinogen increases in the absence of overt renal injury in high fat diet-induced

## Anhang

- type 2 diabetic mice.  
J Diabetes Complications 34, 107448
71. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J (2006)  
Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases.  
Nephrol Dial Transplant 21, 16–20
72. Sachetelli S, Liu Q, Zhang S-L, Liu F, Hsieh T-J, Brezniceanu M-L, Guo D-F, Filep JG, Ingelfinger JR, Sigmund CD, Hamet P, Chan JSD (2006)  
RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney.  
Kidney Int 69, 1016–1023
73. Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Aslani S (2018)  
AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions.  
European Journal of Pharmacology 833, 158–164
74. Satou R, Shao W, Navar LG (2015)  
Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension.  
Therapeutic advances in cardiovascular disease 9, 181–190
75. Schrankl J, Fuchs M, Broeker K, Daniel C, Kurtz A, Wagner C (2021)  
Localization of angiotensin II type 1 receptor gene expression in rodent and human kidneys.  
Am J Physiol Renal Physiol 320, F644-F653
76. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (Hrsg) (2015)  
Prometheus LernAtlas der Anatomie.  
4. Aufl. Thieme, Stuttgart
77. Siegenthaler W. BH (Hrsg) (2006)  
Klinische Pathophysiologie.  
Thieme, Stuttgart
78. Siragy HM (2010)  
The angiotensin II type 2 receptor and the kidney.  
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 11, 33–36
79. Soler MJ, Wysocki J, Battle D (2013)  
ACE2 alterations in kidney disease.  
Nephrol Dial Transplant 28, 2687–2697
80. Taugner R, Hackenthal E, Inagami T, Nobiling R, Poulsen K (1982)  
Vascular and tubular renin in the kidneys of mice.  
Histochemistry 75, 473–484
81. Te Riet L, van Esch JHM, Roks AJM, van den Meiracker AH, Danser AHJ (2015)  
Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations.  
Circ Res 116, 960–975
82. Tesch GH, Allen TJ (2007)  
Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy.  
Nephrology (Carlton) 12, 261–266

## Anhang

83. Tikellis C, Bernardi S, Burns WC (2011)  
Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal disease.  
Curr Opin Nephrol Hypertens 20, 62–68
84. Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G (2008)  
The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction.  
Vasc Health Risk Manag 4, 971–981
85. Wagner J, Gehlen F, Ciechanowicz A, Ritz E (1999)  
Angiotensin II receptor type 1 gene expression in human glomerulonephritis and diabetes mellitus.  
Journal of the American Society of Nephrology 10, 545–551
86. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD (2001)  
Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors.  
Am J Physiol Renal Physiol 280, F254-65
87. Wolf G. SR (1996)  
Angiotensin-II-Wirkungen an der Niere: mehr als ein Vasokonstriktor.  
Deutsches Ärzteblatt 1996
88. World Health Organization (2021)  
Diabetes.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
89. Zabetakis PM, Nissenson AR (2000)  
Complications of chronic renal insufficiency: beyond cardiovascular disease.  
Am J Kidney Dis 36, S31-8
90. Zoja C, Xinaris C, Macconi D (2020)  
Diabetic Nephropathy: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets.  
Frontiers in Pharmacology 11, 586892

### **8.1 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 18.03.2024

---

(Antonia Herrmann)

### **8.2 Danksagung**

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Frank Schweda für die Ermöglichung dieser Arbeit danken. Er stand mir jederzeit mit zeitnahen und hilfreichen Antworten und der nötigen Motivation zur Seite.

Vor allem ohne meine Betreuerin Dr. rer. nat. Anna Federlein wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Ich danke ihr für die tatkräftige Unterstützung und Vorbereitung bei den Versuchen, der stets guten, praxisnahen Anleitung bei der Auswertung und Fehlerbehebung. Vielen Dank an sie und die anderen hilfsbereiten Mitarbeitenden in der Arbeitsgruppe und dem gesamten Institut für Physiologie der Universität Regensburg für die Geduld, Gründlichkeit und Unterstützung!

Des Weiteren bin ich dankbar und glücklich meinen Freund Benjamin als verlässliche, liebevolle Stütze beim Schreiben dieser Arbeit und in meinem restlichen Leben zu haben und zu wissen, dass wir uns gemeinsam allen (Un-)Annehmlichkeiten des Lebens stellen.

Einen besonderen Dank richte ich an meine Eltern und restliche Familie, ohne die ich nie so weit gekommen wäre. Insbesondere, weil grundsteinlegend, gilt dieser für meinen Papa, der mir wissenschaftliches Denken und die damit einhergehende Neugier von Kindesbeinen an vorgelebt und beigebracht hat. Ich wünsche, dass Du dort, wo Du jetzt bist, Deinen Frieden gefunden hast.