

**Lokalisation des Gap-Junction-Proteins Connexin 40
in der gesunden und der fibrotischen Niere**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Franz Fabian Boudriot

aus
Heidelberg

im Jahr
2023

**Lokalisation des Gap-Junction-Proteins Connexin 40
in der gesunden und der fibrotischen Niere**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Franz Fabian Boudriot

aus
Heidelberg

im Jahr
2023

Dekan: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charlotte Wagner

2. Berichterstatter: PD Dr. Lisa Geis

Inhalt

1	Einleitung.....	3
1.1	Die Niere, anatomische Struktur, Funktion und Bedeutung.....	3
1.2	Das Nierenkörperchen und der juxtaglomeruläre Apparat	3
1.3	Chronische Nierenerkrankung	4
1.3.1	Nierenfibrose.....	5
1.3.1.1	Myofibroblasten.....	6
1.3.1.2	Perizyten.....	7
1.4	Gap Junctions und Connexine	8
1.4.1	Connexin 40.....	9
1.4.1.1	Connexin 40 und renale Erkrankungen	9
1.5	<i>In-situ</i> -Hybridisierung mittels RNAscope®	10
1.6	Versuchsdurchführung und Ziele	11
2	Materialien und Methoden.....	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Instrumente.....	12
2.1.2	Verbrauchsgüter.....	15
2.1.3	Kits, Enzyme und Chemikalien	16
2.1.4	Puffer und Lösungen	17
2.1.5	Genotypisierung.....	19
2.1.6	Antikörper	19
2.1.7	RNAscope®-Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	20
2.1.8	Software und Internetdienste	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Tiere.....	21
2.2.1.1	Mäusestämme und Zucht	21
2.2.1.2	Genotypisierung	22
2.2.1.3	Connexin-40-Knockout in mesenchymalen Zellen durch Gabe von Tamoxifen	23
2.2.1.4	Induzierte Nierenfibrose	23
2.2.1.4.1	Adenin-induzierte Nephropathie	23
2.2.1.4.2	Unilaterale Ureterobstruktion	23
2.2.2	Retrograde arterielle Perfusion.....	24
2.2.3	Histologische Methoden	24
2.2.3.1	Einbettung der Nieren in Paraffin	24
2.2.3.2	Schneiden der Nieren.....	25

2.2.3.3	Immunfluoreszenz	25
2.2.3.4	In-situ-Hybridisierung mittels RNAscope® Technik	26
2.2.3.5	Mikroskopie	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Lokalisation von Cx40 in der gesunden Niere	28
3.1.1	Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen	29
3.1.2	Cx40-Lokalisation in Mesangium und Interstitium.....	33
3.1.3	Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen	35
3.2	Lokalisation von Cx40 in der fibrotischen Niere.....	38
3.2.1	Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen.....	41
3.2.2	Nachweisbarkeit einer außervaskulären Cx40-Expression auf mRNA-Ebene	44
3.2.3	Cx40 Lokalisation in Mesangium und Niereninterstitium	46
3.2.4	Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen	48
3.3	Lokalisation von Cx40 in der Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen	52
3.3.1	Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen.....	53
3.3.2	Cx40-Lokalisation in Mesangium und Interstitium.....	54
3.3.3	Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen	56
4	Diskussion	60
4.1	Ziel der Studie	60
4.2	Befunde und Studienlage	60
4.2.1	Basale Niere	60
4.2.2	Fibrotische Niere.....	62
4.2.2.1	Reninexpression	64
4.2.3	Cx40-Knockout in PDGFR β -positiven Zellen	65
4.3	Methodische Limitierung.....	66
4.4	Physiologische Bedeutung von Connexin 40	67
4.5	Bedeutung von Connexin 40 in der fibrotischen Niere	68
5	Abbildungsverzeichnis	70
6	Abkürzungsverzeichnis	73
7	Zusammenfassung.....	76
8	Summary.....	78
9	Literaturverzeichnis	79
10	Eigenständigkeitserklärung	83
11	Danksagung	84
12	Lebenslauf.....	85

1 Einleitung

1.1 Die Niere, anatomische Struktur, Funktion und Bedeutung

Die Niere ist ein bei Säugetieren paarig angelegtes, bohnenförmiges Organ. Es dient der Bildung des Harns, wobei im Zuge dieses Prozesses Wasser, Stoffwechselprodukte, Elektrolyte, Gifte und Medikamente ausgeschieden werden. Die menschliche Niere erhält etwa 20 % des Herzzeitvolumens, bezogen auf ihr Gewicht von circa 120 – 200 g mehr als jedes andere Organ. In der Konsequenz kommt der Niere große physiologische Bedeutung zu.

Die Niere befindet sich beim Menschen retroperitoneal und ist von einem Fettgewebepolster und zwei Faszien umgeben. Ihr Parenchym lässt sich in Rinde und Mark gliedern, wobei sich anatomisch und funktionell mehrere Einheiten, die Nierenlappen, ausmachen lassen. Jeder dieser Nierenlappen hat etwa pyramidale Form, wobei die Spitze in das Innere des Organs, hin zum Nierenbecken, zeigt. Aus dem Nierenbecken heraus verläuft der Harnleiter (Ureter) durch das Hilum renale, wohin auch die Blutgefäße münden, zur Blase.

Die Niere wird über eigene Arterien, welche direkt aus der Bauchaorta stammen, mit Blut versorgt. Die Blutgefäße verzweigen sich und verlaufen zwischen den Nierenlappen in Richtung Rinde, wobei sie schließlich als Bogengefäße zwischen Rinde und Mark verlaufen. Von diesen zweigen sich die Interlobulararterien in Richtung Rinde ab, welche ihrerseits die afferenten Arteriolen abgeben, die in die Kapillarschlingen des Glomerulus übergehen. In den Glomeruli wird Primärharn gebildet, indem Bestandteile des Blutes durch die Gefäßwand gepresst und filtriert werden. Der Primärharn wird in der Bowman-Kapsel aufgefangen, welche den Glomerulus umgibt und mit ihm das Nierenkörperchen bildet. Die Blutgefäße, die den Glomerulus verlassen, verlaufen zusammen mit dem Tubulussystem, welches den Primärharn transportiert, im Nierenmark, wobei zwischen beiden Kompartimenten sowie dem Niereninterstitium aktiver und passiver Austausch stattfindet. Nach Anatomie und Funktion lässt sich das Mark dabei in äußeres und inneres Mark gliedern. Nachdem Blut und Harn wieder aus dem Mark aufgestiegen sind, trifft das Tubulussystem erneut auf den Glomerulus, was regulatorische Bedeutung für die Filtration hat. Das Blut verlässt nun die Niere, während der Harn in Sammelrohren zurück durch das Mark und durch die Spitze des Nierenlappens in das Nierenbecken fließt. Im Sammelrohr finden letzte Austauschprozesse zwischen Tubulussystem und Interstitium statt.

Die Gesamtheit von Nierenkörperchen und Tubulussystem wird Nephron genannt.

1.2 Das Nierenkörperchen und der juxtaglomeruläre Apparat

Ein Glomerulus besitzt ein afferentes und ein efferentes Gefäß, welche zusammen den Gefäßpol des Nierenkörperchens bilden, während auf dem gegenüberliegenden Harnpol der Harn das

Nierenkörperchen verlässt. Das Vas afferens weist in seiner Gefäßwand, kurz vor seinem Übergang in den Glomerulus, juxtaglomeruläre Zellen auf. Dabei handelt es sich um epitheloide Myozyten, welche Renin produzieren, am apikalen Zellpol speichern und bei Stimulation freisetzen. Nachdem der Primärharn den Glomerulus verlassen, das Mark passiert hat und wieder in die Rinde aufgestiegen ist, berührt der (distale) Tubulus den Glomerulus zwischen Vas afferens und efferens. An dieser Kontaktstelle sind Zellen des Tubulus zu Macula-densa-Zellen ausdifferenziert, welche sich morphologisch deutlich abheben. Letztendlich befindet sich zwischen zu- und abführendem Gefäß sowie dem distalen Tubulus extraglomeruläre Mesangiumzellen, welche im Dienst der Zellkommunikation stehen und regulierend auf den Nierenstoffwechsel einwirken.

Die Gruppierung von juxtaglomerulären Zellen, Macula-densa-Zellen und extraglomerulärem Mesangium wird als juxtaglomerulärer Apparat (JGA) zusammengefasst. Er besitzt regulierende Funktion für die Durchblutung des Glomerulus, um den Filtrationsapparat vor zu hohen Perfusionsdrücken zu schützen, gleichzeitig jedoch bei niedrigem Systemdruck weiterhin adäquate Durchblutung zu gewährleisten. Dafür gibt es zwei Mechanismen. Der erste ist die myogene Autoregulation, auch Bayliss-Effekt genannt, bei der mechanosensible Kationenkanäle in glatten Muskelzellen des Vas afferens durch Zunahme der Gefäßwandspannung geöffnet werden, eine Depolarisation der Zellmembran und somit eine Vasokonstriktion auslösen. Der zweite ist das tubuloglomeruläre Feedback (TGF), das auf der Erfassung der NaCl-Konzentration im distalen Tubulus durch Macula-densa-Zellen beruht. Juxtaglomeruläre Zellen reagieren auf die entsprechenden Signale mit einer Anpassung des Vasotonus und der Reninsekretion. Die Konstriktion des Vas afferens senkt den Perfusionsdruck im nachfolgenden Stromgebiet, dem Glomerulus, während Renin über das Renin-Angiotensin(I/II)-Aldosteron-System systemisch den Blutdruck erhöht. Die Freisetzung von Renin kann außerdem sympathisch adrenerg, über β_1 -Rezeptoren oder endotheliale Barorezeptoren des Glomerulus stimuliert werden. Durch die systemische Wirkung von Renin kommt einer Fehlregulation hohe pathologische Relevanz zu.

1.3 Chronische Nierenerkrankung

Chronische Nierenerkrankung (CNE) beschreibt die dauerhafte Einschränkung der Nierenfunktion. Ursachen dafür können Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Autoimmunerkrankungen, angeborene Fehlbildungen, Urinabflusstörungen, Infektionen, Medikamentennebenwirkungen oder Drogen sein.

CNE wird laut der Studie Global Burden of Disease (GBD) 2017 auf Platz 12 der weltweit führenden Todesursachen eingeordnet. Zu den geschätzt 1,2 Millionen Todesfällen, die 2017 durch CNE verursacht wurden, kommen 1,4 Millionen Todesfälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen, die wiederum sekundär eine Folge einer eingeschränkten Nierenfunktion sind, hinzu. In der Studie wird außerdem die

hohe Prävalenz der CNE in der Gesamtbevölkerung, welche laut GBD auf 9,1 %, mit steigender Tendenz, geschätzt wird, was weltweit 697,5 Millionen Fällen entspricht, hervorgehoben.(1)

Neben den Auswirkungen für die Patienten spielt die CNE auch für das Gesundheitswesen eine große Rolle. Laut Ji-Cheng und Zhang (2019) liegt die Zahl der Patienten mit CNE im Endstadium (ESNE), die Nierenersatztherapie benötigen, zwischen 4,902 und 7,083 Millionen.(2) Noël und Landais (2012) zeigen, dass in Frankreich ca. 2 % der Gesundheitsausgaben für Nierenersatztherapien eingesetzt werden, obwohl diese nur 0,11 % der Bevölkerung betreffen.(3) Die jährlichen Kosten für Dialyse rangieren laut Kent et al. (2015) durchschnittlich zwischen 18.986 £ (erstes Jahr) und 23.326 £ (Folgejahre)(4). Unter diesen Gesichtspunkten präsentiert sich CNE als häufige, folgenschwere und teure Erkrankung, zu deren Pathogenese noch viele offene Fragen bestehen.

1.3.1 Nierenfibrose

Nierenfibrose ist die Bezeichnung für den pathologischen, bindegewebigen Umbau des Nierengewebes als Reaktion auf andauernde Schädigung. Sie ist das Endstadium vieler chronisch progressiver Nierenerkrankungen.(5)

Als Auslöser für Nierenfibrose kommen viele verschiedene Erkrankungen in Frage. Sowohl Glomeruli, das Tubulussystem, das Niereninterstitium als auch Nierengefäße können als primärer Angriffspunkt der Schädigung in Frage kommen; durch fortschreitende Strukturschäden werden letztendlich Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Nephritis, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose auftreten.(5) Vermittelt wird der Umbau durch die Kommunikation zwischen geschädigten Zellpopulationen, dem umliegenden Gewebe sowie dem Immunsystem. So hat eine Gewebeschädigung die Ausschüttung von immunologischen Signalstoffen zur Folge, die eine anti-fibrinolytische Koagulationskaskade initiieren und Immunzellen anlocken. Der folgende Umbauprozess beinhaltet das Beseitigen von Pathogenen und Gewebetrümmern, die Neubildung von Blutgefäßen, die Aktivierung und Rekrutierung von Myofibroblasten, die wiederum extrazelluläre Matrix (EZM) bilden und für Wundkontraktion sorgen.(6) EZM enthält viele Kollagene, Laminine und Fibronektine, die für die Zelladhäsion von großer Bedeutung sind und die Festigkeit von Geweben erhöhen.(5) Bei der physiologischen Wundheilung sollte anschließend eine Regenerationsphase folgen, im Zuge derer Narbengewebe durch funktionelles Gewebe ersetzt wird. Chronische Inflammation allerdings kann zu einer übermäßigen Ablagerung von EZM führen, die die Reparaturkapazitäten des Gewebes überfordert, ab wann man von einer Fibrose spricht, die naturgemäß chronisch fortschreitet, solange der ursprüngliche Umbaustimulus erhalten bleibt.(6) Wenn der Umbauprozess den Punkt überschreitet, an dem der Ersatz von funktionellem Gewebe durch rigides Bindegewebe den Stress für lokale, als auch entfernte, funktionell abhängige Gewebe erhöht, deren Funktion kompromittiert und so zu deren

Untergang beiträgt, ist die Fibrose perpetuierend.(5) Klinisch nimmt die Nierenfunktion ab, Quantität und Qualität des Harns sind reduziert, ausscheidungspflichtige Stoffe verbleiben im Körper und Syntheseprodukte der Niere wie Vitamin D und Erythropoetin werden in geringerer Menge gebildet. Der Ersatz von funktionellem Gewebe durch Bindegewebe lässt sich in späten Krankheitsstadien sogar makroskopisch in Form von Schrumpfung, Verhärtung und höckeriger Veränderung der Organoberfläche erkennen.

1.3.1.1 Myofibroblasten

Mit der Bildung von Kollagen in Wunden aber auch fibrösen Organen werden besonders Myofibroblasten in Verbindung gebracht, welche sowohl kontraktile Eigenschaften von glatten Muskelzellen als auch Syntheseeigenschaften von Fibroblasten vereinen. Während im Falle der Wundheilung fibrotisches Bindegewebe ebenso wie die Myofibroblasten, die es produziert haben, bei der Heilung meist weitgehend verschwinden, verbleiben sie bei der Organfibrose im Gewebe und produzieren immer größere Mengen von EZM, welche funktionelles Gewebe ersetzt und zum Organversagen beiträgt.

Lopez und Gomez (2011) und Humphreys et al. (2010) zeigen, dass in der Nephrogenese FOXD1⁺ mesenchymale Zellen als Vorläufer für Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen, Mesangialzellen und Renin-Vorläuferzellen dienen sowie auch für PDGFR β ^{+/CD73⁺/α-SMA⁻ interstitielle Perizyten, die in der fibrotischen Niere expandieren und zu α-SMA⁺ Myofibroblasten differenzieren, wobei sie den größten Anteil der gebildeten Myofibroblasten ausmachen. Diese Beobachtung macht interstitielle Perizyten zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für das Verständnis der Nierenfibrose (siehe folgendes Kapitel). In späteren Studien wurde eine mesenchymale Stammzellen (MSZ) ähnelnde perivaskuläre Zellpopulation entdeckt, die bei Gewebeschädigung stark expandierte und PDGFR β und GLI1 exprimierte. Die selektive Zerstörung von GLI1⁺-Zellen verbesserte die Fibrose im UUO-Modell (siehe 2.2.1.4.2 „Unilaterale Ureterobstruktion“), führte in der gesunden Niere jedoch zu vielseitiger Gewebeschädigung.(6–8)}

LeBleu et al. (2012) weisen als Ursprung für akkumulierende Myofibroblasten in der Nierenfibrose zwei Hauptquellen auf. Etwa 50 % bilden sich durch lokale Proliferation von Fibroblasten, etwa 35 % durch Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarksstammzellen zu Myofibroblasten unter dem Einfluss von TGF β -1 und TGF β R-2 (transforming growth factor beta (receptor)). Ein Knockout von letzterem in glatten Muskelzellen (α-SMA⁺) führte zu einer Reduktion der Myofibroblastenpopulation um 56 % und der Nierenfibrose um ca. 30 %. Weitere Hypothesen thematisieren die Metaplasie und Migration von Perizyten sowie auch Epithel- oder Endothelzellen zu Myofibroblasten, sogenannter Epi-/Endothelial-mesenchymaler Transition (EMT / EndMT). Für Perizyten konnte in der Studie kein Beitrag

zur Bildung von Myofibroblasten nachgewiesen werden, für EMT 5 % und für EndMT 10 %. Bei der Therapie der Nierenfibrose müssten also gleichermaßen Proliferation wie Differenzierung verschiedener Zellpopulationen unterbunden werden, um wirkungsvoll die Progression der Erkrankung zu verhindern.(9) Die oben erwähnte Proliferation und Differenzierung von residenten Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie deren Aktivierung, kann möglicherweise auch durch das Immunsystem erfolgen. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPS) sind Bestandteile von pathogenen Organismen wie deren Nukleinsäuren und Oberflächenmoleküle. Sie werden über Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs) erkannt, von denen Fibroblasten eine Vielzahl exprimieren. Von einer Untergruppe der PRRs, den Toll-like-Rezeptoren (TLRs), ist die Fähigkeit zur Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten bekannt.(6)

Neben der widersprüchlich beleuchteten Rolle der Perizyten wird auch die Involvierung von Adventitiazellen diskutiert. Sie stehen im Verdacht, bei hypertensiver und entzündlicher Nierenerkrankung eine Quelle für Fibrose-verstärkende Zellen darzustellen. So gehen bei ischämischer Nierenschädigung fibrotische Areale von großen Gefäßen und Gefäßbündeln aus. Im selben Modell tragen sie durch Differenzierung in perivaskuläre glatte Muskelzellen und Osteoblasten auch zur Arteriosklerose bei.(10)

Bei der Analyse der Transkriptionswege von medullären Perizyten und Myofibroblasten fällt auf, dass in der fibrotischen Niere Gene für die Zelladhäsion herunterreguliert, Gene für die Zellmigration und -proliferation heraufreguliert werden. Die Ablösung von Perizyten von Endothelzellen führt zum Untergang von Kapillaren und somit zu Hypoxie und Progression der CNE.(10)

1.3.1.2 Perizyten

Perizyten sind kontraktile Bindegewebszellen, welche zusammen mit Endothelzellen Kapillaren bilden. Sie liegen der Basalmembran außen auf. Ihre Aufgaben sind unter anderem die Regulation von Nierendurchblutung, Angiogenese, Wundheilung, Immunmodulation, die Unterstützung der Hämatopoiese, Funktion als Vorläuferzelle und Ernährung von Gewebe nach Verletzung. Untergruppen von Perizyten umfassen GLI1-exprimierende Perizyten, die zur Fibrose beitragen, Renin-produzierende Perizyten des JGA und mesangiale Zellen, die architekturelle Bestandteile des Glomerulus darstellen und eventuell zur Entwicklung von Glomerulosklerose beitragen. Renale Perizyten entstehen, wie vermutlich auch manche Myofibroblasten (siehe 1.3.1.1) aus $FOXD1^+$ mesenchymalen Vorläuferzellen, wobei die konkreten Signalwege zur Regulation dieser Differenzierung nicht gut bekannt sind. So weiß man, dass während der Entwicklung des Glomerulus, ausgelöst durch Notch-(neurogenic locus notch homologue protein)-Signale, eine Hochregulation von $PDGFR\beta$ in den unmittelbar umgebenden Zellen stattfindet, die wahrscheinlich für die Bildung von Mesangiumzellen verantwortlich sind.(10) In der Entwicklung der

Mäuseniere exprimieren Perizyten Renin nicht nur im Bereich des JGA und der Vasa afferentia sondern auch im Glomerulus, im Bereich von Tubuli und entlang Arteriolen im Cortex. Bis zum 45. Tag nach der Geburt nimmt die Zahl der Renin-produzierenden Zellen schließlich ab, bis diese nur noch im JGA zu finden sind. In Angiotensin-Knockout-Modellen ist die Verteilung der Renin-produzierenden Zellen am Tag der Geburt gleich zum Wildtyp, die Zahl der Zellen nimmt jedoch in den folgenden Tagen deutlich zu. Vom 45. bis zum 70. Tag nach der Geburt findet man eine Abnahme von Renin in Bereichen der Tubuli, dafür wird nun selbst in den Wänden der Nierenarterien Renin exprimiert. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Reninsekretion in Zellen, insbesondere Perizyten, in verschiedenen Bereichen der Niere nach Bedarf an- und abgeschaltet werden kann.(7) Darüber hinaus scheinen sogar Perizyten außerhalb der Niere unter bestimmten Bedingungen Renin bilden zu können.(8) Mehrere Studien zeigen, dass Perizyten auch als Vorläufer für MSZ dienen können, zum Teil ohne die Fähigkeit zur Sekretion von funktionellem Renin zu verlieren. Diese Entdeckung legt die Vermutung nahe, dass Perizyten regenerative Funktionen als Antwort auf Gewebeschädigung ausüben können. Studien zeigten im Tierversuch schon, dass injizierte MSC akute Nierenerkrankungen bessern können.(10)

Für die Identifizierung der Perizyten werden unter anderem die Marker PDGFR β , α -SMA und Desmin verwendet.(10)

1.4 Gap Junctions und Connexine

Gap Junctions sind Proteinkomplexe, welche zwei Zellen transmembranös verbinden. Sie bilden dabei einen Kanal, durch welchen Botenstoffe ausgetauscht werden können. Dabei kann es sich um Ionen (elektrische Kommunikation) oder kleine Moleküle (chemische Kommunikation) wie sekundäre Botenstoffe (z.B. cAMP) oder Metabolite (z.B. Glukose) handeln.

Gap Junctions werden von zwei Connexonen (auch Hemichannels) gebildet, die wiederum aus sechs röhrenförmig angeordneten Connexinen aufgebaut sind. In manchen Zellen können Connexone auch ungepaart auftreten, in welchem Fall sie eine Verbindung zwischen Zytoplasma und EZM herstellen. Die spezifischen Eigenschaften des gebildeten Kanals, wie die Durchlässigkeit, werden durch die Art der verbauten Connexine bestimmt. Der Mensch verfügt über insgesamt 21 verschiedene Connexine, Nagetiere nur über 20.(9) Ein Connexon kann sowohl aus gleichen (homotypisch) als auch aus mehreren verschiedenen Connexinen aufgebaut sein (heterotypisch), was eine große Diversität der spezifischen Eigenschaften gewährleistet. Außerdem sind Connexine vielfältig reguliert und besitzen eine Halbwertszeit von nur wenigen Stunden.

Mehreren Connexinen kommt elementare Bedeutung in verschiedenen Organsystemen zu, wie etwa bei zentralem Nervensystem, Herz, Lunge, Leber, Niere, Ovarien, Hoden, Knochen, Haut, Ohr, Retina, Linse und weiteren. Mutationen der zugrundeliegenden Gene verursachen häufig schwere

Funktionsverluste besagter Organe. Die bekannten Funktionen der Connexine reichen dabei von Zellwachstum und -differenzierung über Stammzellregulation bis hin zu Einflüssen auf die Karzinogenese.(9)

1.4.1 Connexin 40

Connexin 40 (Cx40) kommt in den meisten Organen vor allem im Gefäßendothel vor, in Herz und Niere jedoch wird Cx40 auch von anderen Zellen exprimiert. Im Herz wird Cx40 vorwiegend in den Myozyten des Erregungsleitungssystems exprimiert, im Myokard hingegen wird vorwiegend Cx43 zur Bildung von Gap Junctions synthetisiert. In der Niere wird Cx40 im intraglomerulären Mesangium gebildet.(9) Ausnahme ist hier der Glomerulus: in seinen Gefäßschlingen wird kein endotheliales Cx40 exprimiert.(11) Hervorzuheben sind auch die Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen in der Wand des Vas afferens, die ebenfalls Cx40 bilden. Sie sind nicht endothelialer, sondern myoepithelialer Natur.(12) Die Funktion dieser Zellen ist Cx40-abhängig (siehe folgendes Kapitel „Connexin 40 und renale Erkrankungen“).

1.4.1.1 Connexin 40 und renale Erkrankungen

Knockout-Modelle haben gezeigt, dass Cx40 bei der Vermittlung von Vasodilatation renaler Gefäße von Bedeutung ist, konkret vermutlich die Kommunikation zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur.(9) Die Regulation der Nierendurchblutung ist notwendig, um sowohl die konstante Versorgung renalen Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sichern, als auch um die Filtrationsfunktion zu gewährleisten. Vasokonstriktorische Signalstoffe sind Prostaglandin und Prostacyclin, Endothelin und Renin indirekt über Angiotensin II. Vasodilatatorische Signale beinhalten die Hyperpolarisation glatter Muskelzellen, Prostacyclin und NO.(11) Die Funktionsweise mancher regulatorischen Mechanismen wurde in Kapitel 1.2 „Das Nierenkörperchen und der juxtaglomeruläre Apparat“ erläutert. Verschiedene Connexine, besonders jedoch Cx40 sind elementar für die Regulation der Reninsekretion. In Cx40-Knockout-Modellen zeigen Renin produzierende Zellen nicht mehr ihre klassische Lokalisation in der Media der afferenten Arteriole, sondern erscheinen ektop lokalisiert im extraglomerulären Mesangium und im periglomerulären Interstitium. Klinische Folgen sind Deregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit erhöhter Plasmareninkonzentration und Bluthochdruck. Die therapeutische Wirksamkeit des Angiotensin-Rezeptorblockers Losartan zeigt, dass diese beiden Effekte kausal zusammenhängen.(9)

NO wird durch die endothiale NO-Synthase (eNOS) generiert, welche mit Cx40 in wechselseitiger Beeinflussung steht. Die Expression von eNOS ist in Cx40-Knockout-Modellen verringert, die eNOS selbst kann die de-novo-Synthese von Cx40 erhöhen.(11)

In mesenterialen Arterien der Ratte wurde durch die Blockierung von Cx40, in renalen Arterien der Ratte durch eine Blockierung von Cx40 und Cx43 eine Inhibition von EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) ausgelöst. EDHF ist nicht am Signalweg für die Vasodilatation mittels NO oder Prostaglandin beteiligt, bewirkt aber den gleichen Effekt. Die Ausschüttung von EDHF ist abhängig von MEJs (myoendothelial junctions), welche ihrerseits die Connexine 37, 40 und 43 exprimieren. Studien legen allerdings auch nahe, dass beim Menschen eher ein Bezug von EDHF zu Cx37 zu bestehen scheint.(11,13)

Unabhängig von der Blutdruckregulation besitzt Cx40 über die Stimulation von CD73 und die Herabregulierung von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) auch antiinflammatorischen und antithrombotischen Einfluss.(11) VCAM-1 wird von Immunzellen genutzt um aus dem Gefäßsystem zu emigrieren und lokal an der Immunreaktion teilzuhaben. Angesichts der hochgradigen Involvierung des Immunsystems nicht nur in Progression, sondern auch Regeneration der Fibrose könnte dieser Zusammenhang von besonderer Bedeutung sein. So wurde am Modell der Rattenniere entdeckt, dass beim Fortschreiten einer induzierten Glomerulonephritis die Expression von Cx40 durch intraglomeruläre Mesangiumzellen in den ersten Tagen ab-, dann jedoch erneut zunimmt und sich nach 2 Wochen normalisiert. Extraglomeruläres Cx40 sowie intra- und extraglomeruläres Cx43 blieben in der Expression stabil. Die Expression von Cx40 verlief in diesem Experiment gegenläufig zu der von α -SMA, welches mit pathologischer Proliferation von Mesangiumzellen assoziiert ist.(14)

Die homöostatische Bedeutung von Cx40 für die gesunde, wie auch die erkrankte Niere ist bei weitem noch nicht abschließend beantwortet. Jedoch lässt sich vermuten, dass Cx40 stark an der Regulation der Nierendurchblutung, der Reninsekretion und des Blutdruckes sowie der Immunreaktion in der Niere beteiligt ist.

1.5 *In-situ*-Hybridisierung mittels RNAscope®

In dieser Studie wird eine weniger weit verbreitete Analysemethode eingesetzt, deren Vorteile Geis et al. (2021) wie folgt beschreiben:

„Während die Gesamt-Expression von Connexinen in der Niere zuverlässig durch Messungen der gesamten mRNA-Häufigkeit in der Niere mittels real time PCR bestimmt werden konnte, erlaubt dieses Verfahren nicht, Connexine exakten zellulären Strukturen zuzuordnen. Die immunhistochemische Lokalisation von Connexin-Proteinen ist anfällig für Artefakte, da die Resultate entscheidend von den verwendeten Fixierungsprotokollen und der Spezifität der verwendeten Antikörper abhängen.(15)

Der RNAscope® soll in dieser Arbeit komplementär zur konventionellen Immunhistochemie eingesetzt werden, wobei die Resultate beider Methoden miteinander verglichen und so die Methoden ergänzend, insbesondere in Bezug auf die Analyse auf Protein- und mRNA-Ebene und die unterschiedliche Spezifität der Verfahren, genutzt werden können.

1.6 Versuchsdurchführung und Ziele

In der Arbeit soll Cx40 unter basalen Bedingungen lokalisiert und, mittels zellulärer Marker, der jeweils exprimierenden Zellpopulation zugeordnet werden. Dazu werden in-situ-Hybridisierung (ISH) mittels RNAscope® und Immunfluoreszenz (IF) eingesetzt, um sowohl den Ort der Expression als auch die Lokalisation des Proteins ausfindig zu machen. Anschließend sollen diese Untersuchungen auch an der fibrotischen Niere durchgeführt und die Ergebnisse verglichen werden. Zur Induktion einer Nierenfibrose wird einerseits eine Adenindiät mit chronisch entzündlicher Schädigung, zum anderen eine mechanische Schädigung durch eine unilaterale Ureterobstruktion (UUO) angewendet, beide Modelle werden unabhängig voneinander untersucht.

Daran schließt sich die Untersuchung der Frage an, ob die Deletion des Cx40-Gens in PDGFR β^+ Zellen und die daraus eventuell resultierende Unterbrechung von Signalwegen zwischen interstitiellen Perizyten und dem Gefäß- bzw. Tubulussystem einen Einfluss auf das Nierengewebe hat. Zu diesem Zweck soll in PDGFR β^+ Zellen von adulten Mäusen mithilfe eines Cre/loxP-Systems Cx40 ausgeknockt, Schnitte der Nieren histologisch mittels ISH und IF in Kombination mit zellulären Markern untersucht und mit dem Wildtyp verglichen werden. Zusätzlich soll mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Expression von zellulären Markern und anderen Connexinen zwischen Wildtyp und Cx40-Knockout verglichen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente

Instrument	Name	Hersteller
Computer	Optiplex 9020 Z6 G4 Workstation Optiplex 780 Compaq dc7600	Dell, Frankfurt am Main HP, Palo Alto, USA (Intel® Xeon® Gold 5122 CPU, NVIDIA Quadro P4000 8 GB GDDR5, 64 GB RAM, Windows 10 Enterprise 2016) Dell, Frankfurt am Main HP, Palo Alto, USA
Eismaschine		Ziegra Eismaschinen, Isenhagen
Elektrophoresekammer	Biometra Compact	Analytik Jena, Jena
Feuchtekammern		Gies, Niederaula
Filter für Mikroskopie:		
- Cy2-Filter Anregung 450 – 490 nm Emission 500 – 550 nm	Filtersatz 38 HE	Zeiss, Jena
- Cy3-Filter Anregung 538 – 562 nm Emission 570 – 640 nm	Filtersatz 43 HE DsRed	Zeiss, Jena
- Cy5-Filter Cy5-Anregung 620 – 643 nm Cy5-Emission 659 – 759 nm	Filtersatz 90 HE (Breitband)	Zeiss, Jena
- DAPI-Filter Anregung 370 – 410 nm Emission 430 – 470 nm	Filtersatz 96 HE	Zeiss, Jena
Flammenphotometer	BWB-XP	BWB Technologies, UK
Fluoreszenzlampe	Colibri 7	Zeiss, Jena

Gefrierpunktosmometer	Osmomat 030	Gonotec, Berlin
Gel-Abbildungssystem	Chemidoc™ Touch Imaging System	Biorad, München
Homogenisator	Ultra-Turrax T25	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Inkubationsschränke	HybEZ Oven Modell 300	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA Memmert, Schwabach
Kühl- und Gefrierschränke	CN 3915-20 Privileg 655.065-1 18/2T FS HERAfreeze HFU	Liebherr, Bulle, Schweiz Quelle, Fürth Quelle, Fürth ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kameras	AxioCam 506 mono AxioCam 305 color	Zeiss, Jena Zeiss, Jena
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG RCT MR Hei-Standard	IKA-Werke, Staufen im Breisgau Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Axio Observer.Z1	Zeiss, Jena
Mikroplatten-Reader	Ao Microplate Reader	azure biosystems, Dublin CA, USA
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165 Rotationsmikrotom RM2265	Leica, Wetzlar Leica, Wetzlar
Mikrowelle	R-3V12	Sharp Corporation, Sakai, Japan
PCR-Geräte	FastGene® Ultra Cycler Gradient LabCycler Lightcycler LC480	Nippon Genetics Europe, Düren Sensoquest Biomedizinische Elektronik, Göttingen Roche, Basel, Schweiz
Pipetten	- 0,5 – 10 µl	Eppendorf Research Pipetman

- 1 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl	Finnpipette	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
- 5 – 50 µl, 20 -200 µl, 200 – 1000 µl	Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
	Ovation Electronic	VistaLab Technologies, Brewster
- Pipettierserien	Single Channel	NY, USA
Pipettiergehilfe	accu-jet® pro	Brand, Wertheim
pH-Meter	pH 50+ DHS	XS Instruments, Carpi, Italien
Photometer	NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF	Millipore, Burlington, USA
Rotator	Röhrchen-Revolver/-Rotator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Schüttler	neoLabLine Digital Orbital Shaker DOS-10L	neoLab Migga, Heidelberg
Spannungsquelle für Elektrophorese	Biometra Standard Power Pack P25	Analytik Jena, Jena
Steamer	Dampfgarer 3216	Braun, Kronberg im Taunus
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Feinwaage VWR-1502 Feinwaage 2214 Analysenwaage ME	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen Mettler Toledo, Columbus, USA
Wärmeblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220 OTS 40	Leica, Wetzlar MEDITE Medical, Burgdorf
Wasserbad	AL12 1083	Lauda, Lauda-Königshofen GFL, Burgwedel
Zentrifugen	neoLabLine Zentrifuge mit Vortexer Mini Zentrifuge Z300	neoLab Migge, Heidelberg Nippon Genetics Europe, Düren Hermle Labortechnik, Wehingen

	Himac CT 15RE Centrifuge 5425	Eppendorf Himac Technologies, Hitachinaka, Japan Eppendorf, Hamburg
--	--------------------------------------	---

2.1.2 Verbrauchsgüter

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten	Sarstedt, Nümbrecht nerbe plus, Winsen
Deckgläschchen	Labonord, Mönchengladbach Roth, Karlsruhe
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Fettstift, Super PAP-Pen	Science Services, München
Fettstift, ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Gewebe-Einbettkasten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz Sarstedt, Nümbrecht VWR International, Radnor, USA
Handschuhe (Latex / Nitril)	Hartmann, Heidenheim VWR International, Radnor, USA neoLab Migge, Heidelberg
LightCycler® 480 Multiwell Platten 96	Roche, Basel, Schweiz
Mikrotestplate 96 Well, F	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm Nescofilm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	
- Unsteril, filterlos	Sarstedt, Nümbrecht
- Steril, mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
- Combitips advanced® für Multipette® plus	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich Eppendorf, Hamburg

Reagiergefäße Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht nerbe plus, Winsen
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Silikonkautschuk Paraffin-Gießformen	Roth, Karlsruhe
Tücher neoTissue	neoLab Migge, Heidelberg

2.1.3 Kits, Enzyme und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Nippon Genetics Europe, Düren
Auslaufpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard GeneRuler 100 bp	Thermo Scientific
DNA-Polymerase GoTaq, 5 U / μ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction 5x Buffer Green	
Dulbecco's PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Futter, normal und Tamoxifen-haltig	Ssniff, Soest
Glycergel mounting medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Isopropanol p.a.	Fisher Chemical, Loughborough, UK
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	Merck, Darmstadt
KH_2HPO_4	Merck, Darmstadt
Kreatin Assay Kit QuantiChrom™	BioAssay Systems, Hayward, USA
LightCycler® 480 SYBR® Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
Mix	
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Düren
NaCl	VWR International, Radnor, USA
Oligo-dT-Primer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mmol / l)	Promega, Mannheim
Pferdeserum (HS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reverse Transkriptase 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
RNAscope H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope 2.5 Multiplex Fluorescent Assay	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope Sonden	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope Target Retrieval Reagent	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope Wash Buffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
TriFast peqGOLD	VWR International, Radnor, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃)	USB Corporation, Cleveland, USA
TritonX	Roth, Karlsruhe
TSA Plus Cyanin 3 und Cyanin 5	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Urea Assay Kit QuantiChrom™	BioAssay Systems, Hayward, USA
Xylol p.a.	Honeywell, Muskegon, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Solange nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien für die folgenden Puffer und Lösungen in H₂O_{bidest} gelöst.

Agarose Gel für Genotypisierung

TAE-Puffer 1x	
Agarose	2 %
Gel-Färbemittel	0,02 %

Blockierlösung für Immunfluoreszenz

PBS-Otto	
----------	--

BSA	1 %
Pferdeserum	10 %
(TritonX	0,3 %)

NaOH für Genotypisierung

NaOH	25 mmol / l
------	-------------

Neutral-Buffered-Formalin-(NBF)-Fixationslösung, für Perfusion, pH 7,0

Phosphate-Buffered-Saline (PBS)	
Paraformaldehyd	3 %

Paraformaldehyd-Fixationslösung, für Perfusion, pH 7,4

Dulbecco's PBS	
Paraformaldehyd	3 %

PBS-„Otto“-Puffer, pH 7,4

K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	10 mmol / l
KH ₂ PO ₄	5 mmol / l
NaCl	140 mmol / l

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

Tris	40 mmol / l
Essigsäure	20 mmol / l
EDTA	1 mmol / l

Tris/EDTA Puffer, pH 8,5

Tris	10 mmol / l
EDTA	1,27 mmol / l

Tris-HCl, pH 8,0, für Genotypisierung

Tris	1 mol / l
------	-----------

2.1.5 Genotypisierung

Name	Sequenz
Cx40 flfl s	5'-GTT AGA ATC AAC TCA C-3'
Cx40 flfl as	5'-GCA GCT AGA GTA GGT C-3'
PDGFR-Cre ⁺ s	5'-GCC TGC ATT ACA CCG A-3'
PDGFR-Cre ⁺ as	5'-GTG GCA GAT GAC CAT T-3'

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
ms-anti- α -SMA-IgG	Monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	1 : 400
gt-anti-CD31-IgG	Polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1 : 200
rb-anti-Cx40-IgG	Polyklonal	Biotrend Chemikalien, Köln	1 : 100
gt-anti-Desmin-IgG	Polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1 : 100
gt-anti-Integrin-8-IgG	Polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1 : 200
rb-anti-Kollagen-I-IgG	Polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1 : 400
rb-anti-Kollagen-III-IgG	Polyklonal	Acris Antibodies, Hiddenhausen	1 : 400
ch-anti-Renin-IgG	Polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1 : 400
rb-anti-Tenascin-IgG	Monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	1 : 200

Sekundärantikörper	Konjugation	Nummer	Hersteller	Verdünnung
dk-anti-gt-IgG	Cy2	705-485-147		1 : 400
dk-anti-ms-IgG	Cy2	715-545-150		

dk-anti-rb-IgG	Cy2	711-545-152	Jackson	
dk-anti-ch-IgG	Cy3	703-025-155	ImmunoResearch	
dk-anti-gt-IgG	Cy3	705-515-147	Laboratories, USA	
dk-anti-rb-IgG	Cy3	711-165-152		
dk-anti-gt-IgG	Cy5	705-605-147		
dk-anti-ms-IgG	Cy5	715-605-150		

2.1.7 RNAscope®-Sonden für in-situ-Hybridisierung

Alle verwendeten Sonden waren für die Untersuchung der Spezies Hausmaus (*mus musculus*) bestimmt und wurden von ACD ausgeliefert.

Name der Sonde	Gen	Sondentyp	Katalog-Nr.
RNAscope® Probe – Mm-Gja5	Gja5 (Cx40)	Channel 1	518041
RNAscope® Probe – Mm-Gja5-C2	Gja5 (Cx40)	Channel 2	518041-C2
RNAscope® Probe – Mm-Ren1-scramble	Ren1 (Renin)	Channel 1	563411
RNAscope® Probe – Mm-Acta2-C2	ACTA2 (α -SMA)	Channel 2	319531-C2
RNAscope® Probe – Mm-Pecam1-C2	PECAM1 (CD31)	Channel 2	316721-C2
RNAscope® Probe – Mm-Pdgfrb-C2	PDGFRB	Channel 2	411381-C2
RNAscope® Probe – Mm-Col1a1-C2	COL1A1 (Kollagen 1 α 1)	Channel 2	319371-C2
RNAscope® Probe – Mm-Fn1-C2	FN1 (Fibronectin)	Channel 2	316951-C2
RNAscope® Probe – Mm-Tnc-C2	TNC (Tenascin)	Channel 2	465021-C2
RNAscope® Probe – Mm-Adgre1-C2	Adgre1 (F4/80)	Channel 2	460651-C2

Als Fluorophore wurden die TSA® Plus Fluorophore Cy3 und Cy5 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) verwendet.

2.1.8 Software und Internetdienste

Art	Name
Bildbearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop, Adobe Inc., San José, USA

	GNU Image Manipulation Program, GIMP Developement Team Zen 3.0 (blue edition), Zeiss, Jena
Literaturverwaltungsprogramm	Zotero, Roy Rosenzweig Center der George Mason University, Fairfax, USA
Mikroskopiesoftware	Zen 3.0 (blue edition), Zeiss, Jena
Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Word, Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

2.2.1.1 Mäusestämme und Zucht

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den „Guidelines for the care and use of laboratory animals“ der National Institutes of Health durchgeführt und von lokalen Tierschutzbehörden genehmigt.

Gemäß diesen Vorschriften wurden bei der Mäusehaltung die folgenden Parameter stets eingehalten: Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall von 12 h, stets freier Zugang zu Futter und Wasser.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- 1) Wildtyp-Mäuse mit C57Bl/6 als genetischen Hintergrund
- 2) $\text{PDGFR}\beta^{\text{Cre}+} \text{Cx40}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse

Die Abkürzung fl/fl („flox flox“) beschreibt die beidseitige Flankierung des jeweiligen Gens durch loxP-DNA-Sequenzen (locus of X-over P1), bei welchen es sich wiederum um 34 Basenpaare lange Sequenzen handelt, die dem Bakteriophagen P1 entstammen. Die loxP-Sequenz besteht aus zwei Erkennungsregionen und einer dazwischenliegenden Spacer-Region und dient als Bindungsstelle für die Cre-Rekombinase (von engl. *cyclization recombination*). Letztere schneidet die loxP-Sequenzen und fügt die DNA-Stränge ohne das gefloxe (*floxed*, von engl. *flanked by loxP*) Gen erneut zusammen. Die Cre-Rekombinase ist zuerst inaktiv und wird durch Bindung von Tamoxifen aktiviert.

Die Cre-Rekombinase kann hinter dem Promoter eines beliebigen Gens exprimiert werden, woraufhin die Expression der Cre-Rekombinase der spezifischen Expression des jeweiligen Gens folgt. So lässt sich durch die Wahl des Promoters die Aktivität der Cre-Rekombinase in verschiedenen Geweben steuern.

Durch die Kopplung der Expression von Cre-Rekombinase und PDGFR β (platelet derived growth factor receptor β) lässt sich Cx40 spezifisch in mesenchymalen Zellen zu einem beliebigen Zeitpunkt ausknocken.

2.2.1.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgt über den Verdau von Gewebe mit anschließender PCR. Geprüft werden zwei genetische Kriterien: das Vorhandensein des geflochtenen Cx40-Gens und das Vorhandensein des Cre-Rekombinase-Gens hinter dem PDGFR β -Promoter. Die Merkmale werden durch separate PCR-Durchläufe geprüft, wobei sich nur das PCR-Programm unterscheidet.

Zeitgleich mit der Kennzeichnung der Mäuse mittels Ohrmarke wird eine Gewebeprobe aus dem Ohr gestanzt. Das Gewebe wurde für 1 h in 100 μ l NaOH (25 mmol / l) bei 96 °C im Wärmeblock verdaut. Anschließend wurde die Probe gevortext und der Verdau mit 10 μ l Tris-HCl (1 mol / l, pH 8) gestoppt. Das Gemisch erneut gevortext und für 6 min bei 10.000 U / min zentrifugiert.

PCR-Gemisch (ad. 25 μ l mit H₂O_{bidest})

13,7 μ l	H ₂ O _{bidest}
2 μ l	Überstand aus Verdau
1 μ l (jeweils)	Primer (10 mmol / l)
2 μ l	dNTPs (25 mmol / l)
5 μ l	GoTaq Puffer
0,3 μ l	GoTaq Polymerase

Prüfung auf Cx40-fl/fl-Genotyp

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	5 min	Aktivierung
36	94 °C	45 s	Denaturierung
	60 °C	45 s	Anlagerung
	72 °C	45 s	Elongation
1	72 °C	10 min	Elongation
1	4 °C	∞	Lagerung

Prüfung auf PDGFR β -Cre⁺-Genotyp

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase

1	94 °C	5 min	Aktivierung
36	94 °C	30 s	Denaturierung
	70 °C	30 s	Anlagerung
	72 °C	60 s	Elongation
1	72 °C	5 min	Elongation
1	4 °C	∞	Lagerung

Für beide Programme wurden die Cycler auf die für die Aktivierung der Polymerase erforderliche Temperatur vorgeheizt.

Zur Analyse der PCR wurde je 12 µl PCR-Gemisch auf einem 2 % Agarosegel aufgetragen und durch horizontale Elektrophorese bei 120 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Es erfolgte ein Abgleich mit Positiv- und Negativkontrollen.

2.2.1.3 Connexin-40-Knockout in mesenchymalen Zellen durch Gabe von Tamoxifen

Wie unter 2.2.1.1 beschrieben, exprimiert der Genotyp Cx40 fl/fl PDGFRβ-Cre⁺ unter Kontrolle des PDGFRβ-Promoters eine Cre-Rekombinase, welche durch Gabe von Tamoxifen induziert wird und das Cx40-Gen aus dem DNA-Strang schneidet. Tamoxifen-haltiges Futter wurde 7 Mäusen im Alter von 8 Wochen über 3 Wochen verabreicht, gefolgt von 2 Wochen normaler, wirkstofffreier Diät.

2.2.1.4 Induzierte Nierenfibrose

Um Connexin 40 in der fibrotischen Niere zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Methoden der Fibroseinduktion gewählt.

2.2.1.4.1 Adenin-induzierte Nephropathie

Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter wurde im Alter von **8-12** Wochen über 3 Wochen Adenin-haltiges Futter verabreicht, gefolgt von **3** Wochen normaler Diät. Darauf folgte die Entnahme der Nieren zur Untersuchung (siehe 2.2.2). Diese Methode ahmt die beim Menschen auftretenden Formen der kristall-induzierten Nephropathie besonders gut nach. Adenin-induzierte Nephropathie befördert wie CNE die Schädigung des Herz-Kreislaufsystems.(16)

2.2.1.4.2 Unilaterale Ureterobstruktion

Bei Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter wurde im Alter von **8-12** Wochen eine einseitige Ureterligatur durchgeführt. Die dem ligierten Ureter zugehörige Niere wird als ipsilaterale (il) Niere bezeichnet, die andere als kontralaterale (cl) Niere. Es wird davon ausgegangen, dass unilaterale Ureterobstruktion die chronisch-obstruktive Nierenerkrankung des Menschen in beschleunigter Form imitiert.(17)

Das beschriebene Prozedere zur Ureterligatur wurde von Mitarbeitern durchgeführt, die zu derartigen Eingriffen berechtigt sind, nicht vom Autor dieser Arbeit. Die Mäuse wurden mit 4 % Isofluran inhalativ anästhesiert, nachdem sie 1 h Stunden zuvor mit 0,1 mg / kg Buprenorphin subkutan analgesiert wurden. Für die gesamte Dauer des Eingriffs waren die Tiere auf einer Wärmeplatte bei 37 °C fixiert und erhielten über eine Inhalationsmaske ein Gemisch aus 1-4% Isofluran und Sauerstoff. Nach einer lokalen Rasur wurde die Bauchdecke über eine kleine kraniokaudale Inzision eröffnet und der linke Ureter dargestellt, um ihn mit einem doppelten, wechselseitigen chirurgischen Knoten zu ligieren. Das Peritoneum wurde mit Faden, die Haut mit Klammern jeweils separat verschlossen. Im Anschluss wurden die Mäuse in Einzelkäfige gesetzt, für die folgenden 2 h beobachtet und jeden folgenden Tag auf Wohlsein überprüft.

2.2.2 Retrograde arterielle Perfusion

Die retrograde arterielle Perfusion wurde ebenfalls von Mitarbeitern durchgeführt, die zu derartigen Eingriffen berechtigt sind, nicht vom Autor dieser Arbeit. Um das Nierengewebe für die sich anschließenden histologischen Färbemethoden zu fixieren, wurde die Maus entweder mit 3 % Paraformaldehyd für Immunfluoreszenz (IF) oder mit 10 % NBF für in-situ-Hybridisierung (ISH) perfundiert:

Die Mäuse wurden 1 h vor dem Eingriff mit 0,1 mg / kg Buprenorphin subkutan analgesiert, während des Eingriffs erfolgte die inhalative Anästhesie mit einem 1- bis 4-prozentigen Isofluran-Sauerstoff-Gemisch. Die Peritonealhöhle wurde eröffnet und die Bauchaorta dargestellt. Die rechte Nierenarterie wurde ligiert, um das Gewebe für RNA-Isolierung zu erhalten. Die Aorta wurde unterhalb der Abgänge beider Nierenarterien abgeklemmt und unterhalb der Klemme durchtrennt. Mithilfe eines Dilatators wurde ein Katheter in die Aorta eingeführt und in der dort befindlichen Klemme fixiert. Die Vena cava inferior wurde zur Druckentlastung ebenfalls durchtrennt.

Durch den Katheter wurden 40 ml Fixationslösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 13 ml / min geleitet. Anschließend wurde die ligierte rechte Niere entfernt, transversal halbiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Benutzung wurde dieses Gewebe bei -80 °C gelagert. Die linke Niere wurde ebenfalls entfernt, transversal halbiert und entweder in 70 % Methanol bei 4 °C (IF) oder unter Rotation in NBF bei Raumtemperatur (RT) (ISH) für 16 – 24 h gelagert. Daran anschließend folgte die Einbettung in Paraffin.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 *Einbettung der Nieren in Paraffin*

Zur Fixation des Gewebes wurden die Nierenhälften in Gewebe-Einbettkästen überführt, in einer aszendierenden Alkoholserie dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Zeit, Temperatur	Immunfluoreszenz	In-situ-Hybridisierung
1 x 30 min, RT	70 % Methanol p.a.	70 % Ethanol p.a.
2 x 30 min, RT	80 % Methanol p.a.	80 % Ethanol p.a.
2 x 30 min, RT	90 % Methanol p.a.	90 % Ethanol p.a.
2 x 30 min, RT	100 % Methanol p.a.	100 % Ethanol p.a.
2 x 30 min, RT	100 % Isopropanol p.a.	100 % Isopropanol p.a.
1 x 30 min, 45 °C	100 % Isopropanol p.a.	100 % Isopropanol p.a.
1 x 30 min, 60 °C	1:1 100 % Isopropanol p.a. / Paraffin	1:1 100 % Isopropanol p.a. / Paraffin
2 x 24 h, 60 °C	Paraffin	Paraffin

Im Anschluss an das Protokoll wurden die Nierenhälften mit der Schnittfläche nach unten mittig in würfelförmige Silikonformen mit flüssigem Paraffin eingebettet. Das Paraffin härtete über mehrere Tage bei RT aus. Die entnommenen Paraffinblöcke wurden bei RT gelagert.

2.2.3.2 Schneiden der Nieren

Die in Paraffinblöcken eingebetteten Nieren wurden mit Rotationsmikrotomen in 5 µm dicke Schnitte zerteilt, welche zur vollständigen Entfaltung in ein Wasserbad von 42 °C überführt wurden. Anschließend wurden jeweils 3 (IF) bzw. 2 (ISH) Schnitte mit einem SuperFrost®-Plus-Objekträger und einem Pinsel aus dem Wasserbad aufgesammelt und für mindestens 1 h bei RT getrocknet.

2.2.3.3 Immunfluoreszenz

Die trockenen Schnitte wurden an Tag 1 zuerst mittels einer Lösungsmittelserie entparaffiniert, eventuell durch Kochen demaskiert, blockiert und mit dem primären Antikörper inkubiert. An Tag 2 erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper.

Zeit	Lösung
2x 15 min	Xylol
1 min	100 % Isopropanol
Jeweils wiederholtes Tauchen bis zum Verschwinden der Schlieren	96 % Isopropanol
	80 % Isopropanol
	70 % Isopropanol
	H ₂ O _{bidest}

Anschließend wurden die Schnitte 3x für je 5 min in PBS-Otto gewaschen.

Falls im Präparat Connexin 40 angefärbt werden sollte, wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung für 45 min in Tris/EDTA unter stetigem Schwenken gekocht und danach für 30 min bei RT abgekühlt. Es folgten 2x waschen der Schnitte in PBS-Otto und 1x in H₂O_{bidest} für je 5 min.

Die Objektträger wurden in Feuchtekammern transferiert, wo die Schnitte mit Fettstift umrandet wurden, ohne jedoch die Schnitte selbst zu berühren. Jeder Schnitt wurde dann mit Blockierlösung bedeckt, welche im Falle der Anfärbung von Connexin 40 zusätzlich Triton X enthielt, und für 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert.

Im Anschluss wurde die Blockierlösung von zwei von drei abgesaugt und durch eine Lösung der primären Antikörper in entsprechender Blockierlösung ersetzt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

An Tag 2 wurden die Schnitte 3x für 5 min in PBS-Otto gewaschen und alle Schnitte mit einer Lösung der sekundären Antikörper in entsprechender Blockierlösung bedeckt und für 90 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 2x in PBS-Otto und 1x in H₂O_{bidest} für je 5 min gewaschen und eingedeckelt.

Durch die Inkubation von lediglich zweien der drei Schnitte auf einem Objektträger mit primärem Antikörper entsteht ein Negativpräparat, an welchem erkennbar ist, ob der sekundäre Antikörper mit dem Präparat selbst interagiert bzw. ob das Präparat natürliche, nicht durch Farbstoffe vermittelte Fluoreszenzen aufweist.

2.2.3.4 *In-situ-Hybridisierung mittels RNAscope® Technik*

Die trockenen Schnitte wurden an Tag 1 entparaffiniert und Antigene durch Kochen demaskiert. An Tag 2 werden die Sonden eingebracht und das Fluoreszenzsignal entwickelt. Die Prozedur erfolgte gemäß dem Protokoll für RNAscope®, sowie den entsprechenden Kits von ACD.

Nach dem Schneiden und Trocknen der Präparate über mindestens 1 h bei RT wurden die Objektträger für 1 h bei 60 °C in vertikaler Position inkubiert, um die Entparaffinierung zu begünstigen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min bei RT in Xylolküvetten, dann zweimal für jeweils 1 min in Ethanolküvetten getaucht. Die Schnitte wurden bei RT für 5 min getrocknet, bevor jeder Schnitt mit RNAscope® H₂O₂ bedeckt und für 10 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden alle Schnitte erst in H₂O_{bidest} gewaschen, ebenfalls in H₂O_{bidest} für 10 s auf 99 °C akklimatisiert und schließlich für 15 min in Target-Retrieval-Lösung gekocht. Danach wurden die Schnitte mit H₂O_{bidest} und Ethanol gewaschen, mit Fettstift umkreist, ohne die Präparate zu berühren, und über Nacht getrocknet.

An Tag 2 wurden die Schnitte zwischen jedem Arbeitsschritt 2x für jeweils 2 min in RNAscope® Waschpuffer gewaschen. Zu Beginn wurden die Präparate für 10 min bei RT mit RNAscope® Protease

Plus angedaut, wonach die entsprechenden Sondengemische aufgetragen wurden, welche an die jeweilige mRNA binden. Anschließend wurden die Schnitte nach Protokoll des Herstellers mit AMP1, AMP2, AMP3, HRP-C1- und HRP-C2-Fluorophor inkubiert, wobei die Vorschriften zur Vorbereitung der Fluorophore, Abschirmung von Licht sowie zu Waschschritten beachtet wurden. Zuletzt wurde auf jedem Schnitt für wenige Sekunden DAPI aufgetragen, abgewaschen und die Schnitte mit ProLong Gold Antifade Mountant abgedeckelt. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei 2-8° gelagert.

2.2.3.5 *Mikroskopie*

Alle Präparate wurden mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 mit motorisiertem Objekttisch unter Verwendung der dazugehörigen Software ZEN 3.0 (blue edition) fotografiert. Bei allen mehrfarbigen Aufnahmen wurde jeder Kanal einzeln mit entsprechendem Filter (siehe 2.1.1 Instrumente) als schwarz-weiß-Bild aufgenommen. Die Kanäle wurden in ZEN zusammengefügt und mit artifiziellen Farben versehen.

Alle Übersichtsaufnahmen von Nieren wurden mittels der Kachelautomatik von ZEN erstellt. Dabei wurde das Präparat manuell mit Fokuspunkten versehen und automatisch in Kacheln unterteilt, die je mit 20-facher Vergrößerung automatisch fotografiert und automatisch zusammengefügt wurden. Ein ebenfalls dem Programm zugehöriger Algorithmus überarbeitete anschließend die entstandenen Berührungs punkte der Kacheln (stitching).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in zwei Hauptabschnitte unterteilt, von denen sich einer mit der Lokalisation von Cx40 in der gesunden und einer mit der Lokalisation von Cx40 in der fibrotischen Niere beschäftigt.

3.1 Lokalisation von Cx40 in der gesunden Niere

Hierzu wurde zunächst die Cx40 mRNA mittels RNAscope® Technik analysiert.

Abbildung 1 zeigt die Expression von Cx40-mRNA in der basalen WT-Niere. Diese ist am stärksten im Cortex, insbesondere im juxtaglomerulären Apparat, in unmittelbarer Nähe der Glomeruli in der Nierenrinde, sowie in den Gefäßwänden der gut identifizierbaren großlumigen Gefäße. Die Cx40 Expression in äußerer und innerer Medulla zeigt sich deutlich schwächer und erscheint relativ homogen über diese Bereiche verteilt. Die zugrundeliegende anatomische Struktur geht aus diesen Übersichtsabbildungen nicht hervor.

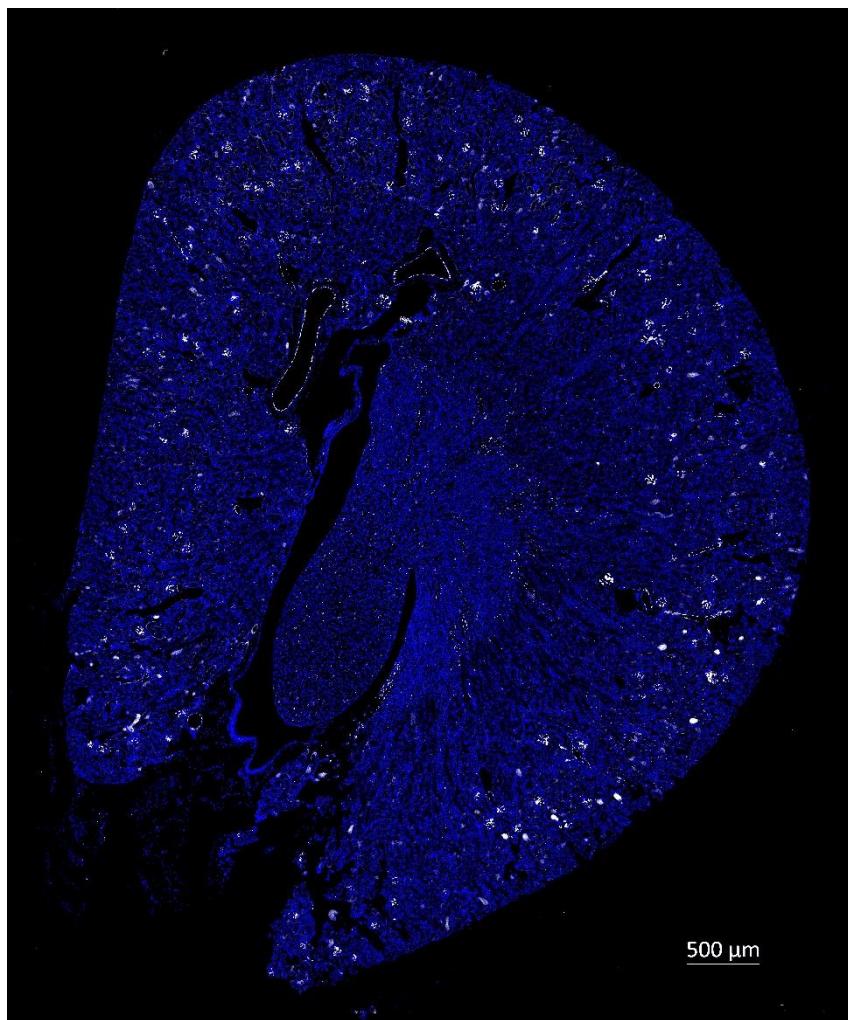


Abbildung 1: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (weiß) und DAPI (blau). Cx40-mRNA tritt gehäuft in den im Cortex befindlichen Glomeruli und entlang von Gefäßen auf. Im Mark wird die RNA gleichmäßig und schwächer exprimiert.

Im Folgenden soll in Co-Hybridisierungsanalysen die Zuordnung der Expression von Cx40-mRNA zu den verschiedenen renalen Strukturen mit Hilfe spezifischer Marker erfolgen.

3.1.1 Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen

Zunächst wurde mittels Co-Lokalisierungsstudien die Expression von Cx40-mRNA in den renalen Gefäßen betrachtet. Die Co-Hybridisierung von Cx40 und dem Endothelmarker CD31 (Abbildung 2) zeigte eine deutliche Überlagerung beider Signale im Endothel der großen renalen Arterien, aber auch in den endothelialen Zellen der afferenten Gefäße (s. linkes u. mittleres Detail aus Abb.2). Die Kapillarschlingen des Glomerulus hingegen zeigten keine Cx40-Expression (s. linkes Detail aus Abb. 2). Im äußeren und inneren Mark war nur eine schwache Expression von Cx40 mRNA detektierbar. Die Hybridisierungssignale traten dabei ausschließlich co-lokalisiert mit CD31 auf und sind damit am ehesten den Vasa recta zuzuordnen.

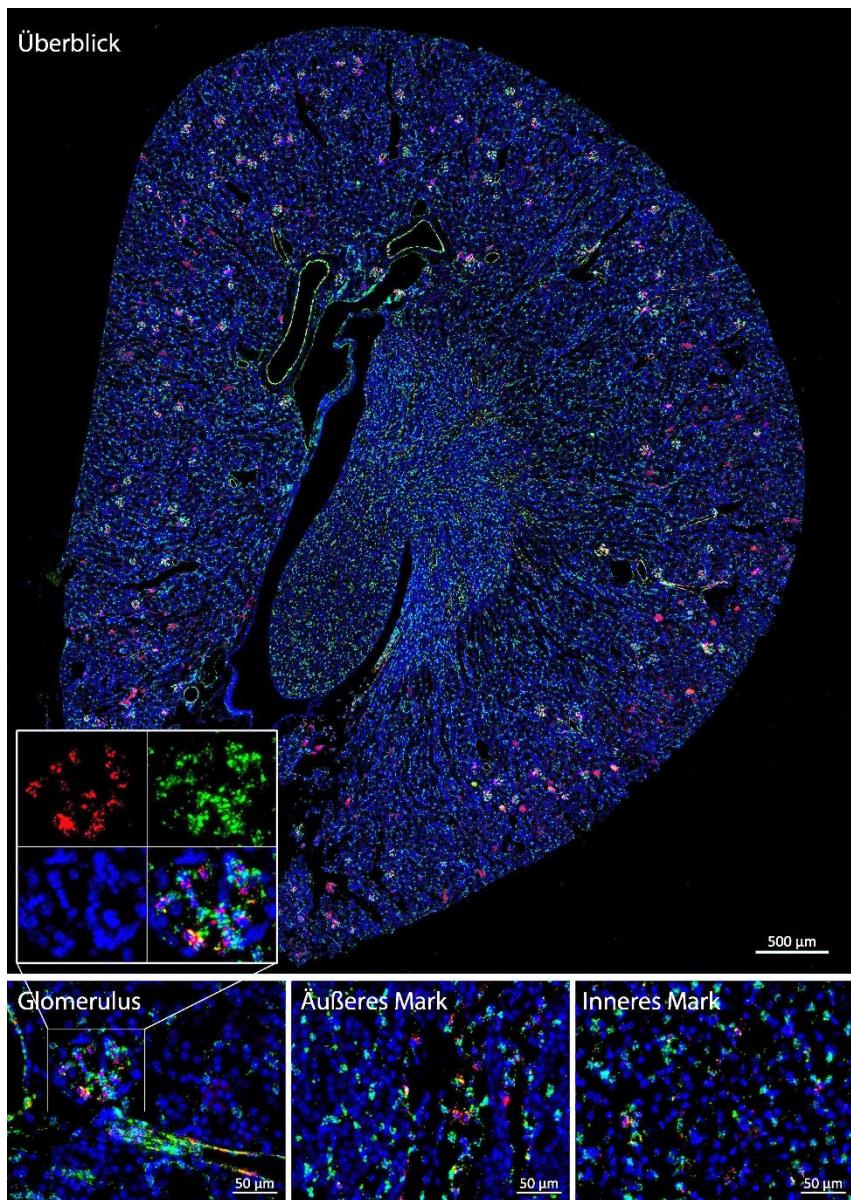


Abbildung 2: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (rot), CD31 (grün) und DAPI (blau). Eine klare Co-Expression von Cx40- und CD31-mRNA ist in den endothelialen Zellen der renalen Gefäße im Cortex, äußerem Mark und innerem Mark zu finden. Endothelzellen im Glomerulus weisen keine Cx40-Expression auf.

Um zu überprüfen, ob neben den endothelialen Zellen auch die glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media Cx40-mRNA aufweisen, wurde die Cx40 Sonde mit einem klassischen Marker für glatte Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten, α -SMA, co-hybridisiert und dessen Expression auf mRNA-Ebene in der Niere mit der von Cx40 in Abbildung 3 verglichen. Beide mRNAs zeigen sich zwar wie erwartet oft eng benachbart, zu einer Überlagerung beider Signale kommt es jedoch nur im Bereich der Renin-produzierenden myoepithelialen Zellen des JGA. Keine Überlagerung findet in der Tunica media renaler Gefäße oder im renalen Interstitium statt.

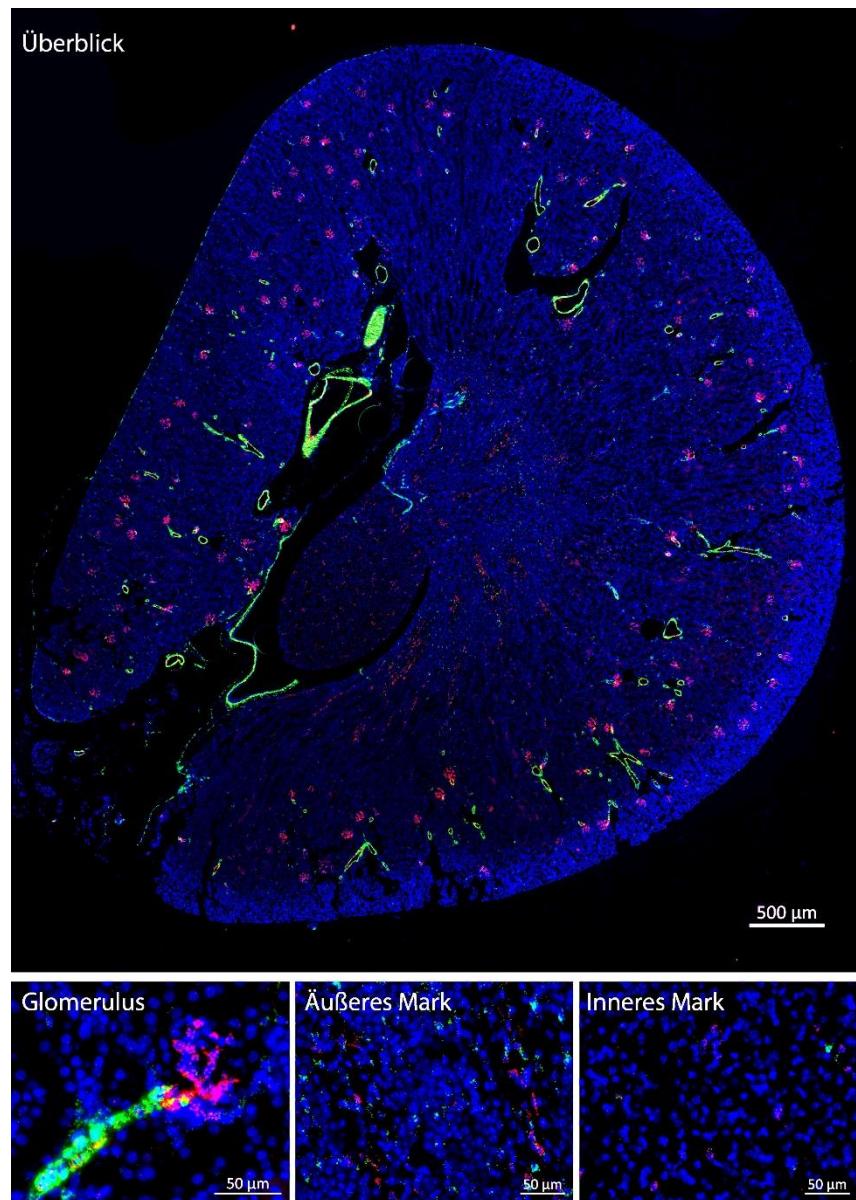


Abbildung 3: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (rot), α -SMA (grün) und DAPI (blau). α -SMA-mRNA wird in großer Menge durch Zellen der Gefäßwand und in geringerer Menge durch Zellen im Interstitium exprimiert. Außer den Reninproduzierenden juxtapleuralen Zellen exprimiert jedoch keine dieser Zellen gleichzeitig auch Cx40-mRNA.

Neben der Cx40-mRNA-Expression in basalen Wildtyp-Nieren sollte in dieser Arbeit auch die Proteinexpression und die zelluläre Zuordnung durch Markerproteine in immunhistochemischen Analysen untersucht werden.

Abbildung 4 zeigt in einer Dreifach-Immunfluoreszenzaufnahme die Expression von Cx40, CD31 und α -SMA auf Proteinebene. Im Glomerulus liegen Endothel- und Mesangiumzellen sehr eng an, sodass es stellenweise zu einer Überlagerung von Cx40 und CD31 kommt, allerdings findet diese eher zufällig und nicht systematisch statt, was bedeutet, dass die beiden Markerproteine nicht durch dieselben Zellen

exprimiert werden. Im Endothel des dem Glomerulus benachbarten Gefäßes hingegen sieht man deutlich die Co-Lokalisation beider Proteine. Im äußeren Mark exprimieren alle Cx40-reichen Strukturen auch CD31, im inneren Mark handelt es sich bei den Cx40-Signal-reichen Strukturen angesichts der fehlenden Co-Lokalisation mit CD31 oder α -SMA vornehmlich nicht um Gefäße. Glatte, α -SMA-positive Gefäßmuskelzellen sind zwar eng mit Gefäßen assoziiert, eine Co-Expression von Cx40 und α -SMA ist aber auch auf Proteinebene nur in den myoepithelialen juxtaglomerulären Zellen erkennbar.

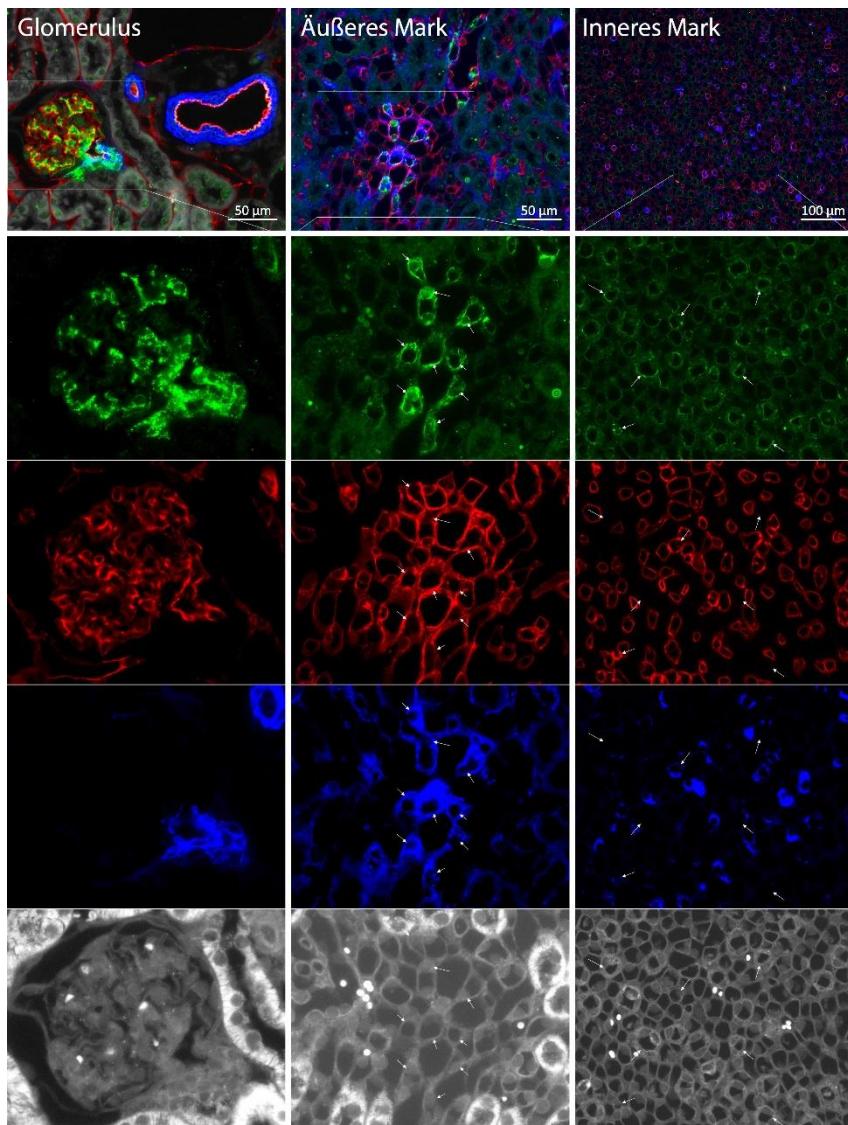


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (grün), CD31 (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Cx40 und CD31 sind im intraglomerulären Endothel nicht co-lokalisiert, im Endothel des äußeren Marks sind sie co-lokalisiert. Im inneren Mark sind Cx40-Protein-Signale teilweise ohne CD31-Co-Expression zu sehen. α -SMA wird durch zusammen mit Cx40 durch juxtaglomeruläre Renin-Zellen gebildet.

Die *in-situ*-Hybridisierung mittels RNAscope® und die immunhistochemische Färbung stimmen darin überein, dass Cx40 und CD31 im intraglomerulären Endothel nicht co-lokalisiert ist. Beide Methoden

stellen eine Co-Lokalisation im Endothel der extraglomerulären Gefäße von Rinde und äußerem Mark dar. Die Ergebnisse beider Analysemethoden unterscheiden sich im Inneren Mark, wo laut ISH ebenfalls beide mRNA-Signale co-lokaliert sind, also Cx40-mRNA nur durch das Endothel exprimiert wird, während die IF Cx40-Protein ohne Co-Lokalisation mit CD31 darstellt.

3.1.2 Cx40-Lokalisation in Mesangium und Interstitium

In einem weiteren Versuch wurde die Expression von Cx40-mRNA in Mesangialzellen und interstitiellen Zellen mit dem Zellmarker für mesenchymale Zellen, PDGFR β , in der basalen Niere überprüft. In den Glomeruli überlagern sich beide mRNA-Signale deutlich, interstitielle PDGFR β -positive Zellen exprimieren hingegen kein Cx40. Im Bereich der Gefäße liegen Signale für Cx40 und PDGFR β in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft, da Cx40 im Gefäßendothel (s. Abbildung 2) und PDGFR β in Perizyten exprimiert wird.

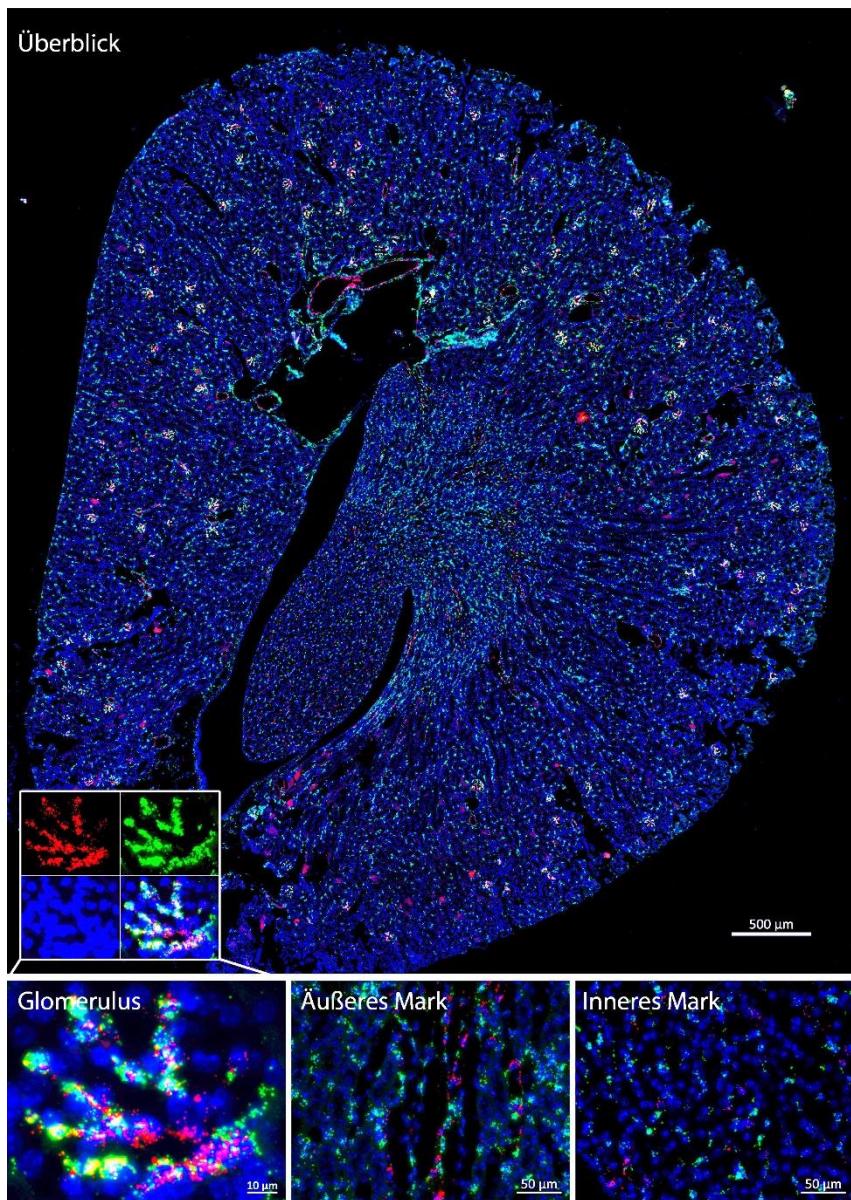


Abbildung 5: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (rot), PDGFR β (grün) und DAPI (blau). In intraglomerulären Mesangiumzellen wird gleichermaßen Cx40- und PDGFR β -mRNA exprimiert. Beide mRNA-Signale tauchen auch in extraglomerulären Gefäßwänden auf, exprimiert werden die beiden mRNAs dort jedoch in unterschiedlichen Zellen.

Abbildung 6 zeigt die Proteinexpression von Cx40 und Integrin (ITGA8), ebenfalls einem Marker für mesenchymale Zellen. Die Co-Lokalisation beider Proteine im intraglomerulären Mesangium stellt sich deutlich dar. Beide Signale erscheinen auch im Bereich des Vas afferens, wobei ITGA8 „außen aufliegend“ erscheint, wie von Perizyten zu erwarten.

Im äußeren Mark zeigt sich dank des Durchlichtkanals (weiß) und der flächigen Farbsignale erneut ein Phänomen, das in der ISH nicht zu beobachten war: während das Gewebe im Querschnitt aus einer Vielzahl von zirkulären Strukturen besteht, erscheinen diese Strukturen bereichsweise dick- (peripher)

oder dünnwandig (mittig in der Abbildung), wobei es sich respektiv um Gefäße und Tubuli handeln könnte. Das lichtmikroskopische Erscheinungsbild der dünnwandigen Hohlstrukturen entspricht dem von Gefäßen, den Vasa recta, deren Endothel Cx40 exprimiert. Allerdings stellt sich auch in einigen der restlichen, dickwandigeren Hohlstrukturen Cx40 dar. Ob es sich dabei um Gefäße oder Tubuli handelt, lässt sich anhand dieses Präparats nicht mit Sicherheit feststellen. Im inneren Mark sind wie zuvor in Abbildung 4 mehrere Hohlstrukturen mit Cx40-Protein-Expression in der Wand sichtbar, wobei sich auch hier nicht sicher feststellen lässt, um was für eine anatomische Struktur es sich handelt. In beiden Zonen des Markes zeigen die kombinierten Aufnahmen in der ersten Zeile der Abbildung, dass die Signale von ITGA8 denen von Cx40 außen anliegen und keine systematische Co-Lokalisation auftritt.

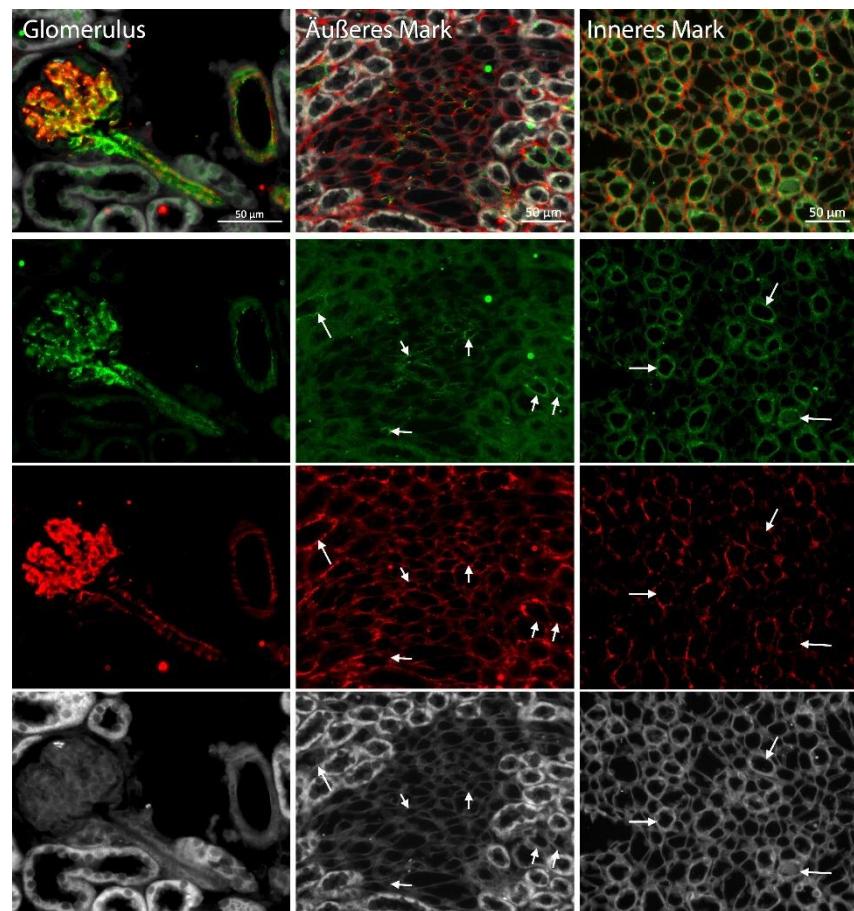


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (grün), ITGA8 (rot) und Durchlicht (weiß). Im intraglomerulären Mesangium sind Cx40 und ITGA8 co-lokalisiert, der Gefäßwand liegt ITGA8 außen auf. Von den vielen ringförmigen Strukturen im Mark, bei denen es sich um Querschnitte von Gefäßen und Tubuli handeln könnte, enthalten einige Cx40-Signale in ihrer Wand, andere nicht.

3.1.3 Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen

Abbildung 7 zeigt, dass myoepithiale juxtaglomeruläre Renin-bildende Zellen Cx40-mRNA exprimieren. Im Verlauf der Experimente wurde ein weiterer RNAscope® für Renin- und PDGFR β -mRNA in der basalen Niere angefertigt (Abbildung 8), bei dem ebenfalls, wenn auch nur vereinzelt und gering

ausgeprägt, eine Expression von Renin-mRNA in PDGFR β^+ Zellen des Interstitiums des äußeren Marks beobachtet wurde.

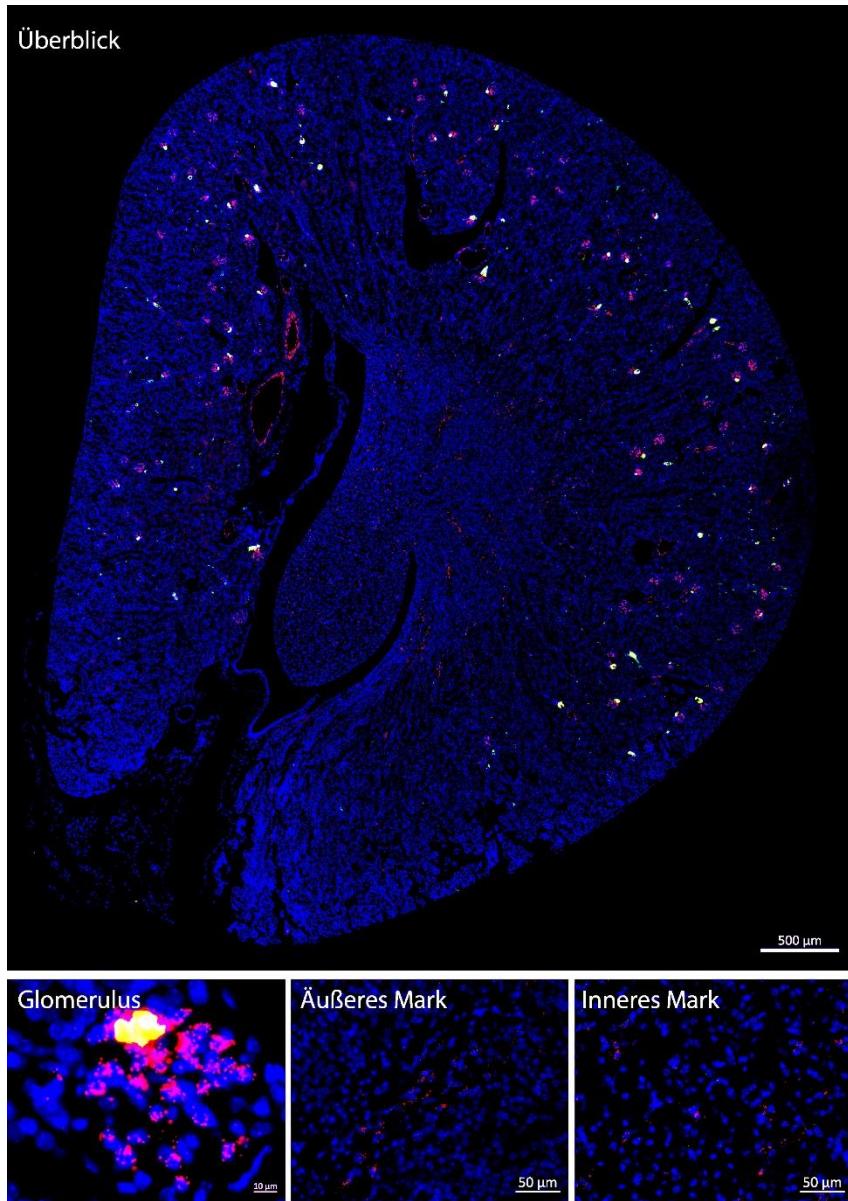


Abbildung 7: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (rot), Renin (grün) und DAPI (blau). Die Signale für Cx40 und Renin überlagern sich an der Basis des Glomerulus zu gelb.

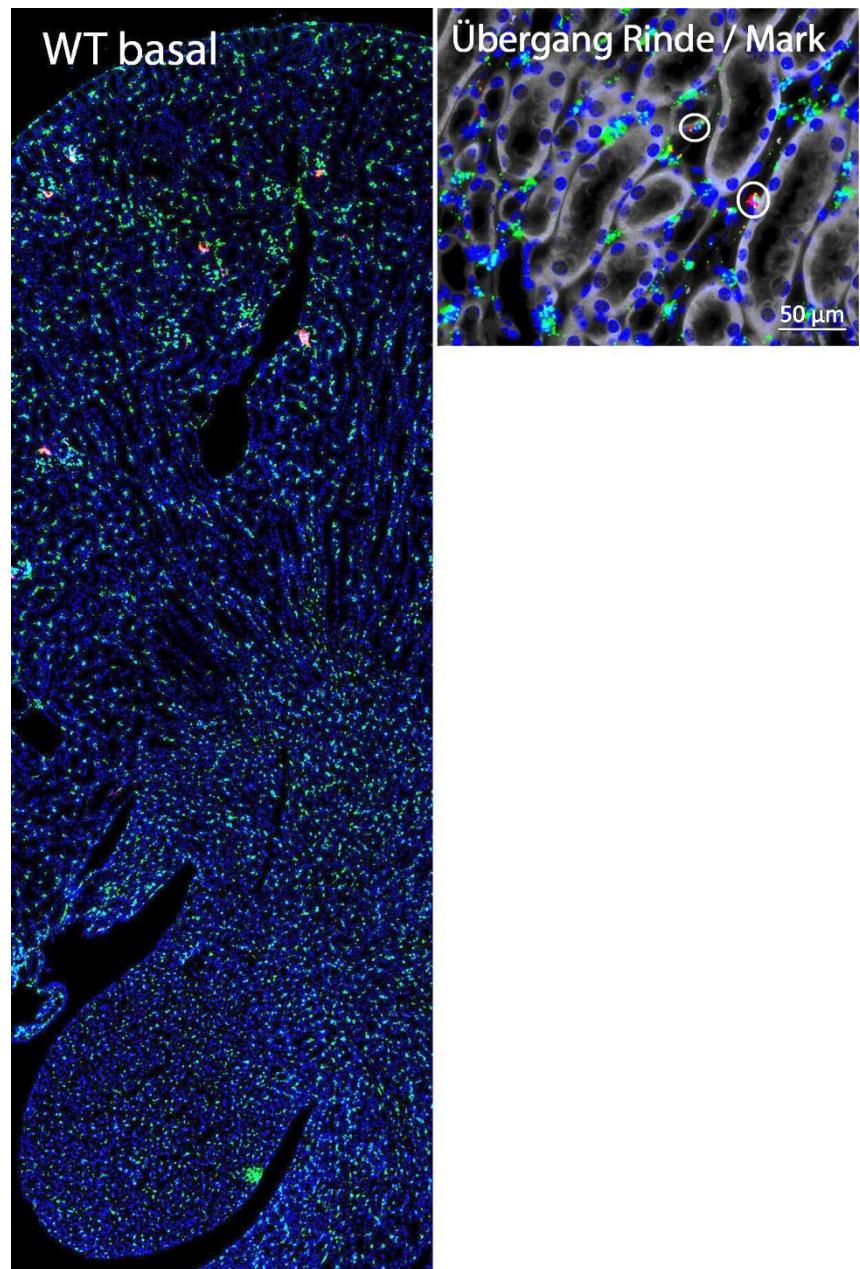


Abbildung 8: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere mit Renin (rot), PDGFR β (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Renin-mRNA wird außerdem von interstitiellen Zellen des Marks zusammen mit PDGFR β exprimiert, wenn auch nur in sehr geringen Mengen.

Abbildung 9 zeigt in der immunhistochemischen Analyse die Lokalisation von Cx40, Renin und α -SMA im Glomerulus. Die myoepithelialen Reninzellen sind positiv für alle drei Proteine. Auf Proteinebene konnte die Renin-Expression im Interstitium des Nierenmarks nicht beobachtet werden.

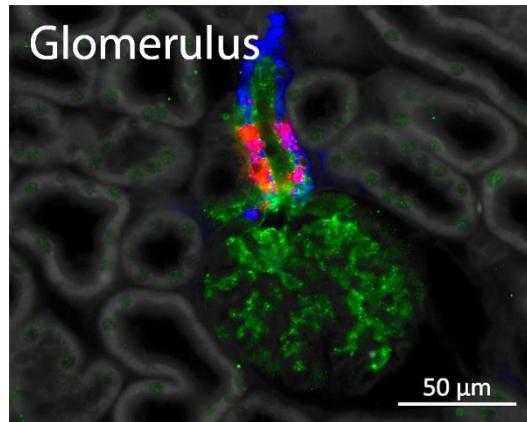


Abbildung 9: IF einer basalen Wildtyp-Niere mit Cx40 (grün), Renin (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Die juxtaglomerulären sind positiv für Cx40, Renin und α -SMA.

Aus der Analyse von Abbildung 1 bis Abbildung 9 ergibt sich, dass Cx40-mRNA in der basalen Niere vorrangig in den Glomeruli des Nierencortex, durch intraglomeruläre Mesangiumzellen und juxtaglomeruläre Renin-Zellen, und im extraglomerulären renalen Gefäßendothel exprimiert wird. Eine Co-Expression von Cx40 mit Renin und α -SMA findet in den juxtaglomerulären Zellen statt. Nur in der IF sichtbar war darüber hinaus eine Expression von Cx40-Protein in der Wand ringförmiger, CD31-negativer und daher eventuell tubulärer Strukturen, worauf in Kapitel 3.2.2 erneut eingegangen wird. Nebenbefundlich präsentiert sich vereinzelt eine Renin-mRNA-Expression in interstitiellen PDGFR β^+ mesenchymalen Zellen des äußeren Marks, jedoch ohne Co-Expression von Cx40-mRNA.

3.2 Lokalisation von Cx40 in der fibrotischen Niere

Neben der Lokalisation von Cx40 in der gesunden Niere soll in dieser Arbeit auch die Cx40 Expression am erkrankten, fibrotischen Nierenmodell untersucht werden.

Abbildung 10 zeigt drei Einzeldarstellungen von in-situ-Hybridisierungen von Cx40 in Wildtyp-Nieren im Vergleich, darunter eine basale (nicht fibrotische) und zwei fibrotische Präparate, deren Fibrose respektive durch Adenin-Diät (s. Kapitel 2.2.1.4.1) und durch unilaterale Ureterobstruktion (UUO, s. Kapitel 2.2.1.4.2) induziert wurde. Im basalen Präparat wird Cx40 exprimiert wie auch bereits im vorangehenden Kapitel 3.1 „Lokalisation von Cx40 in der gesunden Niere“ beschrieben: Cx40 tritt hauptsächlich in den kortikalen Glomeruli und in Gefäßwänden auf. In den fibrotischen Präparaten erscheint die glomeruläre sowie allgemein die kortikale Expression unverändert, im Mark jedoch imponieren strangartige Strukturen, die von der äußeren Zone des äußeren Marks in Richtung des inneren Marks ziehen, deutlich Cx40 exprimieren und morphologisch den deszendierenden Bündeln der Vasa recta zuzuordnen sind. Im inneren Mark verteilt findet sich ebenfalls eine punktförmig verstärkte

Cx40-Expression, die sich ohne die Verwendung von Zellmarkern nicht sicher anatomischen Strukturen zuordnen lässt.

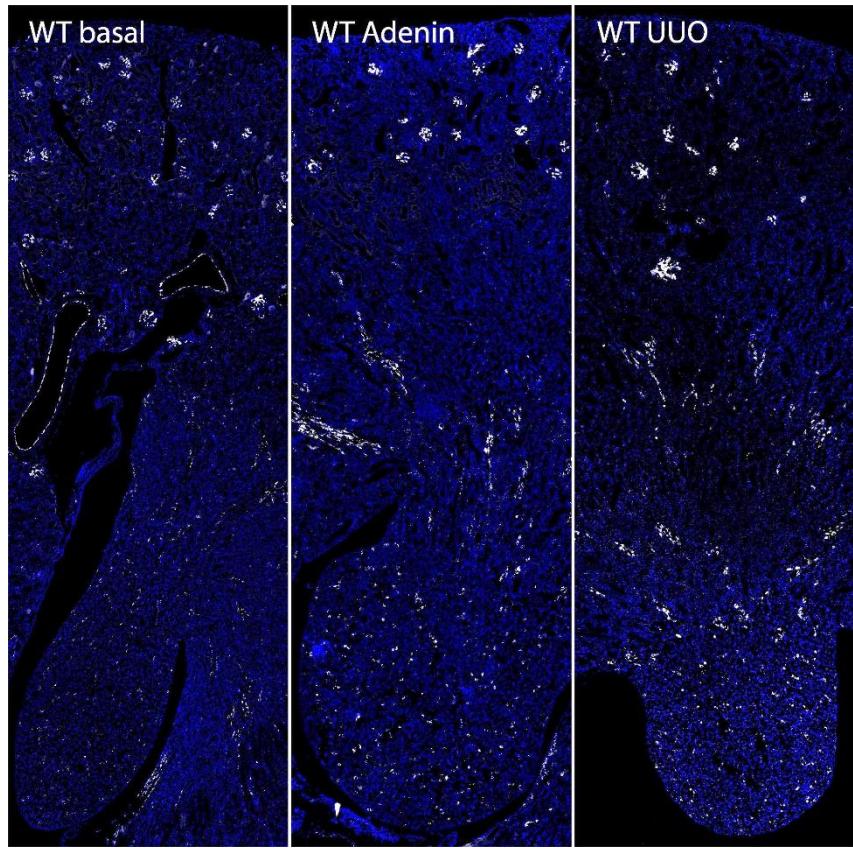


Abbildung 10: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (weiß) und DAPI (blau). Im Vergleich zum basalen Präparat erscheinen im äußeren Mark der fibrotischen Präparate strangartige Strukturen mit hoher Cx40-Expression, die die Form von Gefäßbündeln haben. Im inneren Mark ist die Cx40-Expression ebenfalls punktuell verstärkt.

Die folgende Abbildung 11 zeigt die basale Niere im Vergleich mit zwei Wildtyp-Nieren mit Adenin induzierten Nephropathie und Nephropathie durch unilaterale Ureterobstruktion. Markiert sind die mRNA von Cx40 und Kollagen Typ 1 alpha 1, sowie Zellkerne mittels DAPI. Die Hybridisierung von Kollagen soll dabei die Fibrosierung, die verstärkte Ablagerung von extrazellulärem Material im Gewebe belegen. Im basalen Präparat ist Kollagen in unmittelbarer Umgebung großer Gefäße und in der Wand des Nierenbeckens vorhanden. Im Adenin-Modell durchziehen breite Streifen mit vielfach verstärkter Kollagenexpression die Rinde, die Zonen ohne fibrotische Veränderung umgeben. Im gesamten Mark ist die Kollagenexpression ebenfalls stark erhöht. Im UUO-Modell ist die Rinde in Bereiche mit deutlich erhöhter und nahezu physiologischer Kollagenexpression unterteilt, wobei sich nicht die für das Adenin-Modell typischen fibrotischen Streifen bilden. Der Außenstreifen des äußeren Markes nur sehr leicht

fibrotisch verändert, der Innenstreifen dafür stark. Das innere Mark zeichnet sich erneut durch eine physiologische Kollagenexpression aus.

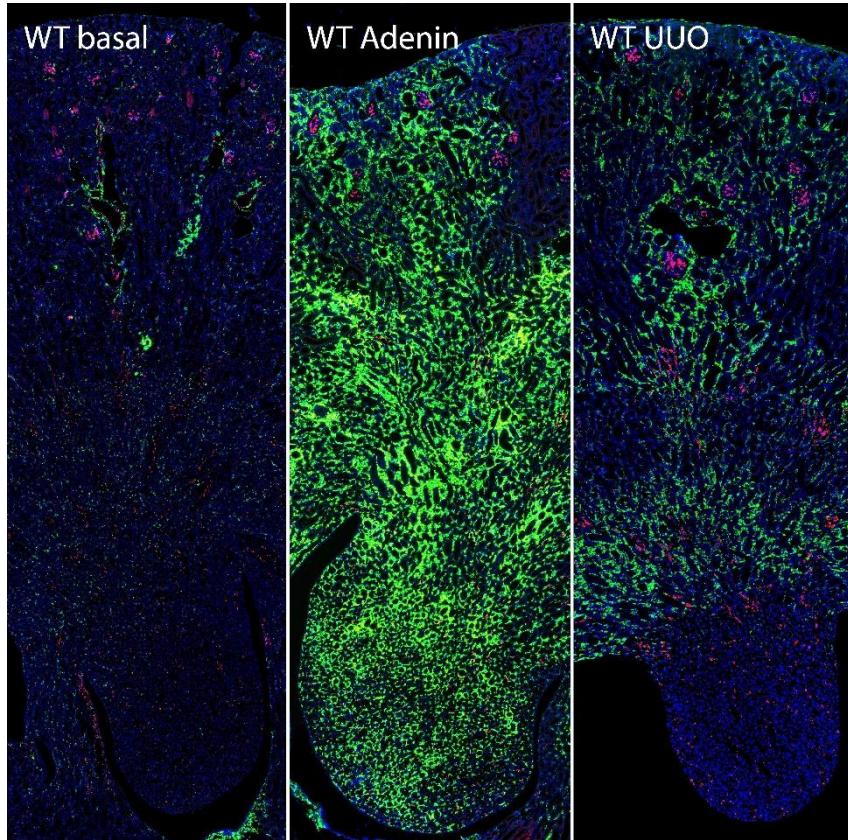


Abbildung 11: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (rot), Kollagen (grün) und DAPI (blau). Während im basalen Präparat Kollagen hauptsächlich perivaskulär auftritt, sind in beiden fibrotischen Präparaten ausgedehnte Kollagenablagerungen im Interstitium als Zeichen einer ausgeprägten Fibrose zu erkennen. Das Muster der Fibrosierung unterscheidet sich nach der Art der Fibrose-Induktion.

Auch in diesem Kapitel sollen die Beobachtungen aus dem RNAscope® mit solchen aus der IF verglichen werden.

Statt der Hybridisierung von Kollagen wurde für die Immunfluoreszenzaufnahmen Tenascin C, ein klassisches Protein der Extrazellulärmatrix, welches wie auch Kollagen in fibrotischen Geweben vermehrt gebildet wird, angefärbt. Im Gegensatz zu Abbildung 11, welche nur die Verteilung der mRNA des EZM-Bestandteils Kollagen darstellt, sind in Abbildung 12 Ablagerungen von EZM-Protein selbst zu sehen. Die Abbildungen bestätigen weitgehend das zuvor beschriebene Fibrosierungsmuster der Präparate und bestätigen damit auch auf Proteinebene die erfolgreiche Fibroseinduktion. Während in der basalen Niere kaum EZM sichtbar ist, weist das Adenin-Modell auch hier kortikal die typische streifenförmige und medullär die intensive flächige Fibrosierung auf. Auch im UUO-Modell bestätigt sich

die Fibrosierung mit Schwerpunkt auf die äußere Rinde und den Innenstreifen des äußeren Marks, wobei in der IF auch im inneren Mark vermehrt EZM sichtbar wird. Die in dieser UUO-Abbildung auffällige Fibrosierung der Nierenbeckenwand findet sich außerhalb des gewählten Ausschnitts auch in der ISH.

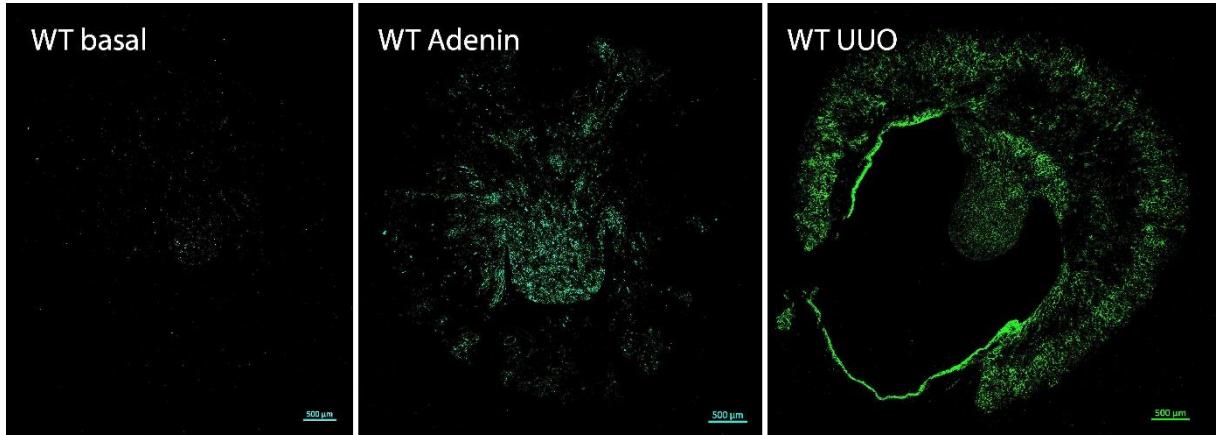


Abbildung 12: IF einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Tenascin C (grün). Das basale Präparat ist weitestgehend frei von EZM. Nach Adenin-Diät und unilateraler Ureterobstruktion findet eine deutlich vermehrte Ablagerung statt. Auch hier unterscheidet sich das Verteilungsmuster nach Art der Fibroseinduktion und ähnelt dem der ISH, nur finden sich hier auch im inneren Mark des UUO-Modells Fibrosezeichen.

In Analogie zur basalen Niere soll auch in der fibrotischen Niere die Cx40 Expression renalen Strukturen zugeordnet werden. Dazu werden im Folgenden erneut Analysen der zellspezifischen Lokalisation der mRNA von Cx40 mit verschiedenen Markersonden durchgeführt.

3.2.1 Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen

Abbildung 13 stellt erneut in einer Dreifach-Abbildung die basale Wildtyp-Niere, die Niere nach Adenin-induzierter Nephropathie und die ipsilaterale Niere nach Ureterligatur im Vergleich zueinander dar. Im oberen Teil der Abbildung sind Übersichtsaufnahmen von allen drei Zonen der Niere – des Cortex, des äußeren Marks und des inneren Marks – im Verbund sichtbar, welche die für alle Präparat-Typen gleichbleibende Verteilung von Cx40 und CD31 in der Rinde darstellen: Im Gefäßendothel überlagern sich beide Signale, im Glomerulus sind sie lediglich eng benachbart. Im äußeren Mark der fibrotischen Präparate zeigen Übersichts- und Detailaufnahmen die stark Cx40 und CD31 exprimierenden Strukturen, welche im basalen Präparat kaum sichtbar sind, und bei denen es sich angesichts der deutlichen Überlagerung beider Signale um deszendierende Bündel der Vasa recta handelt. Im inneren Mark ist Cx40-mRNA ebenfalls in CD31⁺-Endothelzellen exprimiert.

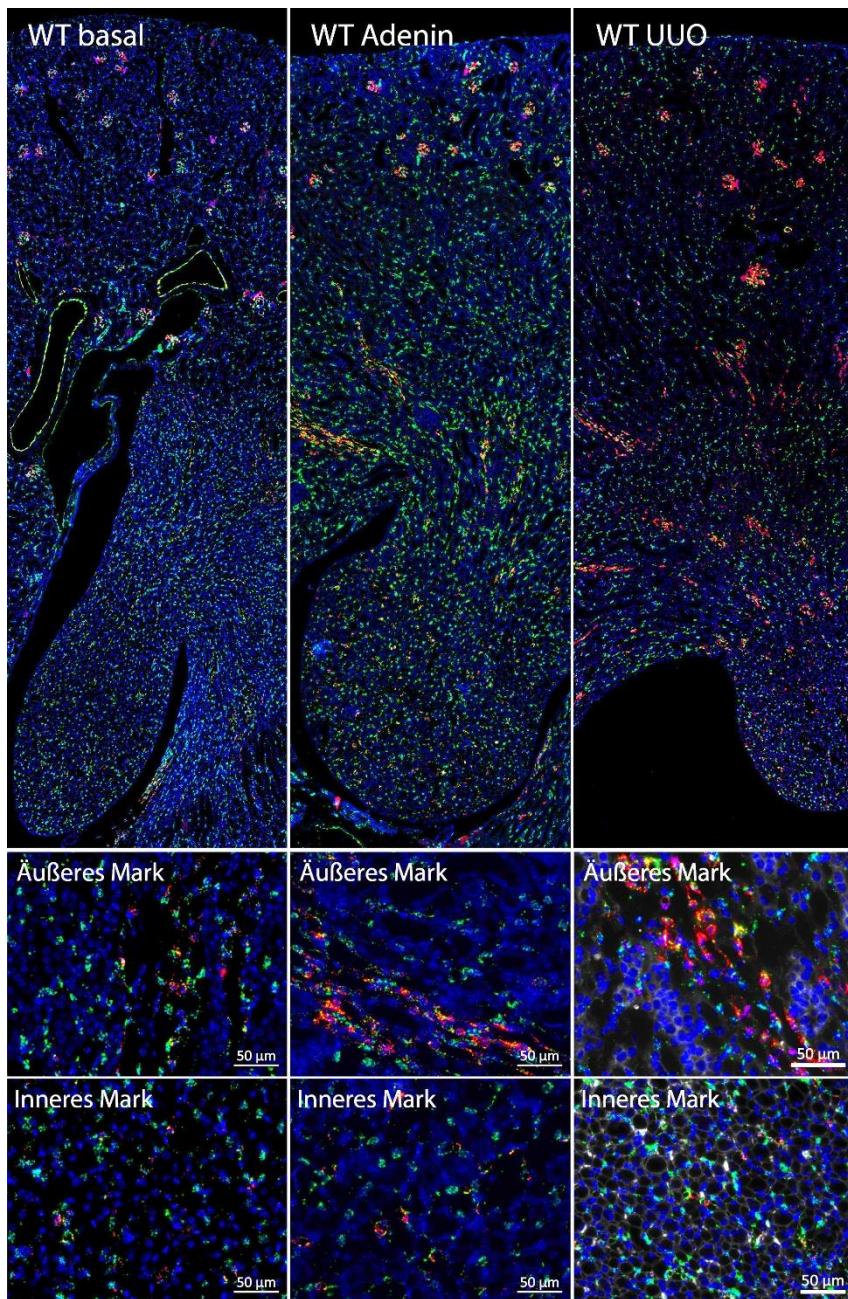


Abbildung 13: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (rot), CD31 (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Bei den im äußeren Mark der fibrotischen Präparate verstärkt Cx40-exprimierenden Zellen handelt es sich um CD31-positive Endothelzellen, im inneren Mark erscheint Cx40-mRNA ebenfalls stets mit dem Endothelzellmarker CD31 co-exprimiert.

Abbildung 14 zeigt nun wie im vorangehenden Kapitel die Expression von Cx40- und α -SMA-mRNA in der basalen Wildtyp-Niere, der Niere nach Adenin-induzierter Nephropathie und der ipsilateralen Niere nach Ureterligatur im Vergleich zueinander. Als Marker für Myofibroblasten wird α -SMA in den fibrotischen Präparaten nach einem ähnlichen Muster wie Kollagen verstärkt exprimiert. Außerhalb der

juxtaglomerulären Zellen findet aber auch hier keine Co-Expression des von α -SMA- und Cx40-mRNA statt, sodass kein Nachweis einer Expression von Cx40 durch Myofibroblasten erbracht werden konnte.

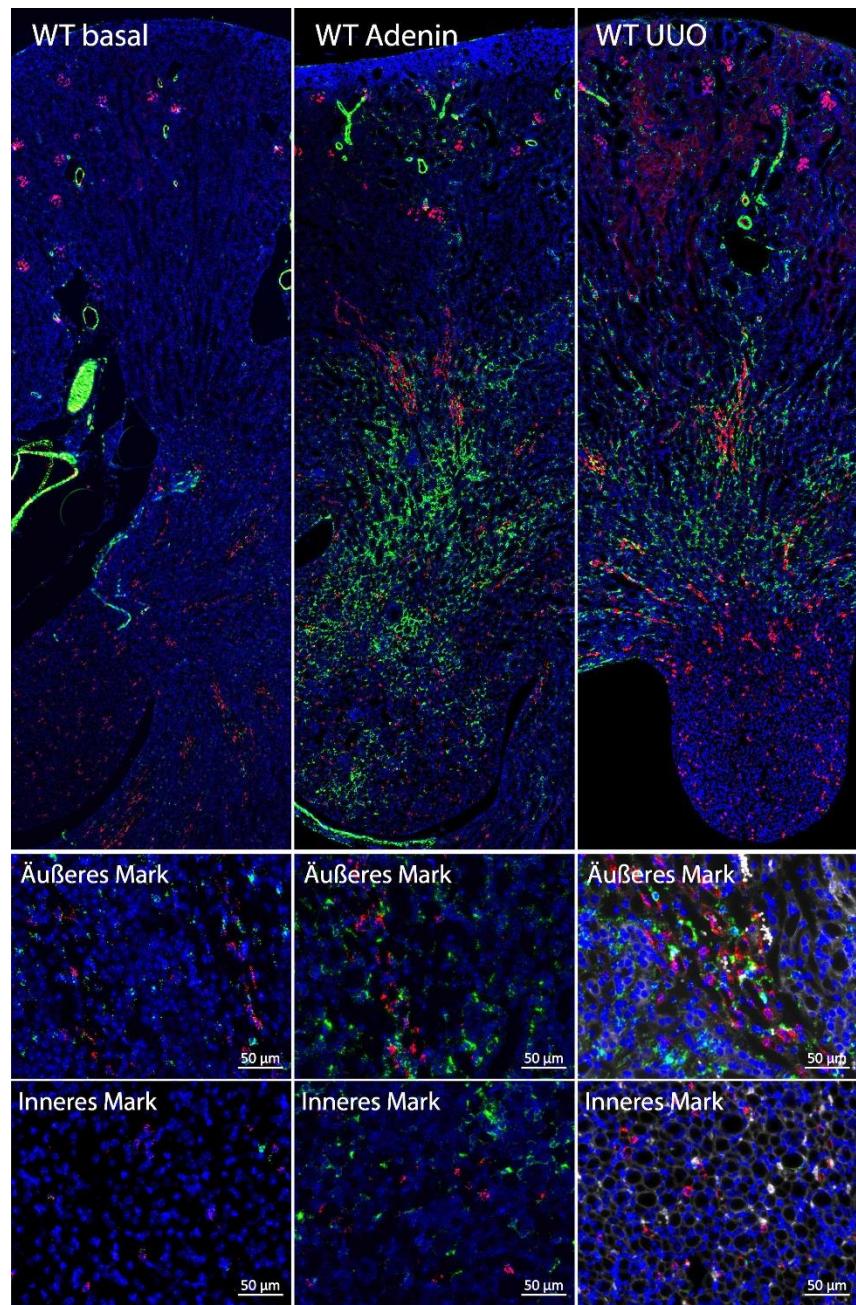


Abbildung 14: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (rot), α -SMA (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Die Expression von α -SMA ist als Zeichen der Fibrose im Adenin- und UUO-Präparat erhöht. Cx40- und α -SMA-mRNA sind weiterhin außerhalb der juxtaglomerulären Zellen nicht co-exprimiert.

Abbildung 15 stellt nun auf Proteinebene die Expression von Cx40 und den eben betrachteten Zellmarkern CD31 und α -SMA dar. Das dichte Netz α -SMA-positiven Strukturen im Mark bestätigt auch

hier die Fibrosierung des Gewebes. Wie auch in den IF-Abbildungen des basalen Präparats treten hier im Mark teilweise Strukturen mit verstärkter Signaldichte für Cx40-Protein auf, die nicht gleichzeitig CD31-positiv sind, sodass es sich nicht um Gefäße handelt. Lichtmikroskopisch erinnern diese erneut an Tubuli.

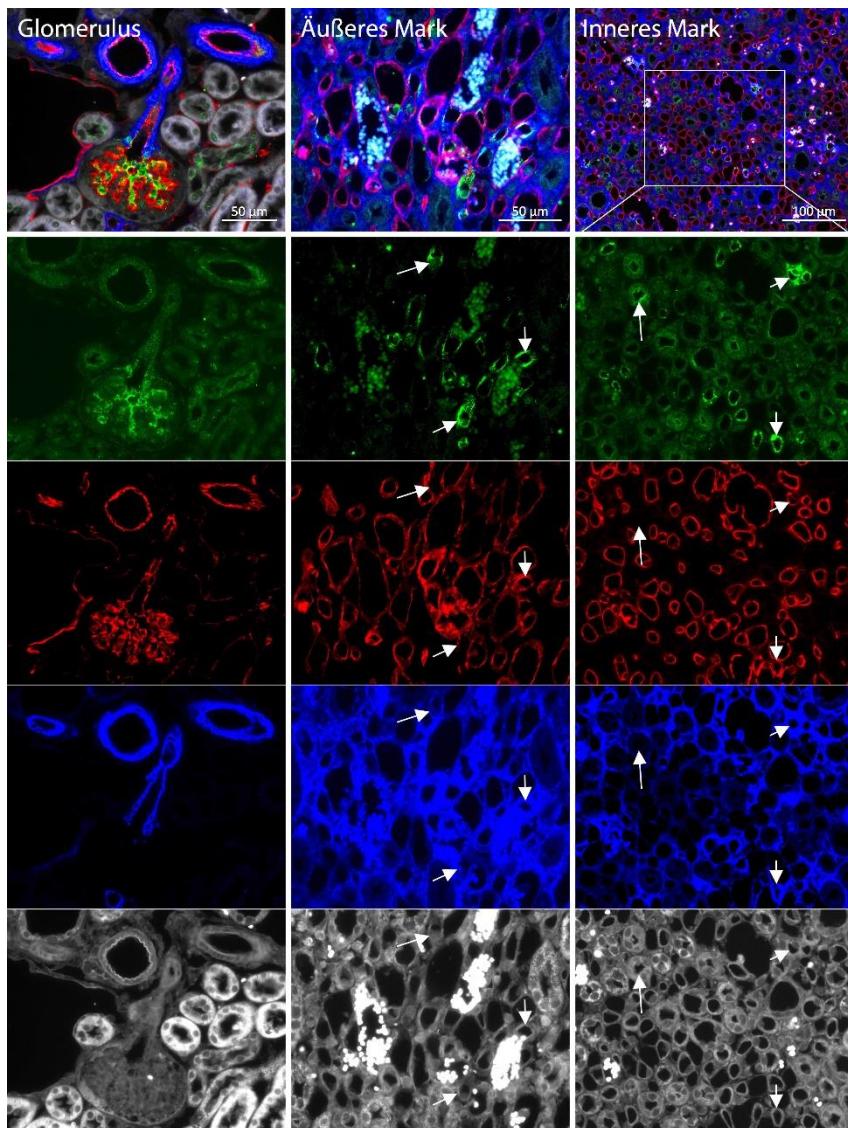


Abbildung 15: IF einer Niere bei Adenin-induzierter Nephropathie mit Cx40 (grün), CD31 (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Die Dichte von α -SMA als Fibrosemarker ist im Mark stark erhöht. Im Mark tritt darüber hinaus, wie in der IF-Abbildung der basalen Niere, Cx40-Signal in der Wand CD31-negativer Strukturen auf.

3.2.2 Nachweisbarkeit einer außervaskulären Cx40-Expression auf mRNA-Ebene
 Da in der Analyse der vorangehenden und folgenden Kapitel mehrfach in den Vergrößerungen der IF-Aufnahmen Cx40-Protein in CD31-negativen und tubulär erscheinenden Strukturen beschrieben wird, soll ein ähnliches Phänomen in vergleichbaren Bildausschnitten von ISH-Aufnahmen gesucht werden. Abbildung 16 stellt drei Ausschnitte aus dem äußeren Mark von Präparaten dar, wo mittels IF Cx40-

Signale in Tubuli (Lumen markiert durch Pfeile) dargestellt wurden. Oben ist eine basale Wildtypniere zu sehen, darunter zwei fibrotische Präparate, mittig Adenin-induziert, unten nach unilateraler Ureterobstruktion. Auch in diesen fibrotischen Präparaten sind keine relevanten Cx40-mRNA-Signale in den Wänden von Tubuli zu sehen. Die oben genannten Beobachtungen aus den IF-Präparaten können daher in der ISH nicht bestätigt werden. Auffällig ist aber eine geringe Expression von Cx40-mRNA ohne Co-Expression von CD31-mRNA im Interstitium der Adenin-Niere (markiert durch Kreise). Im anderen fibrotischen UUO-Präparat ist dies nicht zu beobachten, wobei, wie Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen, die Fibrosierung des UUO-Modells einem anderen Muster folgt als im Adenin-Modell. Diese Cx40-Expression mit einem anderen Zellmarker wie PDGFR β oder α -SMA zu korrelieren, wäre nur unter Schwierigkeiten möglich, da das umschriebene Phänomen so spärlich auftritt und daher kaum von einer inzidentellen Überlappung der Signale zu unterscheiden ist.

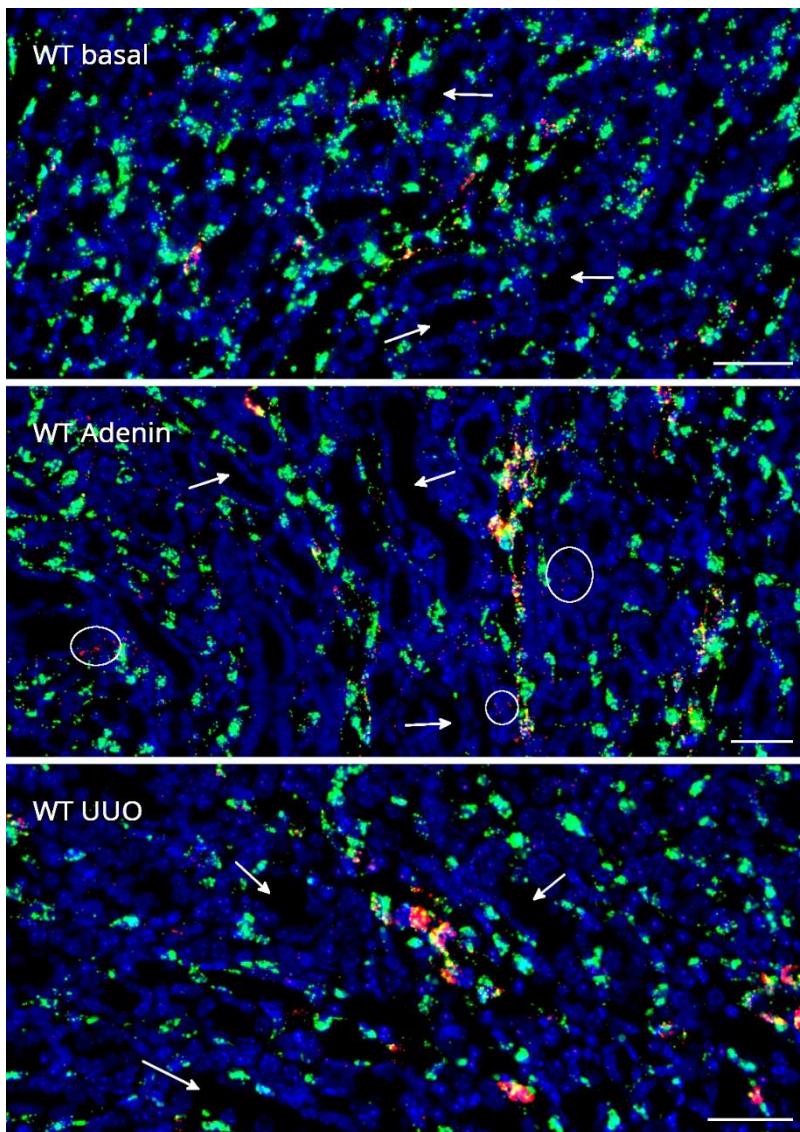


Abbildung 16: RNAcope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion. Ausschnitte aus dem äußeren Mark mit Cx40 (rot), CD31 (grün) und DAPI (blau). Pfeile markieren tubulär erscheinende Hohlstrukturen, in deren Wand keine relevanten Cx40-mRNA-Signale auftreten. Kreise markieren die nur im Adenin-Modell auftretenden geringen Ansammlungen von Cx40 ohne CD31-co-Expression. Skala entspricht 50 μ m.

3.2.3 Cx40 Lokalisation in Mesangium und Niereninterstitium

Abbildung 17 vergleicht die Expression von Cx40- und PDGFR β -mRNA in der basalen Wildtyp-Niere, der Niere nach Adenin-induzierter Nephropathie und der ipsilateralen Niere nach Ureterligatur. Als Markerprotein für Fibroblasten und Myofibroblasten findet sich in den zuvor beschriebenen fibrotischen Arealen der Präparate auch eine deutlich erhöhte Expression von PDGFR β -mRNA. Außerhalb der fibrotischen Areale markiert PDGFR β vornehmlich Perizyten, und die Verteilung der Signale stellt sich dar wie in der basalen Niere. Die Co-Expression von Cx40- und PDGFR β -mRNA im

intraglomerulären Mesangium bleibt in der Nierenfibrose erhalten wie auch die Expression beider Nukleinsäuren durch lediglich benachbarte Zellen im Bereich der extraglomerulären Gefäßwand.

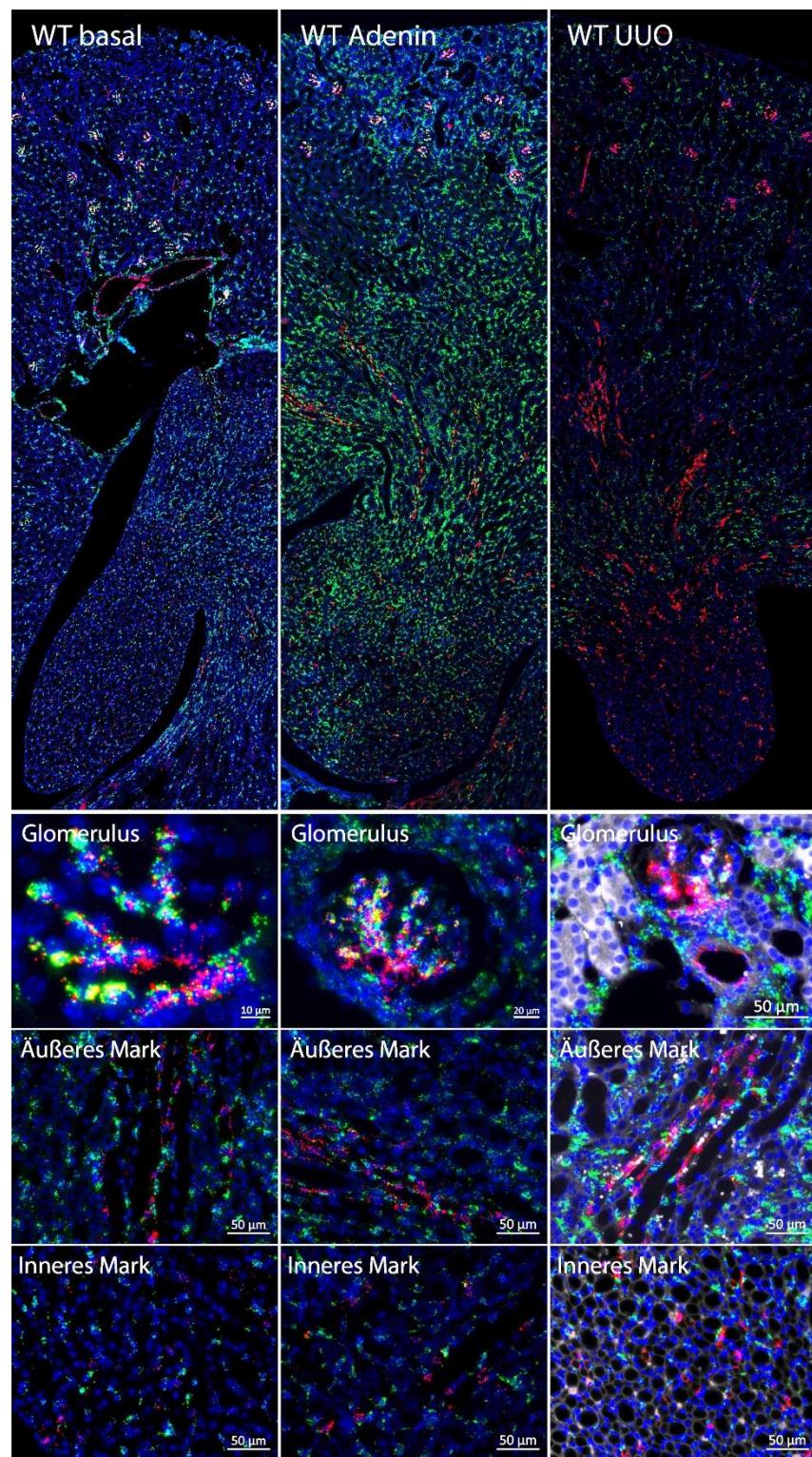


Abbildung 17: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (rot), PDGFR β (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Die Expression von PDGFR β ist auch hier als Zeichen der Fibrose im Adenin- und UUO-Präparat erhöht. Cx40-mRNA ist weiterhin außerhalb des intraglomerulären Mesangium nicht mit PDGFR β - oder α -SMA-mRNA co-exprimiert.

Abbildung 18 stellt die Expression von Cx40 und ITGA8 auf Proteinebene stellvertretend für fibrotische Präparate in einer Wildtyp-Niere nach ipsilateraler Ureterligatur dar. Gut sichtbar ist erneut die Co-Expression beider Proteine im intraglomerulären Mesangium sowie die lokale Nähe beider Proteine in der Blutgefäßwand (Pfeile).

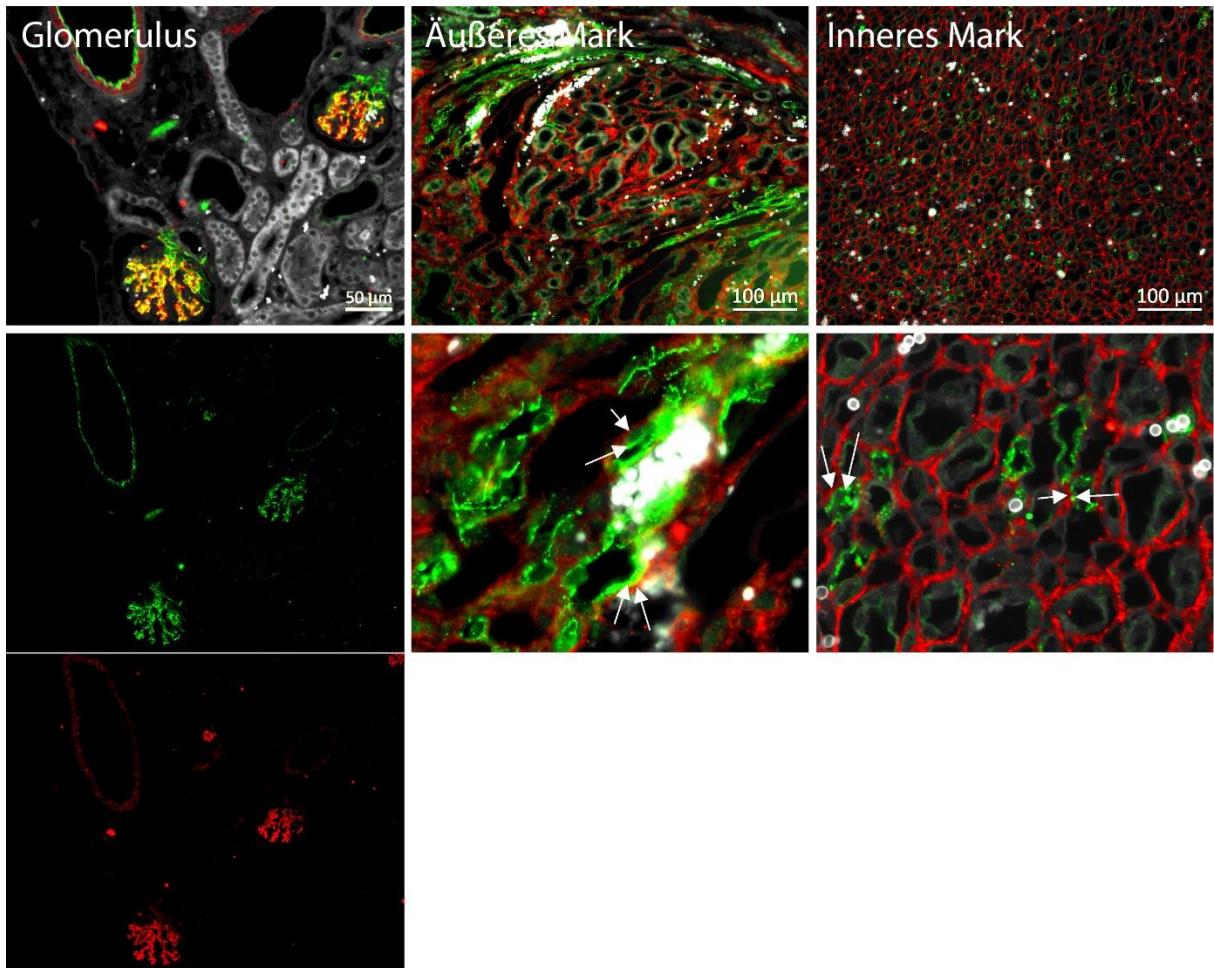


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (grün), ITGA8 (rot) und Durchlicht (weiß). Cx40 und ITGA8 sind im intraglomerulären Mesangium co-exprimiert, in der Wand von Blutgefäßen weiterhin nur benachbart.

3.2.4 Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen

Abbildung 19 zeigt den Vergleich zwischen basaler Wildtyp-Niere, Niere nach Adenin-induzierter Nephropathie und ipsilateraler Niere nach Ureterligatur, wobei Cx40- und Renin-mRNA markiert wurde. In allen Präparaten tritt Renin-mRNA co-lokalisiert mit Cx40-mRNA in den Reninzellen des JGA auf. In den fibrotischen Präparaten allerdings erscheinen auch im Bereich der bereits in Abbildung 10 beschriebenen Cx40-Signale der deszendierenden Vasa recta des äußeren Marks deutliche Renin-Signale, die unmittelbar mit den Gefäßen assoziiert, aber nicht mit Cx40-Signalen co-lokalisiert sind.

Auch im inneren Mark der fibrotischen Präparate ist vereinzelt Renin-mRNA sichtbar, welche zwar meist eng mit Cx40-Signalen benachbart, aber nicht co-lokalisiert ist.

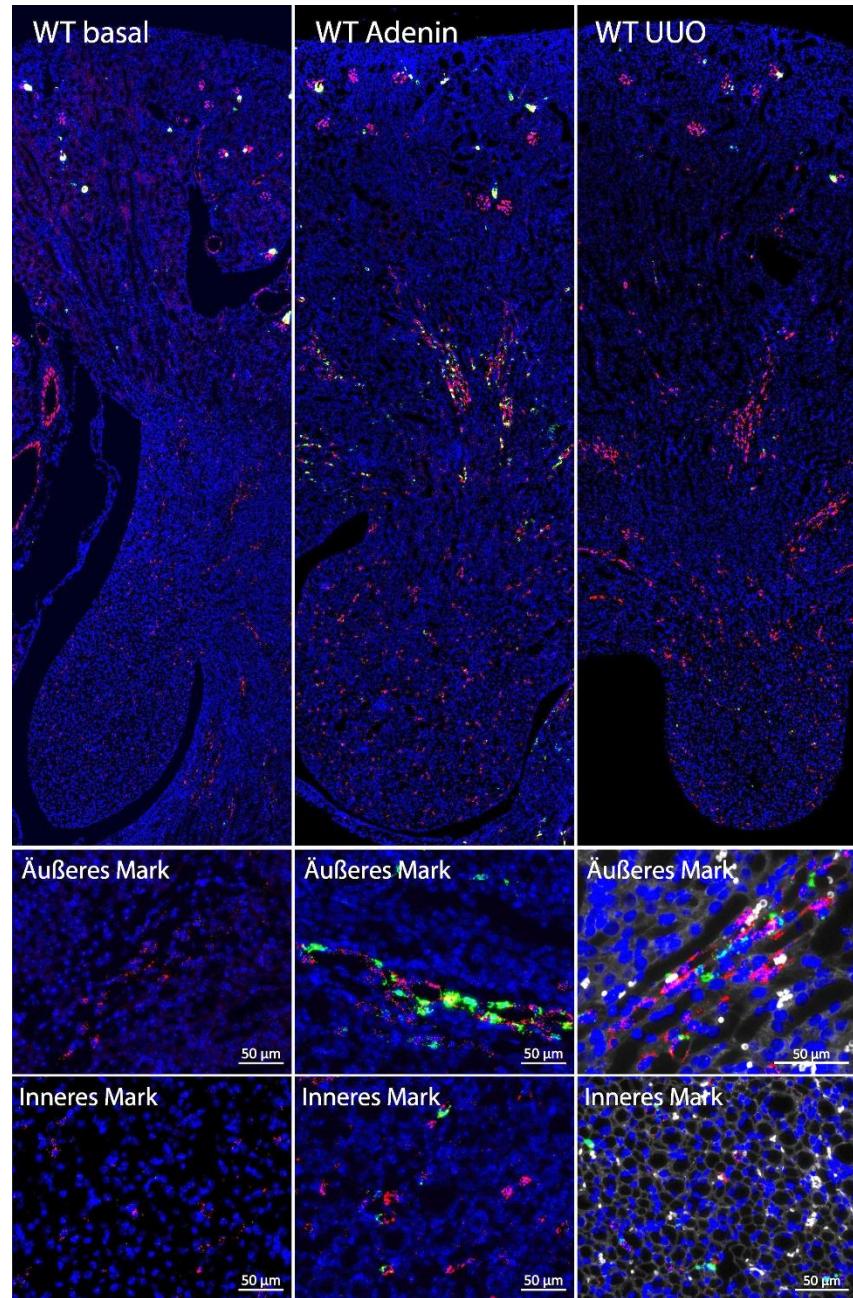


Abbildung 19: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere, einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Fibrose und einer Wildtyp-Niere bei Fibrose durch unilaterale Ureterobstruktion mit Cx40 (rot), Renin (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Renin-mRNA wird in den fibrotischen Präparaten nicht nur durch juxtaglomeruläre Zellen, sondern auch durch den medullären Gefäßen anliegende Zellen exprimiert.

Um der Frage nachzugehen, welche Zellen für die Renin-Expression entlang der deszendierenden Bündel der Vasa recta in Abbildung 19 verantwortlich sind, vergleicht Abbildung 20 Ausschnitte aus basalen Wildtyp-Nieren mit solchen aus Nieren nach Adenin-induzierter Nephropathie, wobei Renin-

und PDGFR β -mRNA markiert wurde. Während die basale Übersichtsaufnahme Renin-Signale nur im JGA zeigt, treten in der Vergrößerung an der Grenze der Rinde zum äußeren Mark vereinzelt dezente Renin-Signale auf, welche mit PDGFR β co-lokalisieren sind und daher von mesenchymalen Zellen, möglicherweise Perizyten, ausgehen (Kreise). Auch im fibrotischen Präparat liegt im Bereich der Vasa recta im äußeren Mark eine Co-Lokalisation der nun sehr kräftigen Renin- und PDGFR β -Signale vor (Pfeile).

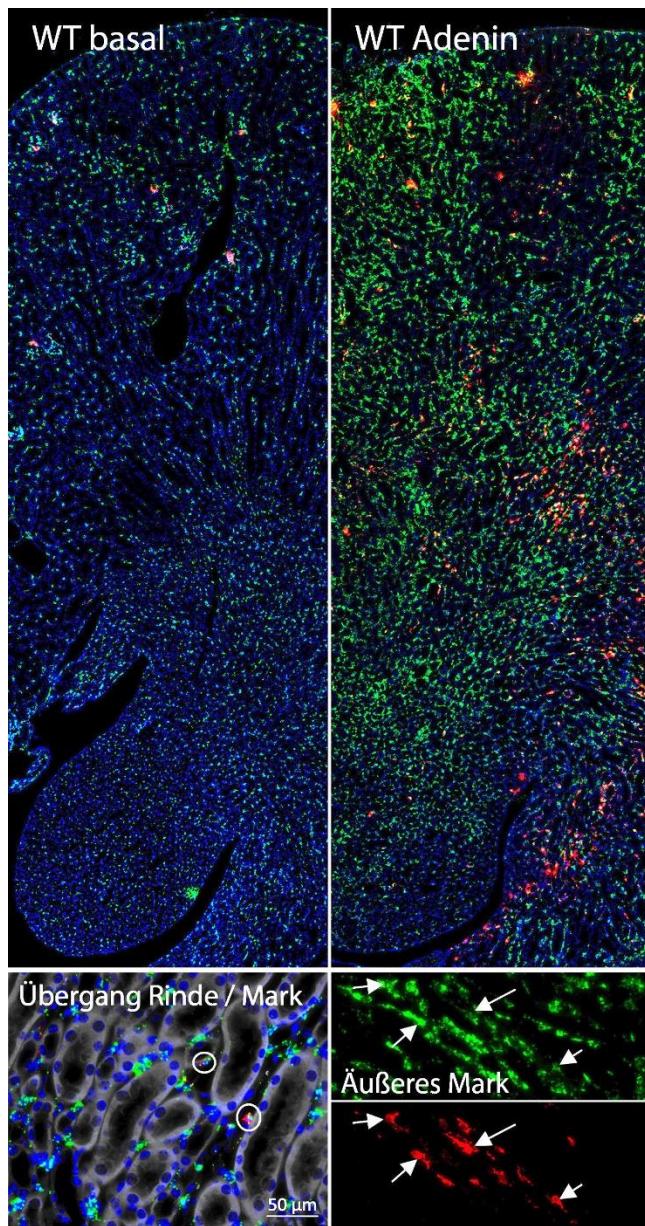


Abbildung 20: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere und einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter mit Renin (rot), PDGFR β (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Im basalen Präparat tritt Renin-mRNA im Mark zwar nur in sehr geringer Menge auf, allerdings stets mit Co-Expression von PDGFR β -mRNA (s. Kreise). Im Adenin-Präparat verursachen ebenfalls PDGFR β -mRNA-positive Perizyten die neu aufgetretene perivaskuläre Renin-mRNA-Expression.

Abbildung 21 entspricht inhaltlich Abbildung 20, nur dass statt PDGFR β - CD31-mRNA angefärbt ist. Renin-mRNA wird nicht durch die CD31-mRNA-positiven Endothelzellen exprimiert, aber es wird deutlich, dass die Renin-bildenden Perizyten des Marks zumindest in der Mehrheit mit Gefäßen assoziiert sind.

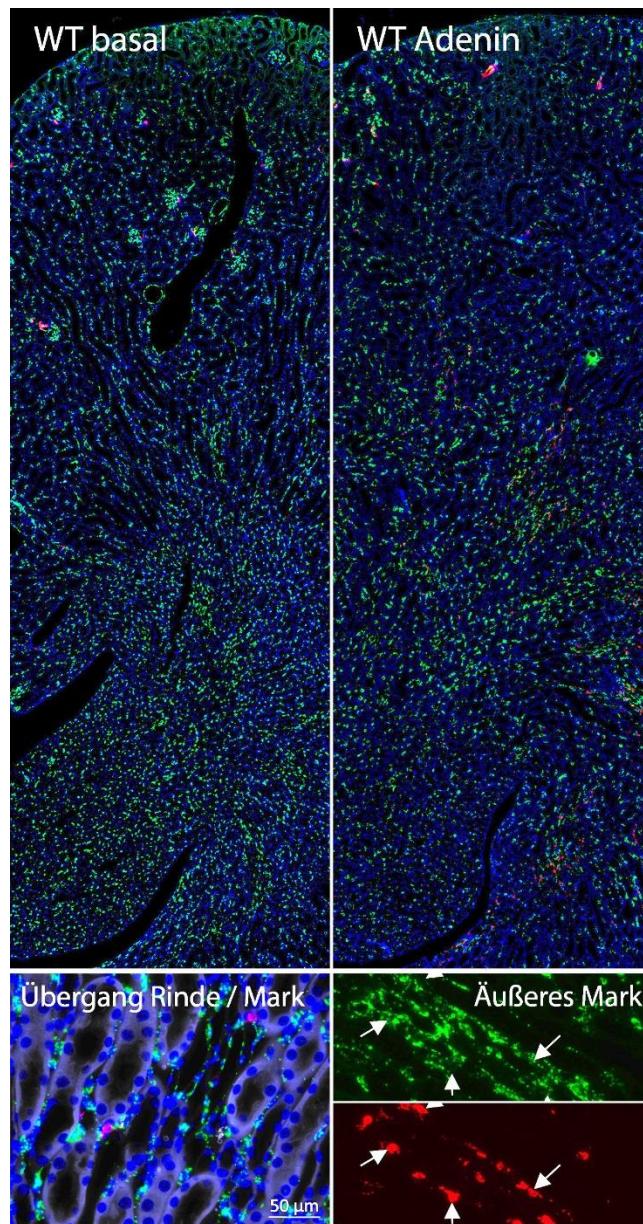


Abbildung 21: RNAscope® einer basalen Wildtyp-Niere und einer Wildtyp-Niere bei Adenin-induzierter Renin (rot), CD31 (grün), DAPI (blau) und Durchlicht (weiß). Renin-mRNA wird im Mark nicht durch das Endothel, dafür nahe den Gefäßen gebildet, wie für Perizyten zu erwarten.

Aus der Analyse von Abbildung 10 bis Abbildung 21 ergibt sich, dass Cx40-mRNA in der fibrotischen Niere erneut in den Glomeruli des Nierencortex, durch intraglomeruläre Mesangiumzellen und juxtaglomeruläre Zellen, und ebenfalls im extraglomerulären renalen Gefäßendothel exprimiert wird. In

der Gefäßwand der vasa recta im äußeren Nierenmark ist die Expression von Cx40-mRNA im Vergleich zu den basalen Präparaten verstärkt. Im Adenin-Modell stellten sich außerdem geringe Mengen von extraendothelialer interstitieller Cx40-mRNA-Expression dar, deren Ursprung noch offen ist. In den fibrotischen Immunfluoreszenz-Präparaten war zusätzlich die Expression von Cx40-Protein in der Wand ringförmiger, CD31-negativer und daher eventuell tubulärer Strukturen erkennbar, die auf mRNA-Ebene nicht bestätigt werden konnte. Für Myofibroblasten und interstitielle Zellen konnte auch in diesen Präparaten keine Expression von Cx40-mRNA nachgewiesen werden. Renin und α -SMA sind in diesen fibrotischen Präparaten weiterhin nur in juxtaglomerulären Zellen co-exprimiert. Die in diesen Präparaten im äußeren Mark paravasal neuauftretene Expression von Renin-mRNA ist auf interstitielle PDGFR β -positive mesenchymale Zellen zurückzuführen, wobei auch in basalen Präparaten sehr vereinzelt eine geringe Expression von Renin-mRNA durch PDGFR β -positive interstitielle Zellen dargestellt werden konnte. Diese medulläre Renin-mRNA-Expression erfolgt jedoch im Gegensatz zu den juxtaglomerulären Reninzellen weiterhin ohne co-Expression von Cx40-mRNA.

Die oben beschriebenen Veränderungen der Expression von Connexin 40 auf den fibrotischen Umbau des Organparenchyms legen nahe, dass die Cx40-Expression zwar als Reaktion auf den fibrotischen Umbau des Organs erhöht wird, Cx40 an der Entstehung der Fibrose allerdings nicht elementar beteiligt ist, da die dafür zentralen Myofibroblasten das Connexin weder in der basalen noch in der fibrotischen Niere exprimieren. Möglich ist dennoch eine Involvierung in Mechanismen zur Kompensation oder zur Reparatur des stattgefundenen Gewebeschadens. Diese Frage wird in der Diskussion ausführlicher beleuchtet. Zusätzlich sollten Vorarbeiten geleistet werden, um zunächst im basalen Knockout-Modell zu überprüfen, ob das Fehlen von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen die renale Funktion beeinträchtigt.

3.3 Lokalisation von Cx40 in der Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen

Nach der Lokalisation von Cx40 in der basalen und fibrotischen Niere sollte in dieser Arbeit auch überprüft werden, ob ein Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen eine Auswirkung auf die Verteilung des Proteins im Organ hat. Die Analyse wurde nur an basalen Nieren und nur auf Proteinebene durchgeführt. Genutzt wurden dieselben Zellmarker wie für die Immunfluoreszenzfärbungen der vorangehenden Kapitel 3.1 und 3.2.

Für diesen Versuchsteil wurde das Cx40-Gen von Mäusen im Sinne eines Cre/LoxP-Systems mit LoxP-sites flankiert und im Verlauf des Versuchs durch Tamoxifen-Gabe über Aktivierung der Cre-Rekombinase ausgeknockt (s. Kapitel 2.2.1.1). Die resultierenden Präparate wurden, wie in den vorangehenden Kapiteln, mittels Immunfluoreszenz untersucht.

3.3.1 Cx40-Lokalisation in renalen Gefäßen

Abbildung 22 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40, CD31 und α -SMA angefärbt ist. Da das intraglomeruläre Mesangium PDGFR β exprimiert, exprimieren diese Zellen nach dem Knockout kein Cx40 mehr. Stattdessen stellen sich bei manchen Glomeruli unmittelbar benachbart flächige Anhäufungen von Cx40 am Gefäßpol der Glomeruli dar. In der Abbildung sind in den ersten zwei Spalten zwei solcher Bildausschnitte dargestellt, in einem ist die beschriebene Cx40-Protein-Expression zu sehen, im anderen nicht. Beide Varianten sind repräsentativ für das Präparat, wobei die Unterschiede am ehesten schnittbedingt sind. Diese paraglomerulären Cx40-exprimierenden Zellen treten in dieser Häufigkeit in basalen und fibrotischen Präparaten ohne Cx40-Defizienz nicht auf und exprimieren kein CD31.

Auch in diesem Präparat befinden sich im äußeren Mark Cx40-Protein-exprimierende Zellen, von denen einige CD31-positiv sind (markiert durch Pfeile), andere nicht (markiert durch Kreise). Letztere haben erneut das lichtmikroskopische Erscheinungsbild von Tubuli. Im inneren Mark scheinen Cx40-Signale sogar hauptsächlich in Cx40-negativen Strukturen aufzutreten. In den durch gestrichelte Linien markierten Arealen, die CD31- und damit gefäßreich sind, sind die Cx40-Signale schwächer.

Ob α -SMA-positive Zellen wie etwa Myofibroblasten im Knockout-Modell beginnen, Cx40-Protein zu bilden, lässt sich nur anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen schwierig beurteilen, da beide Proteine naturgemäß in der Gefäßwand in großer Nähe zueinander gebildet werden. Die Mitbegutachtung von RNAscope[®]-Präparaten wäre zur Beantwortung dieser Frage hilfreich.

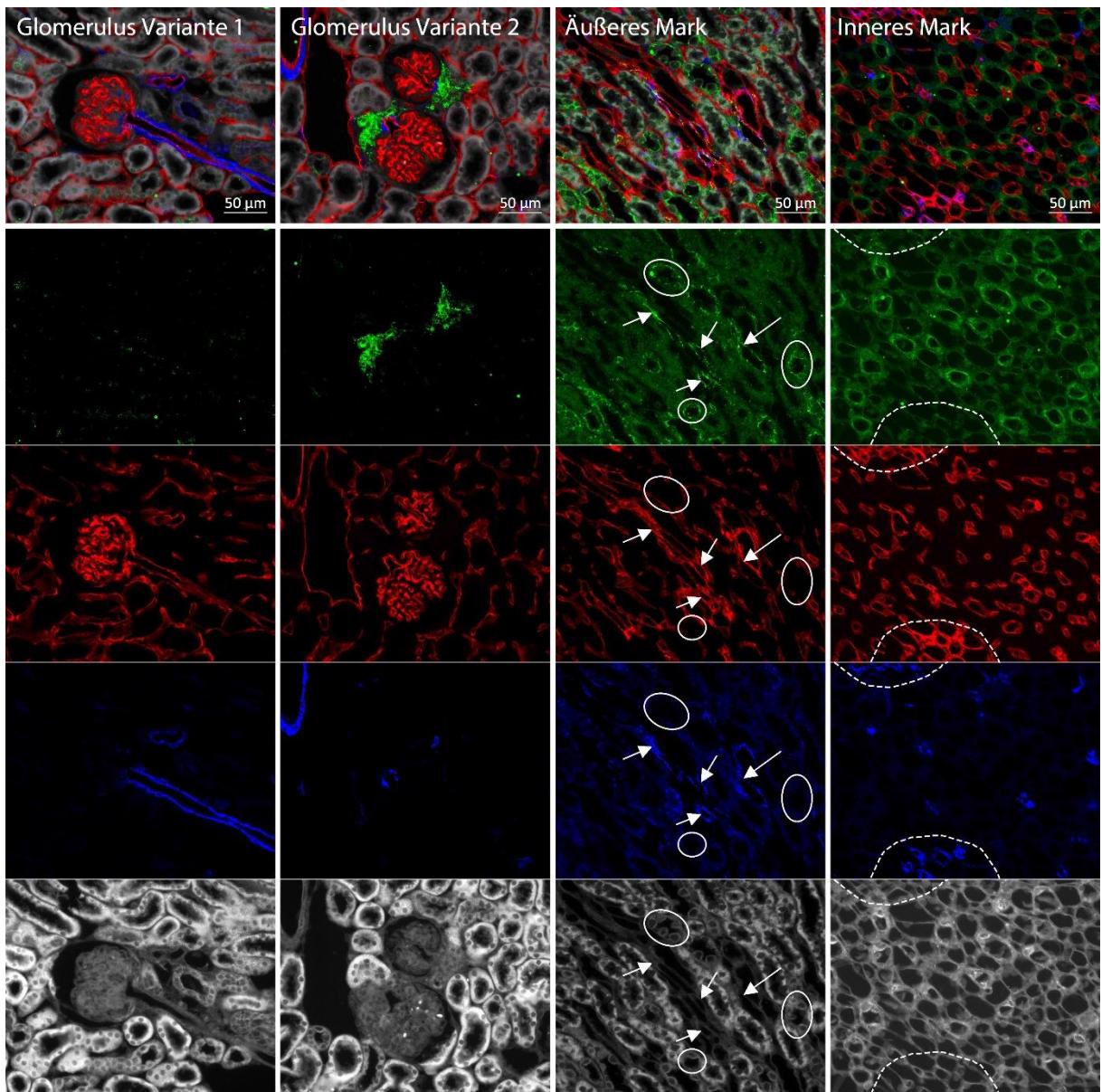


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), CD31 (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Cx40 ist aus dem Inneren der Glomeruli verschwunden, dafür finden sich vermehrt Anreicherungen von Cx40 in paraglomerulären, CD-31-negativen Zellen. Pfeile: Cx40-positive, CD31-positive Gefäße. Kreise: Cx40-positive, CD31-negative Strukturen. Gestrichelte Halbkreise: Areale mit hoher Gefäßdichte.

3.3.2 Cx40-Lokalisation in Mesangium und Interstitium

Abbildung 23 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40 und Desmin, ein weiteres Markerprotein für mesenchymale Zellen, angefärbt ist. Das intraglomeruläre Mesangium ist über Desmin kräftig angefärbt, jedoch vollkommen frei von Cx40-Protein. Am Gefäßpol finden sich erneut an Cx40-Protein reiche Zellen, die, wie hier zu sehen, auch kein Desmin exprimieren. Inneres und äußeres Mark zeigen das bereits bekannte Muster aus lichtmikroskopisch jeweils vaskulär und tubulär erscheinenden Cx40-Protein-signalreichen Strukturen, in deren Wand Cx40- und Desmin-Protein in eng benachbarten Schichten gebildet werden.

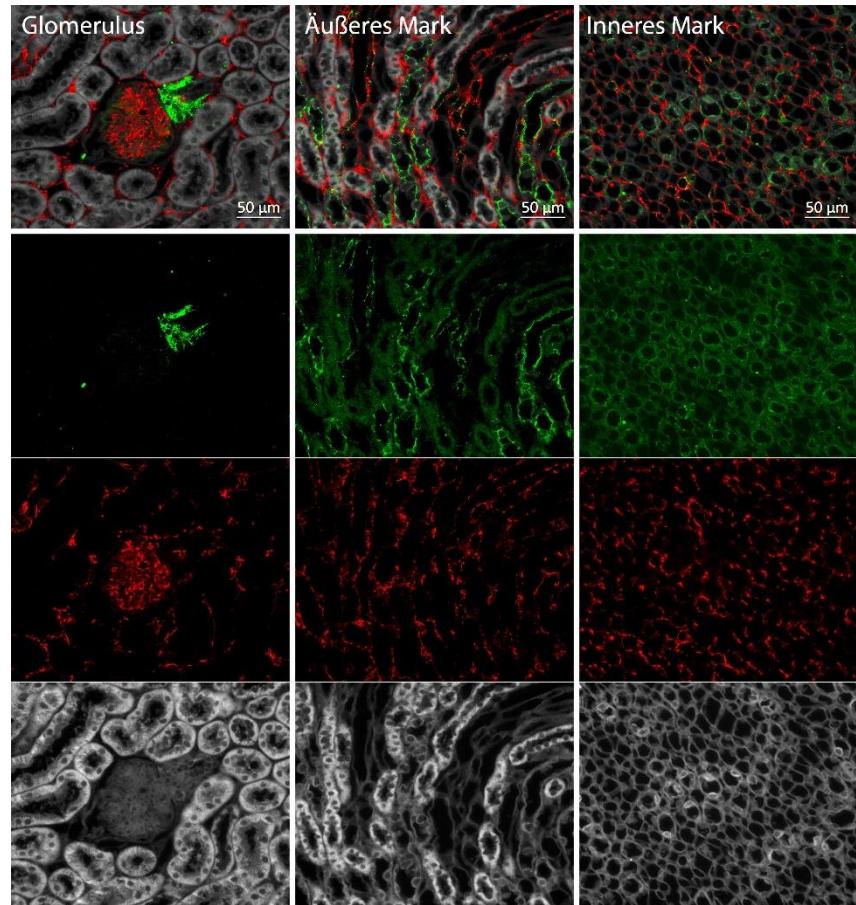


Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), Desmin (rot) und Durchlicht (weiß). Das intraglomeruläre Mesangium exprimiert nach dem Knockout kein Cx40-Protein mehr, dafür findet sich reichlich Cx40-Protein in Desmin-negativen Zellen im Bereich des Vas afferens. Auch sonst sind Cx40 und Desmin interstitiell weiterhin nicht co-lokaliert.

Abbildung 24 zeigt einen Glomerulus (mittig oben) mit dem dazugehörigen Vas afferens in einer Immunfluoreszenzaufnahme einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40 und Integrin angefärbt sind. Der distale Tubulus ist in der entsprechenden Position ebenfalls angeschnitten. Die Proteine sind zusätzlich jeweils als eigener Kanal vor einer Durchlicht-Aufnahme als Hintergrund dargestellt. Wie in Abbildung 22 und weiteren Abbildungen des Knockout-Modells ist auch hier eine ausgeprägte paraglomeruläre Cx40-Expression zu sehen, die in dieser Art in Wildtyp-Modellen nicht aufgetreten ist. Die Cx40-exprimierenden Zellen finden sich im Bereich des Vas afferens und des distalen Tubulus sowie einiger weiterer umliegender Zellen. Eine Co-Expression mit Integrin findet aber nicht statt. Der gleiche Bildausschnitt ist erneut in Abbildung 27 zu sehen.

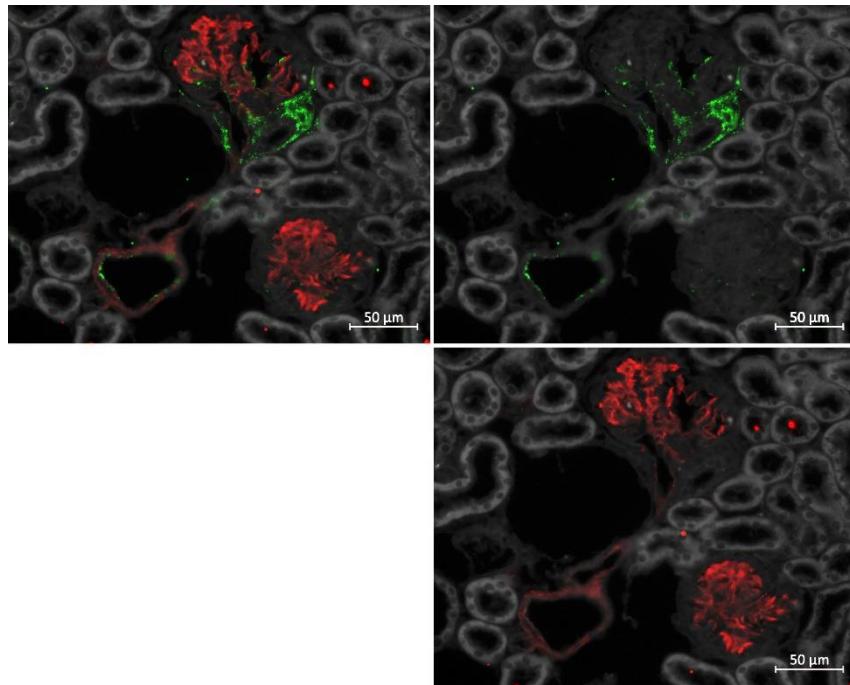


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), ITGA8 (rot) und Durchlicht (weiß).

3.3.3 Cx40-Expression in Renin-bildenden Zellen

Abbildung 25 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40, Renin und α -SMA angefärbt sind.

Der Verlust der Cx40-Expression im intraglomerulären Mesangium ist auch in dieser Abbildung deutlich zu erkennen. Die Co-Expression von Cx40-, Renin- und α -SMA-Protein im JGA findet auch im Knockout-Präparat statt. In den Abbildungen des äußeren Marks sind erneut Strukturen markiert, die Cx40-Protein exprimieren, solche mit lichtmikroskopisch vaskulärem Erscheinungsbild mit Pfeilen, die mit lichtmikroskopisch tubulärem Erscheinungsbild mit Kreisen. Im Mark findet sich keine Expression von Renin-Protein.

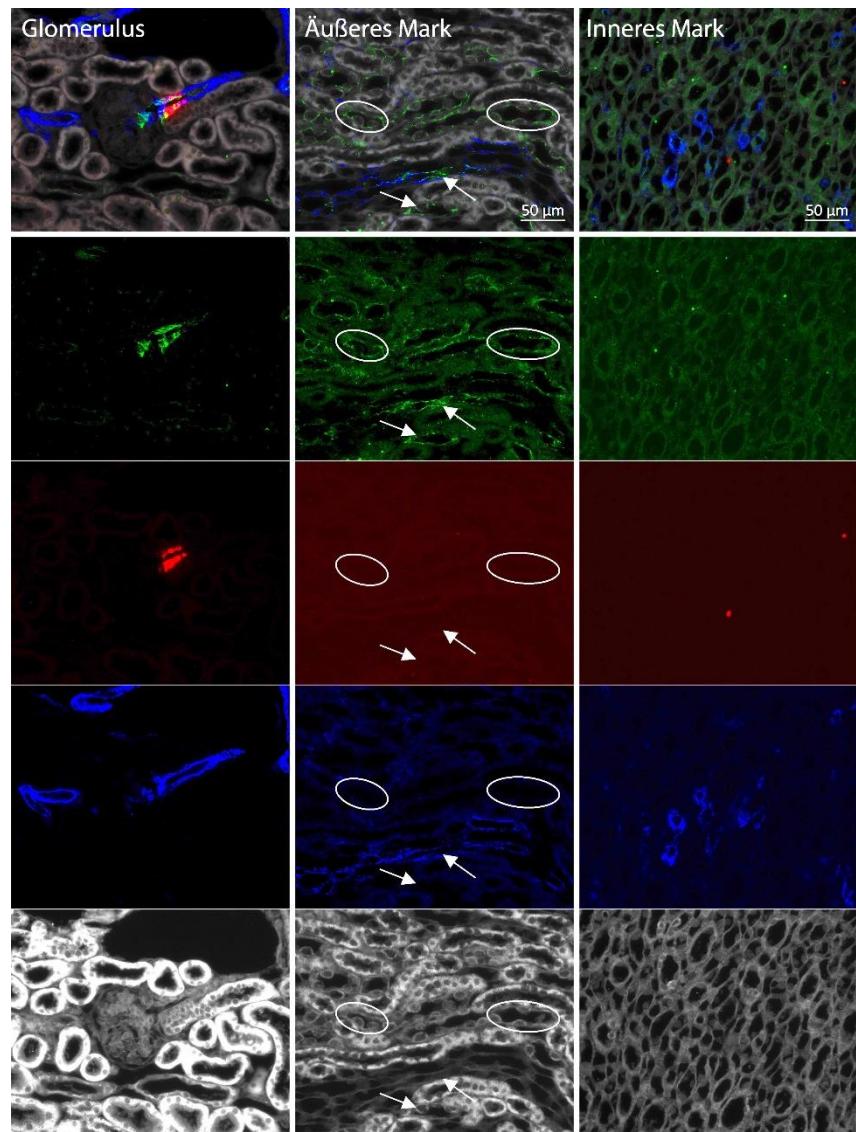


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), Renin (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Anders als im intraglomerulären Mesangium exprimieren die Zellen des JGA weiterhin Cx40, ebenfalls co-exprimiert mit Renin und α -SMA. Jenseits des Vas afferens kann auf Proteinebene erneut kein Renin-Protein nachgewiesen werden.

Abbildung 26 stellt zwei Glomeruli mit den zugehörigen Vasa afferentia in einer Immunfluoreszenzaufnahme einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40, Renin und α -SMA angefärbt sind, dar. Eines der beiden zuführenden Gefäße (rechts oben) zeigt eine Renin-Protein-Expression, wie sie bereits aus den basalen und fibrotischen Präparaten bekannt ist, während das andere zuführende Gefäß (links unten) sich durch eine ausgeprägte Rekrutierung von Reninzellen (rot) entlang der Gefäßwand auszeichnet. Wie die Abbildung sehr gut illustriert, tritt eine solche Rekrutierung nicht in jedem Vas afferens auf, jedoch häufiger und ausgeprägter als in den Wildtyp-Präparaten. Jede der Reninzellen exprimiert weiterhin Cx40-Protein.

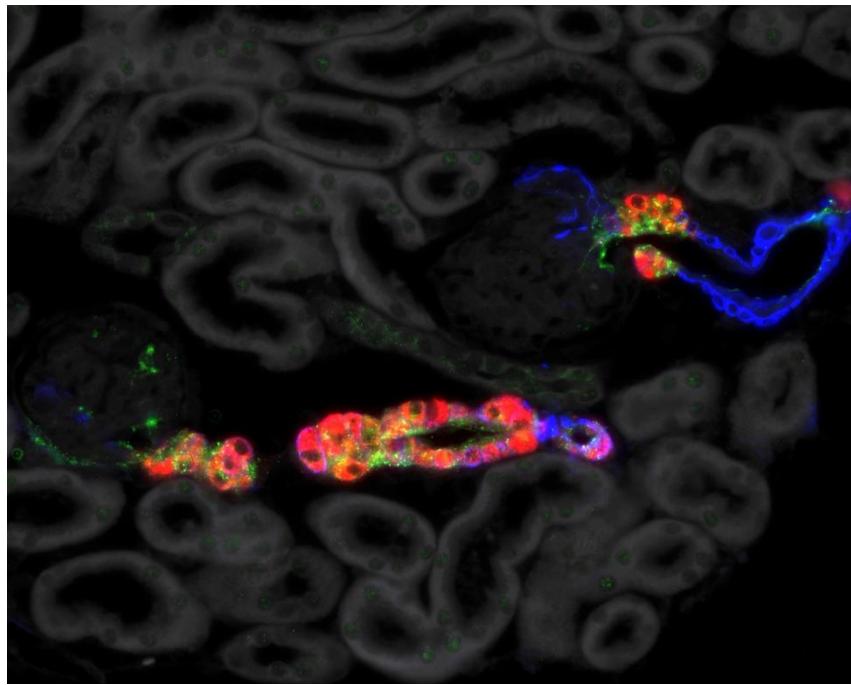


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), Renin (rot), α -SMA (blau) und Durchlicht (weiß). Rechts oben Vas afferens mit regulärer Renin-Protein-Expression. Links unten Vas afferens mit deutlicher Rekrutierung von Reninzellen entlang des Gefäßes, welche allesamt weiterhin Cx40- und α -SMA-Protein exprimieren.

Abbildung 27 zeigt einen Glomerulus (mittig oben) mit dem dazugehörigen Vas afferens in einer Immunfluoreszenzaufnahme einer Niere nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -positiven Zellen, in denen Cx40, Renin und α -SMA angefärbt sind. Der distale Tubulus ist in der entsprechenden Position ebenfalls angeschnitten. Die Proteine sind zusätzlich jeweils als eigener Kanal vor einer Durchlicht-Aufnahme als Hintergrund dargestellt. Der gleiche Bildausschnitt war bereits in Abbildung 24 zu sehen. Nachdem Abbildung 22 und Abbildung 24 eine Co-Expression des paraglomerulär verstärkt exprimierten Cx40-Proteins mit CD31 und Integrin nicht bestätigen konnten, stellt sich nun eine deutliche Co-Expression mit Renin-Protein dar, welches hier am gesamten Gefäßpol verteilt gebildet wird.

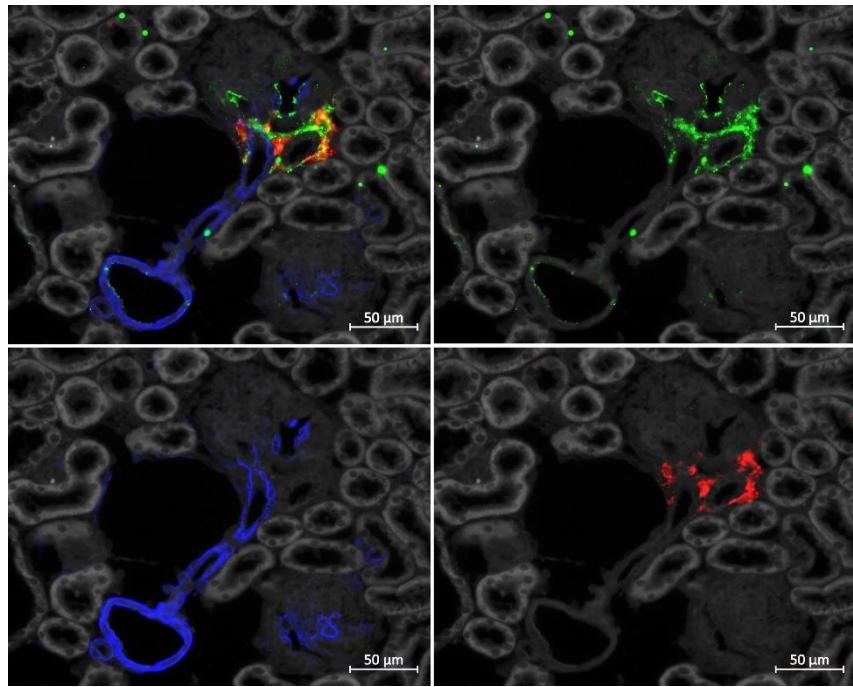


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung einer Niere mit Cx40-Defizienz in PDGFR β -positiven Zellen mit Cx40 (grün), α -SMA (blau) und Renin (rot) und Durchlicht (weiß). Die ausgeprägte Cx40-Protein-Expression am Gefäßpol des Glomerulus (mittig oben) findet unter Co-Expression von Renin-Protein, aber ohne Co-Expression von α -SMA statt.

Die Analyse von Abbildung 22 bis Abbildung 27 ergibt, dass nach Knockout von Cx40 in PDGFR β -exprimierenden Zellen wie erwartet kein Cx40 mehr durch das intraglomeruläre Mesangium gebildet wird. Eine kompensatorische Erhöhung der Cx40-Protein-Expression findet teilweise im Zuge der Rekrutierung von Renin-exprimierenden Zellen in der Wand des Vas afferens und verteilt am Gefäßpol des Glomerulus statt (s. Abbildung 22, Abbildung 24 und Abbildung 27), wobei Renin- und Cx40-Protein immer co-exprimiert auftreten. Ein Co-Expression Cx40-, Renin- und α -SMA-Protein tritt dabei aber nur in der Wand des Vas afferens auf (s. Abbildung 27). Eine Co-Expression von Cx40- und Renin-Protein mit CD31- oder Integrin-Protein konnte nie dargestellt werden. Medullär wird wie zuvor Cx40-Protein ohne Co-Lokalisation von CD31-Protein in den Wänden lichtmikroskopisch tubulär erscheinender Strukturen dargestellt, wobei für das Knockout-Modell keine ISH-Präparate zum Vergleich vorliegen. Eine weitere Veränderung in der Expression der untersuchten Proteine konnte nicht beobachtet werden. Zum sicheren Ausschluss einer neuartigen Co-Expression von Cx40- und α -SMA-Protein im Knockout-Präparat wäre eine zusätzliche ISH-Färbereihe erforderlich.

4 Diskussion

4.1 Ziel der Studie

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Expression von Connexin 40 in der gesunden Mäuseniere (s. Kapitel 3.1), von Veränderungen der Expression von Connexin 40 in der fibrotischen Mäuseniere (s. Kapitel 3.2), sowie die Auswirkungen eines Connexin-40-Knockouts in PDGFR β -positiven Zellen auf die Expression von Proteinen zur Beurteilung der basalen Nierenfunktion (s. Kapitel 3.3). Zur Lokalisation der zu untersuchenden Proteine wurden zwei histologische Methoden angewendet und miteinander verglichen: die Immunfluoreszenzfärbung (IF) zur Darstellung von Protein und die in-situ-Hybridisierung (ISH) mittels RNAscope[®] zur Darstellung der entsprechenden mRNA. Anhand dieser histologischen Analysen wiederum sollten Rückschlüsse auf die Rolle von Connexin 40 in der Nierenfibrose gezogen werden.

4.2 Befunde und Studienlage

4.2.1 Basale Niere

Cx40 wird mittels IF und ISH im basalen Nierengewebe im intraglomerulären Mesangium (IGM) und im angrenzenden juxtaglomerulären Apparat (JGA) mit Schwerpunkt auf den Reninzellen sowie im Endothel aller renalen Gefäße mit Ausnahme der intraglomerulären Kapillarschlingen exprimiert. Die IF stellt Cx40-Protein zusätzlich auch in CD31-negativen Hohlstrukturen im Mark dar, die wir anhand des lichtmikroskopischen Erscheinungsbilds als Tubuli identifizieren. Die ISH-Aufnahmen konnten diese Beobachtungen allerdings weder im basalen noch in einem der fibrotischen Modelle bestätigen.

Laut einem Review von Hanner et al (2010) konnte Cx40 auf Protein- und mRNA-Ebene mehrfach in den kompletten präglomerulären Nierengefäßen von Mäusen und Ratten, sowie auch in den postglomerulären Vasa recta beider Nagetierspezies nachgewiesen werden. In Mäusen konnte außerdem mehrfach durch Immunfluoreszenzfärbung im gesamten intraglomerulären Mesangium Cx40 dargestellt werden.(18) Abweichende Ergebnisse präsentieren Seul und Beyer (2000), welche im unmittelbar juxtaglomerulären Abschnitt der afferenten und efferenten Arteriole keine Expression von Cx40-Protein in der Gefäßwand, wie auch keine Cx40-Protein-Expression in Vasa recta feststellen konnten. Darüber hinaus beschreiben sie, dass sich das Färbungsmuster von Cx40 von demjenigen von Desmin und Fibronectin intraglomerulär klar unterscheiden würde und, da außerdem extraglomeruläres Cx40 endothelial exprimiert werden würde, intraglomeruläres Cx40 am ehesten ebenfalls durch das Endothel statt durch Mesangiumzellen oder Podozyten exprimiert werden müsse.(19) Diese Studie zeichnet sich dadurch aus, dass keine Zellmarker zur Identifizierung von Endothelzellen verwendet wurden, was für die Zuordnung der Cx40-Expression lediglich unsicherere lichtmikroskopische Aspekte übrig lässt.(19) Wir interpretieren die Zuordnung der Cx40-Expression zu

intraglomerulären Endothelzellen als Falschannahme in der Folge des Verzichts auf die Verwendung von endothelialen Zellmarkern. Der beschriebene Abbruch der Connexin-Expression am Übergang zwischen dem extraglomerulären zum intraglomerulären Endothel resultiert am ehesten aus der oben genannten Überzeugung, da Seul und Beyer von einer intraglomerulären endothelialen Cx40-Expression ausgehen und deshalb keinen Abbruch der Cx40-Expression im Endothel beim Übergang in den Glomerulus erwarten, der aber stattfinden muss, wenn statt des intraglomerulären Endothels nur das IGM Cx40 exprimiert. Auch der nicht darstellbare Nachweis von Cx40 in Vasa recta kann auf die nicht stattgehabte Verwendung von Gefäßmarkern zurückzuführen sein. Die Verwendung dickerer Präparatschnitte, respektive 10 µm zur Darstellung von Glomeruli oder 40 µm zur Darstellung von Glomeruli mit zu- und abführender Arteriole, kann gerade im glomerulären Bereich durch Überlagerung die Zuordnung von Fluorophoren erschwert haben. Cx40-Expression durch das intraglomeruläre Endothel wurde ebenfalls durch Haeflinger et al. (2001) beschrieben, die zwar für die Lokalisation des Proteins neben IF auch ISH mit zwei unterschiedlichen Sonden auf Cx40-cDNA und Elektronenmikroskopie verwendeten, aber ebenfalls weder Marker für Endothel- noch für Mesangiumzellen.(20) In zwei späteren Studien durch Zhang und Hill (2005) und Takenaka et al. (2008) wurde jeweils die Expression von Cx40 durch IGM-Zellen, statt durch intraglomeruläres Endothel beschrieben. Beide Studien verwendeten Zellmarker für Endothel- und Mesangiumzellen (21,22) und kommen so mit ähnlichen Methoden zum selben Ergebnis wie wir. Möglich wäre schlussendlich eine Expression von Cx40 hauptsächlich durch IGM-Zellen und zu einem geringen Grad durch intraglomeruläres Endothel, wie zuvor bereits bei Geis et al. (2021) beschrieben, wobei die zugrundeliegenden Beobachtungen, wie durch die Autoren eingeräumt, durch den Schnitt des Präparats bedingt sein könnten.(15) Mittels IF konnte in Mäusenieren durchgehend ein hohes Vorkommen von Cx40 in den Renin-bildenden Granulazellen und den extraglomerulären Mesangiumzellen dargestellt werden.(15,18,23) Hanner et al. (2010) benennen keine Studie, die Cx40-Expression in glatten Muskelzellen der Gefäßwand oder in Tubuluszellen von Nagetieren beschreibt.(18) Ložić et al. (2021) konnten lediglich postnatal bei bis zu zwei Wochen alten Mäusen eine Expression von Cx40 im proximalen und distalen Tubulus mittels IF darstellen.(24) Bei Untersuchungen an prä- und postnatalen menschlichen Nieren im Alter zwischen 8 Wochen und 1,5 Jahren allerdings gelangen Kosovic et al. (2020) die Darstellung Cx40 im Tubulussystem in teilweise hoher Konzentration durch IF.(25) Die letzteren beiden Studien sind aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen mit unseren Ergebnissen eingeschränkt zu vergleichen. Bezuglich glatter Muskel- und Reninzellen decken sich die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen gemachten Beobachtungen daher erneut mit unseren Analysen, während vor dem Hintergrund der beschriebenen Daten und unserer Beobachtungen auf mRNA-Ebene die durch uns mittels IF beobachtete Cx40-Expression in Tubuli weniger plausibel erscheint, eine Expression von Cx40 durch Tubuli in einem anderen Organalter oder einer anderen Spezies allerdings naheliegend. Dies wiederum würde bedeuten, dass Zellen des Tubulussystems

verschiedener Spezies prinzipiell über die Fähigkeit zur Expression von Cx40 verfügen, auch wenn diese unter physiologischen Bedingungen in der adulten Maus nicht auftritt. Für unphysiologische Bedingungen, wie bei der hier untersuchten fibrotischen Niere, kann die Frage nach einer tubulären Cx40-Expression daher nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

4.2.2 Fibrotische Niere

Auch in der fibrotischen Niere wird Cx40 im intraglomerulären Mesangium und im Bereich des juxtaglomerulären Apparats exprimiert, wobei erneut die Renin-bildenden Granulazellen mit besonders hoher Expression hervorstehen. Wie in der basalen Niere wird Cx40 im extraglomerulären Endothel exprimiert, wobei besonders die Expression im Endothel der Vasa recta gegenüber der basalen Niere verstärkt ist. Auch im inneren Mark der fibrotischen Niere stellen IF und ISH eine verstärkte Expression von Cx40 dar, die besonders in den Übersichtsaufnahmen gut sichtbar ist. Da allerdings eine tubuläre Cx40-Expression nur mit IF und nicht in der ISH dargestellt werden konnte, ist nicht sicher, von welchem Zelltyp diese verstärkte Expression ausgeht. Bei stärkerer Vergrößerung konnte die ISH im Adenin-Modell tatsächlich eine geringe Cx40-mRNA-Expression im Interstitium darstellen, wobei die Korrelation mit einer konkreten dafür verantwortlichen Zellpopulation anhand der vorliegenden Präparate nicht möglich war. Die in den Übersichtsaufnahmen sichtbare Überexpression von Cx40 ist durch dieses Phänomen aber nicht ausreichend erklärt.

Veränderungen der Expression verschiedener Connexine im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung konnten durch mehrere Studien dargestellt werden. Wie genau verschiedene Connexine die der chronischen Nierenerkrankung zugrunde liegenden Pathologien beeinflussen, ist noch unklar,(26) so grundsätzlich auch, ob die Veränderung der Connexinexpression Ursache oder Folge von Nierenerkrankungen darstellt.(15) Das diesbezüglich aktuell wahrscheinlich am besten erforschte Connexin ist Cx43, für welches etwa im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung eine Veränderung der Expressionslevel in geschädigten Zellen sowie eine Beeinflussbarkeit der entzündlichen und fibrosierenden Prozesse und in der Folge des Krankheitsverlaufs über die Modellierung der Connexin-Funktion nachgewiesen werden konnte, sodass die Verwendung dieses Connexins als therapeutischer Angriffspunkt bereits diskutiert wird.(26,27)

Die Expression von Cx40 unter den pathologischen Bedingungen von Nierenerkrankungen ist bisher weniger häufig untersucht worden, doch zeigen auch dafür einige Studien Veränderungen der Connexin-Expression unter Stoffwechselstress und im Rahmen von primären Nierenerkrankungen. Zhang und Hill (2005) und Zhang et al. (2006) zeigten in mit Streptozotocin behandelten Mausmodellen, einer auf die Insulin-produzierenden Beta-Zellen des Pankreas toxisch wirkenden Substanz, die eine diabetische Stoffwechselentgleisung bewirkt, mittels IF eine vermehrte Expression von Cx40 in den

glatten Muskelzellen der afferenten Arteriolen und im Inneren des Glomerulus.(21,28,29) O. Zeng et al (2016) konnten stattdessen mittels IF und Western Blot eine drastisch reduzierte Expression von Cx40, Cx43 und Cx45 in diabetischen Nierenmodellen nach Streptozotocin-Therapie darstellen.(30) Aus unserer Sicht liegen keine ausreichenden methodischen Unterschiede zwischen den Studien vor, die diese drastischen Unterschiede zwischen den gemachten Beobachtungen im Streptozotocin-Modell auf naheliegende Weise begründen könnten. Die in diesen Studien untersuchten Nierenmodelle unterscheiden sich aber von den durch uns verwendeten Modellen durch die zur Organschädigung führende Noxe: einerseits die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage mit sekundär auftretender Nierenschädigung im Sinne einer diabetischen Glomerulopathie, die in der tubulo-interstitiellen Fibrose mündet, andererseits die direkt toxische Wirkung von Adenin. Für den direkten Vergleich sind diese Studien daher nicht geeignet, die gemeinsame Beobachtung ist lediglich die Variabilität der Expression von Connexin 40 im Rahmen pathologischer Stoffwechselbedingungen.

Dass bei unterschiedlichen Arten von Gewebeschädigung unterschiedliche Veränderungen der Expression von Cx40 auftreten, spricht für die Involvierung des Connexins in den stattfindenden pathophysiologischen Prozessen. Tatsächlich konnten die Expressionslevel von Cx40 und Cx43 durch andere Autoren mit der Bildung von H₂S korreliert werden, einer Substanz, für die im Rahmen von renalen Erkrankungen eine Unterdrückung von Entzündungsprozessen und oxidativem Stress sowie eine Hemmung der Aktivierung von Fibrose-assoziierten Zelltypen und deren Zytokin-Expression, sowie eine Hemmung des fibrotischen Gewebeumbaus aufgewiesen werden konnte.(26,31) In Anbetracht dessen könnte Cx40 einen ähnlich vielversprechenden Angriffspunkt für die Therapie der chronischen Nierenerkrankung bedeuten, wie das bisher besser untersuchte Cx43.

Die beobachtete sporadische interstitielle Cx40-Expression in fibrotischem Nierengewebe, die explizit nicht von Endothelzellen ausgeht, könnte die Folge der oben in verschiedenen Zusammenhängen beschriebenen Reaktivität der Cx40-Expression im Rahmen pathophysiologischer Prozesse sein. Ob dieser Befund der Realität entspricht oder inzidentell ist, müssen wir auch aufgrund der spärlichen Studienlage bis auf weiteres offenlassen. Zwar ist eine neuartige Expression des Connexins in der homöostatischen Krise vorstellbar, die Relevanz des Phänomens bliebe angesichts des sporadischen Auftretens aber fraglich.

Unsere Analysen stellen dar, dass PDGFR β -positive Zellen außerhalb des Glomerulus auch in der fibrotischen Niere kein Cx40 exprimieren. Dazu gehören auch die für die Fibrosierung elementaren Myofibroblasten und deren Vorläuferzellen. Vor diesem Hintergrund ist eine Involvierung von Cx40 in diese Prozesse nicht naheliegend und die Rolle dieses Connexins für die Entwicklung und das Fortschreiten der Fibrose kann als eher gering eingeschätzt werden.

4.2.2.1 Reninexpression

Neben dem Hauptziel der Arbeit wurde in Bezug auf die Expression und Lokalisation der verwendeten Zellmarker eine weitere Beobachtung gemacht. Mittels ISH konnte in basalen Nieren vereinzelt eine geringfügige Expression von Renin in PDGFR β -positiven und Cx40-negativen interstitiellen Zellen, besonders am Übergang von der Rinde zum Mark, aufgezeigt werden. In der fibrotischen Niere zeigten IF und ISH eine Rekrutierung von Renin-exprimierenden Zellen entlang der vasa afferentia. Die ISH stellte darüber hinaus eine ausgeprägte Expression von Renin-mRNA durch Zellen im Bereich der vasa recta dar, ebenfalls co-exprimiert mit PDGFR β , aber ebenfalls *nicht* mit Cx40. Diese trat zuverlässig in jedem fibrotischen ISH-Präparat wie auch im ISH-Präparat der kontralateralen, nicht-fibrotischen UUO-Niere auf, konnte aber in keinem fibrotischen oder nicht fibrotischen IF-Präparat auf Proteinebene reproduziert werden. Eine Renin-Expression ohne Cx40-Co-Expression wäre bemerkenswert, da man Cx40 in den juxtaglomerulären Renin-Zellen eine bedeutende Funktion bei der Regulation der Renin-Sekretion zuschreibt, während eine unregulierte Renin-Expression mit der Pathogenese der Fibrose im Zusammenhang steht.

Die Diskrepanz zwischen Renin-mRNA- und -protein-Expression könnte durch die Bildung von Prorenin, der inaktiven Vorstufe von Renin, dessen N-terminales Propeptid die enzymatisch aktive Spalte des Enzyms bedeckt, verursacht werden, welches möglicherweise nicht durch die Antikörper der Immunfluoreszenz gebunden wird, dessen mRNA aber möglicherweise durch die Renin-mRNA-Sonden nachgewiesen werden konnte. Da Prorenin durchaus stoffwechselregulierende Funktionen über den Prorenin-Rezeptor erfüllen kann, welcher wiederum durch Studien mit der Entstehung einer Organfibrose in Verbindung gebracht wurde, könnte die beobachtete deutlich vermehrte Expression von Renin-mRNA tatsächlich relevant für die Gewebshomöostase im untersuchten fibrotischen Präparat sein.(32,33) Möglich ist außerdem, dass die in der ISH detektierte Renin-mRNA prätranslational abgebaut wird oder es aus anderen Gründen nicht zum Zusammenbau des Renins kommt, wodurch es wiederum möglich wäre, dass der beobachteten Veränderung keine Bedeutung für den Nierenstoffwechsel zukäme. Die vereinzelt und spärlich auftretende perizytäre Renin-Expression im basalen Niereninterstitium interpretieren wir ebenfalls als Zeichen für die im Verlauf der Entwicklung erhaltene Reagibilität der perizytären Renin-Expression, auf die wir im folgenden Absatz erneut eingehen. Zusätzlich stellt sich die Frage, warum die entlang der vasa recta rekrutierten Renin-mRNA-exprimierenden Zellen nicht gleichzeitig Cx40 exprimieren, wie es in juxtaglomerulären Zellen stets der Fall ist. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Cx40 zwar Bedeutung in der interzellulären Kommunikation und so eventuell in der Regulation sekretorischer Funktionen zukommt, die Expression von Renin unter bestimmten Bedingungen allerding auch ohne das Vorhandensein Cx40-haltiger Connexone und Gap Junctions stattfinden kann. Die betroffenen Zellen würden so eventuell zur Renin-Sekretion beitragen,

aber einer geringeren Regulation unterliegen, was im Einklang mit der starken Assoziation des RAAS und spezifisch von Renin, aber auch Prorenin, mit der Entstehung und Progression der Nierenfibrose steht.(32–38)

Bezüglich Renin konnte eine hohe Variabilität der Expression in Mäusen während der Embryonalzeit, aber auch unter pathologischen Bedingungen wie bei homöostatischen Veränderungen oder Anämie mehrfach beobachtet werden.(7,8,37,39,40) Perizyten teilen die gleichen Vorläuferzellen wie Reninzellen und sind in juvenilen Mäusen oder unter pathologischen Bedingungen zusammen mit glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) als Quelle der atypischen Renin-Expression identifiziert worden, wobei VSMCs sich ihrerseits aus Perizyten differenzieren.(7,8,41) In der adulten Mäuseniere konnte unter physiologischen Bedingungen mittels Immunfluoreszenz aber noch keine Renin-Expression in Perizyten dargestellt werden.(7) Umgekehrt konnten Renin-bildende Zellen der afferenten Arteriole menschlicher Nieren *in vivo* durch Stefanska et. al (2016) als Perizyten identifiziert werden, wobei darüber hinaus in Zellkulturen von humanen renalen Perizyten unter cAMP-Stimulation ebenfalls eine Renin-Expression stattfand und auch metabolisch aktives Renin nachgewiesen werden konnte. Auch in extrarenalen Perizyten wie etwa in der Plazenta konnte die Gruppe mittels Immunfluoreszenz Renin-Protein nachweisen, das allerdings nach der Freisetzung zu über 90 % metabolisch inaktiv war.(8) Studien an Perizyten in der fibrotischen Niere sind zwar durchgeführt worden, eine atypische Renin-Expression durch Perizyten nach Adenin-induzierter Fibrose wurde konkret aber bisher nicht beschrieben. Zu den spezifischen von uns gewählten Versuchsbedingungen fanden wir daher keine direkt vergleichbaren Studien. Wie oben bereits hervorgehoben, wäre eine Bildung von Renin in Zellen, die kein Cx40 exprimieren, eine Besonderheit, da nicht nur die nach aktuellem Kenntnisstand über Cx40 vermittelte Regulation der Renin-Ausschüttung entfallen würde, sondern auch, weil eine Rekrutierung von ektopischen, Renin-sekretierenden Zellen in Mäusemodellen nach Langzeit-Salzentzug und / oder Enalapril-Therapie immer zusammen mit einer Cx40-Expression in diesen Zellen stattfand. Das könnte ein Hinweis darauf sein, wie gravierend die Veränderungen im Stoffwechsel der fibrotisch erkrankten Niere sind und warum sich diese im Sinne eines *circulus vitiosus* fortentwickeln.

4.2.3 Cx40-Knockout in PDGFR β -positiven Zellen

Um die Bedeutung des Connexins für die Fibrosierung der Mäuseniere funktionell zu untersuchen, wäre es von Vorteil, ein Nierenmodell zu analysieren, in welchem die genannten PDGFR β -exprimierenden Zellen keine Möglichkeit der Cx40-Expression mehr haben. Durch uns wurde in Vorarbeiten untersucht, ob in einem entsprechenden Knockout-Modell bereits unter basalen Bedingungen eine weiterführende Veränderung der Cx40-Expression auf Proteinebene stattfindet.

In diesen Präparaten konnte neben der nun vollständig fehlenden intraglomerulären Cx40-Expression zum einen eine Rekrutierung von Renin-exprimierenden Zellen entlang des Vas afferens, die Cx40 und α -SMA und kein Integrin exprimieren, sowie eine vermehrte Expression von Renin am Gefäßpol des Glomerulus durch Zellen, die nur Cx40 aber kein α -SMA oder Integrin exprimieren, beobachtet werden. Sonst stellte sich die Cx40-Expression genauso dar wie in der basalen Wildtyp-Niere und eine Allgemeinveränderung des Präparates wie insbesondere eine pathologische Fibrosierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine erhöhte Anzahl Renin-sekretierender Zellen und erhöhte Ausschüttung von Renin mit subsequenter Hypertonie in durch IF und ISH untersuchten Cx40-Knockout-Modellen (Cx40-/-) oder bei pharmakologischer Blockade der Cx40-Funktion wurde bereits durch mehrere Gruppen beschrieben, wobei im Knockout-Modell zusätzlich eine Dislokation und morphologische Veränderungen der Reninproduzierenden Zellen stattfinden.(22,42–47) Im Unterschied zu unserem partiellen Knockout wurde im globalen Cx40-Knockout-Modell allerdings eine vollständige Dislokation der Renin-exprimierenden Zellen von der afferenten Arteriole in den Glomerulus, das EGM und das periglomeruläre Interstitium berichtet.(45) Das bei einem partiellen Knockout eine partielle Dislokation der Zellen stattfindet, scheint plausibel. Verdeutlicht wird dabei erneut die elementare Bedeutung der Connexinfunktion für die Regulation der Reninsekretion.

Bekräftigt ist auch der Verdacht, dass das Protein für die Funktionalität mesenchymaler Zellen nicht elementar ist, da sonst bei einem kompletten Funktionsverlust des Proteins Veränderungen an dieser Zellpopulation zu erwarten wären. Eine Analyse auf mRNA-Ebene sowie eine Untersuchung des Modells nach Fibroseinduktion steht aus, wobei eine neuartige Co-Expression von Cx40 durch extraglomeruläre Perizyten oder Myofibroblasten mit höherer Sicherheit ausgeschlossen und im fibrotischen Modell eine eventuelle fibrinogene Wirkung des Proteins deutlich gemacht werden könnte.

4.3 Methodische Limitierung

Die größte Herausforderung bei der Anwendung der Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung besteht wohl in der Interpretation der histologischen Befunde unter Berücksichtigung der Spezifität beider Methoden. Insbesondere die Diskrepanzen bei der Darstellung von einerseits Cx40-Protein-Signal in den Wänden des Tubulussystems in der IF, die per ISH nicht bestätigen werden konnte, andererseits von Renin-mRNA-Signal entlang der Vasa recta in fibrotischen Präparaten, die die ISH, nicht aber die IF dargestellt hatte. Eine Argumentation ist möglich, nach welcher diese Diskrepanzen die Realität wiedergeben, da die Methoden nicht dieselben histologischen Zusammenhänge untersuchen. Ebenso jedoch könnte ein Validitätsproblem mindestens einer der beiden Methoden vorliegen, das zur Färbung eines anderen als dem gesuchten Protein oder RNA-Molekül führt. Besonders

immunhistochemische Befunde könnten je nach eingesetztem Antikörper oder den spezifischen Versuchsbedingungen, wie der Vorbereitung des Gewebes und der Temperatur oder Inkubationsdauer bei der Antigen-Antikörper-Reaktion variieren. Es besteht die Hoffnung, dass der RNAscope®, der auf der Hybridisierung umschriebener Nukleotidsequenzen statt der chemischen Reaktion dreidimensionaler Proteinstrukturen basiert und einem standardisierten Protokoll folgt, sensitivere, spezifischere und reproduzierbarere Resultate erzeugt. Gleichzeitig muss bei diesem Verfahren die Frage gestellt werden, inwiefern die auf mRNA-Ebene gemachten Befunde auf Proteinebene übertragbar sind, da mRNA nicht zwingend translatiert werden muss, eine biologisch relevante Proteinsynthese auch bei mRNA-Konzentrationen möglich ist, die unterhalb der Nachweisgrenze des RNAscope® liegen und Proteine schließlich unterschiedlich schnell synthetisiert und abgebaut werden können, weshalb die mRNA-Konzentration nicht mit Proteindichte gleichzusetzen ist. Die kombinierte Interpretation beider Studien führt zu einer gegenseitigen Probe der Verfahren, ermöglicht aber weiterhin keine absolute Sicherheit bei der Beantwortung histologischer Fragestellungen.

Für die Zuordnung der Cx40-Protein- und -mRNA-Signalpunkte wurden in dieser Arbeit Markerproteine und -mRNA verschiedener Zelltypen verwendet. Die Zuordnung von Cx40-Protein-Signalen zu Zellen des Tubulussystems ist allerdings stets auf Grundlage des lichtmikroskopischen Erscheinungsbilds dieser Zellen und der fehlenden Zugehörigkeit zu einer der mit Markern identifizierbaren Zelltypen vorgenommen worden. Durch den Einsatz von tubulären Markern hätte man diese Annahme unterlegen können.

In Anbetracht der vereinzelt abgrenzbaren Farbsignale im RNAscope® ist die Anwendung eines Auszählschemas oder der Berechnung eines Flächenanteils der Signale zum Vergleich der Expression von Connexin 40 und der verwendeten Markerproteine in verschiedenen Präparaten diskutabel. Während so möglicherweise eine bessere Objektivierbarkeit der Versuchsergebnisse erzielt werden könnte, ist unserer Meinung nach besonders angesichts der unterschiedlichen Größe der Präparate und der dennoch oft auftretenden Konfluenz der Farbsignale eine numerische Vergleichbarkeit kaum gegeben. Die Messung von Flächenanteilen der Markersignale am Präparat könnte, wenn auch unter deutlich erhöhtem technischem Aufwand, einen Mehrwert zu dem durch uns gewählten Verfahren erzeugen.

4.4 Physiologische Bedeutung von Connexin 40

Die Funktion von Cx40 in der Niere unter physiologischen Bedingungen wird bereits seit über 20 Jahren untersucht und ist dementsprechend gut bekannt. Als Baustein der für die Kommunikation zwischen Zellen elementaren Gap Junctions kommt dem Connexin eine wichtige Rolle für die Regulation verschiedener Prozesse zu, wobei im Vordergrund die Autoregulation des renalen Blutflusses, genauer

des Vasotonus und der Ausschüttung von Renin, steht. Erstere ist assoziiert mit der Expression der Stickstoffmonoxid-Oxidase (eNOS), welche durch NO-Freisetzung den Vasotonus senkt, und der Kommunikation von Endothelzellen über Kalziumionen, letztere mit der Kopplung zwischen myoepithelialen Reninzellen im juxtaglomerulären Apparat und dem Endothel, ohne welche sich die Reninfreisetzung nicht mehr adäquat an den bestehenden Blutdruck anpasst und übermäßig ausgeschüttet wird. Die Anpassung der Renin-Ausschüttung bei veränderter Salzaufnahmemenge und β -adrenerger Stimulation bleibt bei Cx40-Dysfunktion erhalten. Dennoch wird eine Involvierung des Connexins auch in das tubuloglomeruläre Feedback vermutet. Beim Funktionsausfall des Connexins entsteht über dysregulierte renale Vasokonstriktion und Renin-Ausschüttung Bluthochdruck mit einer Dislokation der Renin-sekretierenden Zellen.(22,42–45,47–50)

Die beschriebene funktionelle Bedeutung konnten wir mit der Expression von Cx40-mRNA und -Protein im intraglomerulären Mesangium und dem juxtaglomerulären Apparat, besonders den Renin-Zellen, sowie dem extraglomerulären renalen Endothel korrelieren. Eine tubuläre Cx40-Expression ließe sich weniger gut mit einer der aus der Literatur bekannten Funktion des Connexins in Einklang bringen.

4.5 Bedeutung von Connexin 40 in der fibrotischen Niere

Die Expression von Cx40 in der fibrotischen Niere ist deutlich seltener Objekt von Studien geworden: die Suche in PubMed mit den Stichworten „Cx40“, „Kidney“ und „Fibrosis“ liefert lediglich fünf Resultate, die bei Ersatz des Stichwortes „Fibrosis“ durch „Diabetes“ durch weitere neun Resultate ergänzt werden, alle Treffer mit variierender Relevanz (Stand 07.05.2023). Bisher konnte in Streptozotocin-Modellen zweimal eine gesteigerte, einmal eine verminderte Expression von Cx40 dargestellt werden (s. Kapitel 4.2.2), wobei das Streptozotocin-Modell nur eingeschränkt mit den durch uns verwendeten Adenin- und UUO-Modellen vergleichbar ist. Unsere Studie beschreibt eine verstärkte Expression des Connexins in beiden Fibrosemodellen, die aber nicht von PDGFR β - oder α -SMA-positiven Zellen ausgeht, was eine Involvierung von Cx40 in die zur Fibrose führenden pathophysiologischen Prozesse unwahrscheinlicher macht. Eine vermehrte Expression des Connexins durch Renin- oder Endothelzellen spricht dagegen eher für eine Bedeutung in der Reaktion des Gewebes auf die veränderte Homöostase, insbesondere die veränderte Durchblutung des Nierengewebes, im Rahmen des fibrotischen Umbaus. Dabei geht aus unseren Untersuchungen nicht hervor, ob Cx40 in dieser Rolle pro- oder antifibrotisch wirkt. Da Cx40 allerdings für die Regulation der Renin-Ausschüttung elementar ist, die ihrerseits bedeutend für die Pathophysiologie der Nierenfibrose ist, könnte Cx40 durchaus einen nephroprotektiven Effekt aufweisen.

Weitere Studien zur Funktion von Cx40 in der Niere könnten einen Knockout des Connexins in einem fibrotischen Nierenmodell untersuchen. Die starke Assoziation von Cx40 mit der Funktion von Renin wird für histologische und funktionelle Studien von großer Bedeutung bleiben.

5 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (WEIß) UND DAPI (BLAU). Cx40-mRNA TRITT GEHÄUFT IN DEN IM CORTEX BEFINDLICHEN GLOMERULI UND ENTLANG VON GEFÄßEN AUF. IM MARK WIRD DIE RNA GLEICHMÄßIG UND SCHWÄCHER EXPRIMIERT.....	28
ABBILDUNG 2: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (ROT), CD31 (GRÜN) UND DAPI (BLAU). EINE KLARE CO-EXPRESSION VON Cx40- UND CD31-mRNA IST IN DEN ENDOTHELIALEN ZELLEN DER RENALEN GEFÄßE IM CORTEX, ÄUßEREN MARK UND INNEREM MARK ZU FINDEN. ENDOTHELZELLEN IM GLOMERULUS WEISEN KEINE Cx40-EXPRESSION AUF.....	30
ABBILDUNG 3: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (ROT), A-SMA (GRÜN) UND DAPI (BLAU). A-SMA-mRNA WIRD IN GROßER MENGE DURCH ZELLEN DER GEFÄßWAND UND IN GERINGERER MENGE DURCH ZELLEN IM INTERSTITIUM EXPRIMIERT. AUßER DEN RENIN-PRODUZIERENDEN JUXTAGLOMERULÄREN ZELLEN EXPRIMIERT JEDOCH KEINE DIESER ZELLEN GLEICHZEITIG AUCH Cx40-mRNA.....	31
ABBILDUNG 4: IMMUNFLUORESENZFÄRBUNG EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (GRÜN), CD31 (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). Cx40 UND CD31 SIND IM INTRAGLOMERULÄREN ENDOTHEL NICHT CO-LOKALISIERT, IM ENDOTHEL DES ÄUßEREN MARKS SIND SIE CO-LOKALISIERT. IM INNEREN MARK SIND Cx40-PROTEIN-SIGNALTEILE TEILWEISE OHNE CD31-CO-EXPRESSION ZU SEHEN. A-SMA WIRD DURCH ZUSAMMEN MIT Cx40 DURCH JUXTAGLOMERULÄRE RENIN-ZELLEN GEBILDET...	32
ABBILDUNG 5: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (ROT), PDGFR β (GRÜN) UND DAPI (BLAU). IN INTRAGLOMERULÄREN MESANGIUMZELLEN WIRD GLEICHERMAßen Cx40- UND PDGFR β -mRNA EXPRIMIERT. BEIDE mRNA-SIGNALTEILE TAUCHEN AUCH IN EXTRAGLOMERULÄREN GEFÄßWÄNDEN AUF, EXPRIMIERT WERDEN DIE BEIDEN MRNAS DORT JEDOCH IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLEN.	34
ABBILDUNG 6: IMMUNFLUORESENZFÄRBUNG EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (GRÜN), ITGA8 (ROT) UND DURCHLICHT (WEIß). IM INTRAGLOMERULÄREN MESANGIUM SIND Cx40 UND ITGA8 CO-LOKALISIERT, DER GEFÄßWAND LIEGT ITGA8 AUßen AUF. VON DEN VIELEN RINGFÖRMIGEN STRUKTUREN IM MARK, BEI DENEN ES SICH UM QUERSCHNITTE VON GEFÄßEN UND TUBULI HANDELN KÖNNTE, ENTHALTEN EINIGE Cx40-SIGNALTEILE IN IHRER WAND, ANDERE NICHT.....	35
ABBILDUNG 7: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (ROT), RENIN (GRÜN) UND DAPI (BLAU). DIE SIGNALTEILE FÜR Cx40 UND RENIN ÜBERLAGERN SICH AN DER BASIS DES GLOMERULUS ZU GELB.	36
ABBILDUNG 8: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT RENIN (ROT), PDGFR β (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). RENIN-mRNA WIRD AUßERDEM VON INTERSTITIELLEN ZELLEN DES MARKS ZUSAMMEN MIT PDGFR β EXPRIMIERT, WENN AUCH NUR IN SEHR GERINGEN MENGEN.	37
ABBILDUNG 9: IF EINER BASALEN WILDTYP-NIERE MIT Cx40 (GRÜN), RENIN (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). DIE JUXTAGLOMERULÄREN SIND POSITIV FÜR Cx40, RENIN UND A-SMA.	38
ABBILDUNG 10: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (WEIß) UND DAPI (BLAU). IM VERGLEICH ZUM BASALEN PRÄPARAT ERSCHEINEN IM ÄUßEREN MARK DER FIBROTISCHEN PRÄPARATE STRANGARTIGE STRUKTUREN MIT HOHER Cx40-EXPRESSION, DIE DIE FORM VON GEFÄßBÜNDEN HABEN. IM INNEREN MARK IST DIE Cx40-EXPRESSION EBENFALLS PUNKTUELL VERSTÄRKKT.	39
ABBILDUNG 11: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (ROT), KOLLAGEN (GRÜN) UND DAPI (BLAU). WÄHREND IM BASALEN PRÄPARAT KOLLAGEN HAUPTSÄCHLICH PERIVASKULÄR AUFTRITT, SIND IN BEIDEN FIBROTISCHEN PRÄPARATEN AUSGEDEHNT KOLLAGENABLÄGERUNGEN IM INTERSTITIUM ALS ZEICHEN EINER AUSGEPRÄGTE FIBROSE ZU ERKENNEN. DAS MUSTER DER FIBROSIERUNG UNTERSCHIEDET SICH NACH DER ART DER FIBROSE-INDUKTION.	40
ABBILDUNG 12: IF EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT TENASCIN C (GRÜN). DAS BASALE PRÄPARAT IST WEITESTGEHEND FREI VON EZM. NACH ADENIN-DIÄT UND UNILATERALER URETEROBSTRUKTION FINDET EINE DEUTLICH VERMEHRTE ABLÄGERUNG STATT. AUCH HIER UNTERSCHIEDET SICH DAS VERTEILUNGSMUSTER NACH ART DER FIBROSEINDUKTION UND ÄHNELT DEM DER ISH, NUR FINDEN SICH HIER AUCH IM INNEREN MARK DES UUO-MODELLS FIBROSEZEICHEN.....	41
ABBILDUNG 13: RNAscope® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (ROT), CD31 (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). BEI DEN IM ÄUßEREN MARK DER FIBROTISCHEN PRÄPARATE VERSTÄRKT Cx40-EXPRIMIERENDEN ZELLEN HANDELTS SICH UM CD31-POSITIVE ENDOTHELZELLEN, IM INNEREN MARK ERSCHIEN Cx40-mRNA EBENFALLS STETS MIT DEM ENDOTHELZELLMARKER CD31 CO-EXPRIMIERT.	42

ABBILDUNG 14: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (ROT), A-SMA (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). DIE EXPRESSION VON A-SMA IST ALS ZEICHEN DER FIBROSE IM ADENIN- UND UUO-PRÄPARAT ERHÖHT. Cx40- UND A-SMA-MRNA SIND WEITERHIN AUßERHALB DER JUXTAGLOMERULÄREN ZELLEN NICHT CO-EXPRIMIERT.	43
ABBILDUNG 15: IF EINER NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER NEPHROPATHIE MIT Cx40 (GRÜN), CD31 (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). DIE DICHE VON A-SMA ALS FIBROSEMARKER IST IM MARK STARK ERHÖHT. IM MARK TRITT DARÜBER HINAUS, WIE IN DER IF-ABBILDUNG DER BASALEN NIERE, Cx40-SIGNAL IN DER WAND CD31-NEGATIVER STRUKTUREN AUF.	44
ABBILDUNG 16: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION, AUSSCHNITTE AUS DEM ÄUßEREN MARK MIT Cx40 (ROT), CD31 (GRÜN) UND DAPI (BLAU). PFEILE MARKIEREN TUBULÄR ERSCHEINENDE HOHLSTRUKTUREN, IN DEREN WAND KEINE RELEVANTEN Cx40-MRNA-SIGNALA AUFTREten. KREISE MARKIEREN DIE NUR IM ADENIN-MODELL AUFTRETENDEN GERINGEN ANSAMMLUNGEN VON Cx40 OHNE CD31-CO-EXPRESSION. SKALA ENTSPRICHT 50 MM.	46
ABBILDUNG 17: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (ROT), PDGFRB (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). DIE EXPRESSION VON PDGFRB IST AUCH HIER ALS ZEICHEN DER FIBROSE IM ADENIN- UND UUO-PRÄPARAT ERHÖHT. Cx40-MRNA IST WEITERHIN AUßERHALB DES INTRAGLOMERULÄREN MESANGIUM NICHT MIT PDGFRB- ODER A-SMA-MRNA CO-EXPRIMIERT.	47
ABBILDUNG 18: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (GRÜN), ITGA8 (ROT) UND DURCHLICHT (WEIß). Cx40 UND ITGA8 SIND IM INTRAGLOMERULÄREN MESANGIUM CO-EXPRIMIERT, IN DER WAND VON BLUTGEFÄßEN WEITERHIN NUR BENACHBART.	48
ABBILDUNG 19: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE, EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER FIBROSE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI FIBROSE DURCH UNILATERALE URETEROBSTRUKTION MIT Cx40 (ROT), RENIN (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). RENIN-MRNA WIRD IN DEN FIBROTISCHEN PRÄPARATEN NICHT NUR DURCH JUXTAGLOMERULÄRE ZELLEN, SONDERN AUCH DURCH DEN MEDULLÄREN GEFÄßEN ANLIEGENDE ZELLEN EXPRIMIERT.	49
ABBILDUNG 20: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER MIT RENIN (ROT), PDGFRB (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). IM BASALEN PRÄPARAT TRITT RENIN-MRNA IM MARK ZWAR NUR IN SEHR GERINGER MENGE AUF, ALLERDINGS STETS MIT CO-EXPRESSION VON PDGFRB-MRNA (S. KREISE). IM ADENIN-PRÄPARAT VERURSACHEN EBENFALLS PDGFRB-MRNA-POSITIVE PERIZYEN DIE NEU AUFGETRETEne PERIVASKULÄRE RENIN-MRNA-EXPRESSION.	50
ABBILDUNG 21: RNASCOPE® EINER BASALEN WILDTYP-NIERE UND EINER WILDTYP-NIERE BEI ADENIN-INDUZIERTER MIT RENIN (ROT), CD31 (GRÜN), DAPI (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). RENIN-MRNA WIRD IM MARK NICHT DURCH DAS ENDOTHEL, DAFÜR NAHE DEN GEFÄßEN GEBILDET, WIE FÜR PERIZYEN ZU ERWARTEN.	51
ABBILDUNG 22: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), CD31 (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). Cx40 IST AUS DEM INNEREN DER GLOMERULI VERSCHWUNDEN, DAFÜR FINDEN SICH VERMEHRT ANREICHERUNGEN VON Cx40 IN PARAGLOMERULÄREN, CD-31-NEGATIVEN ZELLEN. PFEILE: Cx40-POSITIVE, CD31-POSITIVE GEFÄßE. KREISE: Cx40-POSITIVE, CD31-NEGATIVE STRUKTUREN. GESTRICHELTE HALBKREISE: AREALE MIT HOHER GEFÄßDICHTE.	54
ABBILDUNG 23: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), DESMIN (ROT) UND DURCHLICHT (WEIß). DAS INTRAGLOMERULÄRE MESANGIUM EXPRIMIERT NACH DEM KNOCKOUT KEIN Cx40-PROTEIN MEHR, DAFÜR FINDET SICH REICHLICH Cx40-PROTEIN IN DESMIN-NEGATIVEN ZELLEN IM BEREICH DES VAS AFFERENS. AUCH SONST SIND Cx40 UND DESMIN INTERSTITIELL WEITERHIN NICHT CO-LOKALISIERT.	55
ABBILDUNG 24: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), ITGA8 (ROT) UND DURCHLICHT (WEIß).	56
ABBILDUNG 25: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), RENIN (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). ANDERS ALS IM INTRAGLOMERULÄREN MESANGIUM EXPRIMIEREN DIE ZELLEN DES JGA WEITERHIN Cx40, EBENFALLS CO-EXPRIMIERT MIT RENIN UND A-SMA. JENSEITS DES VAS AFFERENS KANN AUF PROTEINEBENE ERNEUT RENIN-PROTEIN NACHGEWIESEN WERDEN.	57
ABBILDUNG 26: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), RENIN (ROT), A-SMA (BLAU) UND DURCHLICHT (WEIß). REchts OBEN VAS AFFERENS MIT REGULÄRER RENIN-PROTEIN-EXPRESSION. LINKS UNten VAS AFFERENS MIT DEUTLICHER REKRUTIERUNG VON RENINZELLEN ENTLANG DES GEFÄßES, WELCHE ALLESAMT WEITERHIN Cx40- UND A-SMA-PROTEIN EXPRIMIEREN.	58
ABBILDUNG 27: IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINER NIERE MIT Cx40-DEFIZIENZ IN PDGFRB-POSITIVEN ZELLEN MIT Cx40 (GRÜN), A-SMA (BLAU) UND RENIN (ROT) UND DURCHLICHT (WEIß). DIE AUSGEPRÄgte Cx40-PROTEIN-EXPRESSION AM GEFÄßPOL DES	

GLOMERULUS (MITTIG OBEN) FINDET UNTER CO-EXPRESSION VON RENIN-PROTEIN, ABER OHNE CO-EXPRESSION VON A-SMA STATT.....	59
--	----

6 Abkürzungsverzeichnis

ad.	„addiere“ (auffüllen auf genanntes Volumen)
BSA	bovine serum albumine (Bovines Serumalbumin)
CD	cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppe)
ch	chicken (Huhn)
Cre	Cre-Rekombinase
Cx	Connexin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dk	donkey (Esel)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
EGM	Extraglomeruläres Mesangium
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EndMT	endothelial-mesenchymale Transition
ESNE	Nierenerkrankung im Endstadium
EPO	Erythropoetin
EZM	extrazelluläre Matrix
fl	flanked by loxP (flankiert von loxP)
fl/fl	beidseitig flankiert von loxP
FOXD1	forkhead box D1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
GBD	Global Burden of Disease (Studie)

GLI1	Gliom-assoziiertes Onkogen 1
gt	goat (Ziege)
H ₂ O _{bidest}	zweifach entionisiertes Wasser
HS	horse serum (Pferdeserum)
IF	Immunfluoreszenz
IGM	Intraglomeruläres Mesangium
ISH	in-situ-Hybridisierung
ITGA8	Integrin alpha 8
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KO	(Gen-)Knockout (Abschalten der Expression des Gens)
loxP	locus of X-over P1 (Sequenz von 34 Basenpaaren aus dem Bakteriophagen P1)
MEJ	myoendothelial junctions
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
ms	mouse (Maus)
MSZ	mesenchymale Stammzelle
Notch	neurogenic locus notch homologue protein
p.a.	pro analysi (analysenrein)
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline (PBS)
PDGFR β	platelet derived growth factor receptor β (Rezeptor für Wachstumsfaktor aus Thrombozyten β)
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül)
qPCR	real time quantitative PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

rb	rabbit (Hase)
RPL32	60S ribosomal protein L32
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
TGF	tubuloglomeruläres Feedback
TGF β (R)	transforming growth factor beta (receptor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VSMC	vascular smooth muscle cell (glatte Gefäßmuskelzelle)
WT	Wildtyp

7 Zusammenfassung

Connexine sind Intramembranproteine und Bausteine von Gap Junctions, welchen eine große Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation zugemessen wird und deren Eigenschaften durch die Art ihrer Zusammensetzung bestimmt werden, womit Connexinen in unterschiedlichen Organsystemen verschiedene, teilweise kritische Funktionen zukommen. In der Niere konnte für Connexin 43 eine Beeinflussbarkeit der Progression der chronischen Nierenerkrankung demonstriert werden. Connexin 40 (Cx40) andererseits ist essenziell für die Regulation der Ausschüttung von Renin, einem ebenfalls für die Pathophysiologie von Nierenerkrankungen relevanten Mechanismus. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung von Cx40 bei der Entstehung und Progression der Nierenfibrose, dem Endstadium der meisten chronischen Nierenerkrankungen. Dazu wurde an der Maus die Expression von Cx40 in der basalen Wildtyp-Niere, in zwei fibrotischen Nierenmodellen, induziert durch Adenin oder unilaterale Ureterobstruktion, sowie einem Nierenmodell mit Knockout des Cx40-Gens in PDGFR β -exprimierenden Zellen auf Proteinebene mittels konventioneller Immunfluoreszenz (IF) und auf mRNA-Ebene mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH, RNAscope $^{\circledR}$ von ACD Bio) analysiert.

Eine Expression von Cx40 wird mittels IF und ISH im basalen und fibrotischen Nierengewebe im intraglomerulären Mesangium (IGM) und im angrenzenden juxtaglomerulären Apparat (JGA) sowie im Endothel aller renalen Gefäße, mit Ausnahme der intraglomerulären Kapillarschlingen, nachgewiesen. Im fibrotischen Nierengewebe ist die Cx40-Expression in Endothelzellen der Vasa recta und im inneren Mark verstärkt. Allein die IF liefert darüber hinaus Hinweise auf eine Expression von Cx40 in Tubuluszellen des basalen und fibrotischen Nierenmarks. Nur mittels ISH wurde eine ausgeprägte Rekrutierung von Renin-mRNA-exprimierenden Zellen entlang der Vasa recta im Bereich der äußeren Medulla dargestellt. Im Modell mit Cx40-Knockout in PDGFR β -exprimierenden Zellen zeigte sich eine Rekrutierung von Renin-exprimierenden myoepithelialen Zellen entlang des Vas afferens sowie in Form von juxtaglomerulären α -SMA-negativen Zellen.

Eine Expression von Cx40 durch Myofibroblasten konnte in keinem Modell dargestellt werden, was gegen eine direkte Involvierung des Connexins in die zur Fibrose führenden Signalwege spricht, auch wenn die sichtbare Veränderung der Expressionslevel zwischen basalem und fibrotischem Modell eine Beteiligung an der Gewebsreaktion, wie etwaigen Kompensationsmechanismen, nahelegt. Da im Knockout-Modell über die oben genannten Beobachtungen hinaus keine Allgemeinveränderungen wie insbesondere eine pathologische Fibrosierung nachgewiesen werden konnte, ergibt sich erneut kein Hinweis auf eine elementare Bedeutung von Cx40 für die Organisation von mesenchymalen Zellen in der Niere. Eine vervollständigende Untersuchung dieses Knockout-Modells nach Fibroseinduktion inklusive ISH wurde durch uns noch nicht durchgeführt. Die Rekrutierung von Renin-exprimierenden

Zellen im fibrotischen und im Knockout-Modell betont erneut die essenzielle Bedeutung von Cx40 für die Regulation der Renin-Ausschüttung, welche ihrerseits einen Mediator zur Entstehung und Progression der chronischen Nierenerkrankung darstellt, der Cx40 als Objekt weiterer Studien Bedeutung verleiht.

8 Summary

Connexins are intermembrane proteins and components of gap junctions which are attributed with significant importance for intercellular communication and whose properties are determined by their connexin composition. Therefore, connexins fulfil different, partially critical functions in various organ systems. For connexin 43 studies could demonstrate an influence on the progression of chronic kidney disease. Connexin 40 (Cx40) on the other hand is essential for the regulation of renin secretion, another mechanism important for the pathophysiology of chronic kidney disease. The aim of this study was to research the role of Cx40 in the development of renal fibrosis, the final stage of most variants of chronic kidney disease. Therefore, the expression of Cx40 in the basal wild-type kidney, in two types of fibrotic kidney models, respectively induced through adenine or unilateral ureteral obstruction, and a kidney model after knockout of the Cx40 gene in PDGFR β expressing cells on protein level were analysed with conventional immunofluorescence (IF) and on mRNA level by *in-situ*-hybridisation (ISH, RNAscope[®] by ACD Bio) in mice.

An expression of Cx40 is detected in basal and fibrotic kidney tissue in the intraglomerular mesangium (IGM) and in the adjacent juxtaglomerular apparatus (JGA), as well as in the endothelium of all renal blood vessels except the intraglomerular capillary loop by IF and ISH. In fibrotic kidney tissue expression of Cx40 in endothelial cells of the vasa recta and in the inner medulla is increased. Only IF indicates Cx40 expression in tubular cells of the basal und fibrotic kidney tissue. Only through ISH on the other hand a significant recruitment of renin mRNA expressing cells alongside the vasa recta in the outer medulla area is depicted. In the kidney model with knockout of Cx40 in PDGFR β -expressing cells a recruitment of renin expressing myoepithelial cells alongside the vas afferens as well as in the form of juxtaglomerular α -SMA negative cells is shown.

An expression of Cx40 by myofibroblasts could not be shown in any kidney model which contradicts a direct involvement of the connexin in the signal pathways that lead to kidney fibrosis. Still the visible changes in expression between basal and fibrotic kidney model suggest a contribution to the tissue's reaction, like potential compensation mechanisms. The lack of general alterations of tissue like pathological fibrotic remodelling in the knockout model again does not hint to a fundamental significance of Cx40 for the organisation of mesenchymal cells in the kidney. A complete study of this knockout model has not yet been realised by us. The recruitment of renin expressing cells in the fibrotic and the knockout model emphasizes again the essential impact of Cx40 on the regulation of renin secretion, which on its own is a mediator for the development and progression of chronic kidney disease and therefore gives significance to Cx40 as an object of further investigation.

9 Literaturverzeichnis

1. Carney EF. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat Rev Nephrol*. 2020 May;16(5):251–251.
2. Lv JC, Zhang LX. Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1165:3–15.
3. Noël D, Landais P. [Epidemiology of chronic kidney disease]. *Rev Prat*. 2012 Jan;62(1):38–42.
4. Kent S, Schlackow I, Lozano-Kühne J, Reith C, Emberson J, Haynes R, et al. What is the impact of chronic kidney disease stage and cardiovascular disease on the annual cost of hospital care in moderate-to-severe kidney disease? *BMC Nephrol*. 2015 Apr 29;16:65.
5. Chen PS, Li YP, Ni HF. Morphology and Evaluation of Renal Fibrosis. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1165:17–36.
6. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):199–210.
7. Berg AC, Chernavsky-Sequeira C, Lindsey J, Gomez RA, Sequeira-Lopez MLS. Pericytes synthesize renin. *World J Nephrol*. 2013 Feb 6;2(1):11–6.
8. Stefanska A, Kenyon C, Christian HC, Buckley C, Shaw I, Mullins JJ, et al. Human kidney pericytes produce renin. *Kidney Int*. 2016;90(6):1251–61.
9. Kar R, Batra N, Riquelme MA, Jiang JX. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Aug 1;524(1):2–15.
10. Shaw I, Rider S, Mullins J, Hughes J, Péault B. Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(8):521–34.
11. Abed A, Dussaule JC, Boffa JJ, Chatziantoniou C, Chadjichristos C. Connexins in Renal Endothelial Function and Dysfunction. *Cardiovasc Hematol Disord-Drug Targets*. 2014 Mar 31;14(1):15–21.
12. Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol*. 1979 Nov;237(5):F333-343.
13. Heberlein K, Straub A, Isakson BE. The myoendothelial junction: breaking through the matrix? *Microcirc N Y N* 1994. 2009 May;16(4):307–22.
14. Morioka T, Okada S, Nameta M, Kamal F, Yanakieva-Georgieva NT, Yao J, et al. Glomerular expression of connexin 40 and connexin 43 in rat experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2013 Apr 1;17(2):191–204.
15. Geis L, Boudriot FF, Wagner C. Connexin mRNA distribution in adult mouse kidneys. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2021 Nov;473(11):1737–47.
16. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrol Carlton Vic*. 2018 Jan;23(1):5–11.
17. Martínez-Klimova E, Aparicio-Trejo OE, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules* [Internet].

2019 Apr 8 [cited 2020 Oct 21];9(4). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523883/>

18. Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May;298(5):R1143-1155.
19. Hwan Seul K, Beyer EC. Heterogeneous Localization of Connexin40 in the Renal Vasculature. *Microvasc Res.* 2000 Jan 1;59(1):140–8.
20. Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, et al. Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int.* 2001 Jul;60(1):190–201.
21. Zhang J, Hill CE. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: Accentuation during diabetes. *Kidney Int.* 2005 Sep;68(3):1171–85.
22. Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE, et al. Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int.* 2008 Feb 2;73(4):415–22.
23. Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin Expression in Renin-Producing Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Mar;20(3):506–12.
24. Ložić M, Filipović N, Jurić M, Kosović I, Benzon B, Šolić I, et al. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of Dab1-/- (yotari) Mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 28;22(3):1284.
25. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Vukojevic K, Saraga M, Glavina Durdov M, et al. Spatio-temporal patterning of different connexins in developing and postnatal human kidneys and in nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):8756.
26. Price GW, Potter JA, Williams BM, Cliff CL, Squires PE, Hills CE. Connexin-mediated cell communication in the kidney: A potential therapeutic target for future intervention of diabetic kidney disease? *Exp Physiol.* 2020;105(2):219–29.
27. Prakoura N, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Connexin 43: a New Therapeutic Target Against Chronic Kidney Disease. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(3):998–1009.
28. Zhang JH, Kawashima S, Yokoyama M, Huang P, Hill CE. Increased eNOS accounts for changes in connexin expression in renal arterioles during diabetes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006 Sep;288A(9):1000–8.
29. Hills CE, Price GW, Squires PE. Mind the gap: connexins and cell–cell communication in the diabetic kidney. *Diabetologia.* 2015 Feb;58(2):233–41.
30. Zeng O, Li F, Li Y, Li L, Xiao T, Chu C, et al. Effect of Novel Gasotransmitter hydrogen sulfide on renal fibrosis and connexins expression in diabetic rats. *Bioengineered.* 2016 Sep 2;7(5):314–20.
31. Wang Y, Xing QQ, Tu JK, Tang WB, Yuan XN, Xie YY, et al. Involvement of hydrogen sulfide in the progression of renal fibrosis. *Chin Med J (Engl).* 2019 Dec 5;132(23):2872–80.
32. Hennrikus M, Gonzalez AA, Prieto MC. The prorenin receptor in the cardiovascular system and beyond. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2018 Feb 1;314(2):H139–45.

33. Arthur G, Osborn JL, Yiannikouris FB. (Pro)renin receptor in the kidney: function and significance. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2021 Apr 1;320(4):R377–83.
34. AlQudah M, Hale TM, Czubryt MP. Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in fibrosis. *Matrix Biol.* 2020 Sep;91–92:92–108.
35. Wolf G. Renal injury due to renin–angiotensin–aldosterone system activation of the transforming growth factor- β pathway. *Kidney Int.* 2006 Dec;70(11):1914–9.
36. Koszegi S, Molnar A, Lenart L, Hodrea J, Balogh DB, Lakat T, et al. RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition. *J Physiol.* 2019 Jan;597(1):193–209.
37. Miyauchi K, Nakai T, Saito S, Yamamoto T, Sato K, Kato K, et al. Renal interstitial fibroblasts coproduce erythropoietin and renin under anaemic conditions. *EBioMedicine.* 2021 Feb;64:103209.
38. Hamada K, Taniguchi Y, Shimamura Y, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, et al. Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2013 Dec;17(6):848–56.
39. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):607–73.
40. Kurt B, Kurtz A. Plasticity of renal endocrine function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Mar 15;308(6):R455–466.
41. Am S, B P, Jj M. Renal pericytes: multifunctional cells of the kidneys. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2013 Jun;465(6):767–73.
42. De Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics.* 2003 Apr 16;13(2):169–77.
43. Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, et al. Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int.* 2007 Oct;72(7):814–22.
44. Wagner C, De Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F. Connexin40 Is Essential for the Pressure Control of Renin Synthesis and Secretion. *Circ Res.* 2007 Mar 2;100(4):556–63.
45. Kurtz L, Schweda F, De Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, et al. Lack of Connexin 40 Causes Displacement of Renin-Producing Cells from Afferent Arterioles to the Extraglomerular Mesangium. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Apr;18(4):1103–11.
46. Schweda F, Kurtz L, De Wit C, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension. *Kidney Int.* 2009 Mar;75(5):482–9.
47. Sorensen CM, Giese I, Braunstein TH, Brasen JC, Salomonsson M, Holstein-Rathlou NH. Role of connexin40 in the autoregulatory response of the afferent arteriole. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2012 Sep 15;303(6):F855–63.
48. Le Gal L, Alonso F, Wagner C, Germain S, Nardelli Haefliger D, Meda P, et al. Restoration of Connexin 40 (Cx40) in Renin-Producing Cells Reduces the Hypertension of Cx40 Null Mice. *Hypertension.* 2014 Jun;63(6):1198–204.

49. Wagner C, Jobs A, Schweda F, Kurtz L, Kurt B, Lopez MLS, et al. Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int.* 2010 Oct;78(8):762–8.
50. Just A, Kurtz L, De Wit C, Wagner C, Kurtz A, Arendshorst WJ. Connexin 40 Mediates the Tubuloglomerular Feedback Contribution to Renal Blood Flow Autoregulation. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jul;20(7):1577–85.

10 Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

Franz Fabian Boudriot

11 Danksagung

Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Charlotte Wagner für eine herausragende Betreuung über die gesamte Dauer der Arbeit, sowie PD Dr. Lisa Geis für die Übernahme des Zweitgutachtens. Großer Dank gilt ebenfalls dem Lehrstuhl Prof. Dr. Kurtz und der ganzen Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kurtz für meine freundliche Aufnahme in ihr Labor sowie ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Laboralltag: Ramona Steppan, Dr. Katharina Broeker, Dr. Michaela Fuchs, Dr. Julia Schrankl, Susanne Fink, sowie Hannelore Schieder und Hildegard Westermeier.

Darüber hinaus danke ich besonders meiner Familie für die tatkräftige und umfassende Förderung und ihren Rückhalt während der gesamten Dauer meiner akademischen Ausbildung, in welcher ich mit dem Abschluss meines Studiums und der Einreichung der Dissertation einen wichtigen Abschnitt beendet habe.