

**Die Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen
Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in diversen Organen der Maus**



Universität Regensburg

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

vorgelegt von

Marian Ketterl

aus Kötzting

im Jahr

2024

**Die Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen
Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in diversen Organen der Maus**



Universität Regensburg

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

vorgelegt von

Marian Ketterl

aus Kötzting

im Jahr

2024

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
28.03.2024

Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Überblick über das kanonische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	6
1.2 Das nicht-kanonische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	7
1.3 Struktur und Funktion des Angiotensin Converting Enzyme 2	9
1.4 Mas-1- und AT2-Rezeptor.....	10
1.5 Die Rolle des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organsystemen.....	12
1.5.1 Kardiovaskuläres System	12
1.5.2 Niere	13
1.5.3 Leber.....	14
1.5.4 Zentrales Nervensystem	15
1.5.5 Lunge.....	16
1.6 ACE2 und SARS-CoV-2.....	17
1.7 Zielsetzung der Dissertation.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	22
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.5 Primer	27
2.1.6 Antikörper	27
2.1.7 Sonden für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	28
2.1.8 Software und Internetdienste	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Versuchstiere	30
2.2.1.1 Untersuchte Mauslinien	30
2.2.1.2 Renale Schädigungsmodelle	30
2.2.2 Organpräparation.....	31

2.2.2.1 Präparation zur histologischen Untersuchung	31
2.2.2.2 Präparation zur quantitativen mRNA- und Proteinanalyse.....	32
2.2.3 mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR	32
2.2.3.1 Isolierung der RNA	32
2.2.3.2 Reverse Transkription	33
2.2.3.3 Quantitative Real-Time-PCR	34
2.2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot	35
2.2.4.1 Proteinisolierung.....	35
2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion	35
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.2.3.4 Western Blot.....	36
2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	38
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung	39
2.2.7 Mikroskopie.....	40
2.2.8 Statistische Auswertung.....	40
 3 Ergebnisse	41
3.1 mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen murinen Organen.....	41
3.1.1 Nicht-kanonisches RAAS.....	41
3.1.2 Kanonisches RAAS.....	42
3.2 Proteinexpression des ACE2 in diversen murinen Organen	44
3.3 Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen murinen Organen.....	45
3.3.1 Herz	46
3.3.2 Lunge.....	48
3.3.3 Leber.....	51
3.3.4 Nebenniere	55
3.3.5 Niere	57
3.3.5.1 ACE2	58
3.3.5.2 Mas-1	61
3.3.5.3 ACE	63

3.4 Einfluss renaler Schädigungsmodelle auf die Komponenten des nicht-kanonischen RAAS-Systems	65
3.4.1 Quantitative mRNA-Analyse	65
3.4.1.1 Nicht-kanonisches RAAS.....	65
3.4.1.2 Kanonisches RAAS	66
3.4.2 Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in renalen Schädigungsmodellen.....	67
3.4.2.1 Adenin-induzierte Nephropathie	67
3.4.2.2 Unilaterale Ureterobstruktion.....	69
4 Diskussion.....	72
4.1 Quantitative mRNA- und Proteinanalyse in verschiedenen Geweben	72
4.2 Lokalisation und Bedeutung des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organsystemen.....	75
4.2.1 Herz	75
4.2.2 Lunge.....	75
4.2.3 Leber.....	76
4.2.4 Nebenniere	78
4.2.5 Niere	79
5 Zusammenfassung.....	83
6 Literaturverzeichnis	85
7 Anhang	104
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	104
7.2 Abkürzungsverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Überblick über das kanonische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Spätestens seit der Beschreibung des Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in seiner Rolle als SARS-CoV-2-Rezeptor im Januar 2020 ⁽¹⁾, rückt das zu ACE teilhomologe Protein ⁽²⁾ zunehmend in das Blickfeld biomedizinischer Forschung. Mit seiner Entdeckung im Jahr 2000 ⁽³⁾ und weiteren Erkenntnissen über die immense Bedeutung des Enzyms in physiologischen wie pathologischen Zuständen wurde das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) um die ACE-Ang(1-7)-Mas-Rezeptor-Achse erweitert.

Das bis dahin bekannte, sogenannte kanonische RAAS, nimmt eine zentrale Rolle für die Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase sowie für die Blutdruckregulation ein. Diese und einige weitere Parameter beeinflussen die Sekretion des Initiatorenzyms Renin, das hauptsächlich in granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der afferenten Arteriolen synthetisiert wird ⁽⁴⁾. Als Aspartatprotease katalysiert es die Spaltung des Prohormons Angiotensinogen überwiegend hepatischen Ursprungs. Das entstandene, biologisch inaktive Decapeptid Angiotensin I wird durch proteolytische Abspaltung zweier weiterer Aminosäuren durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zum Octapeptid Angiotensin II. Wichtigster Rezeptor für Ang II ist der Angiotensinrezeptor Subtyp 1 (AT1). In Nagern konnten zwei, zum Großteil homologe, Isoformen des AT1 identifiziert werden: Der dominante AT1A- und der AT1B-Rezeptor, dessen Expression sich im Wesentlichen auf endokrine Gewebe beschränkt ⁽⁵⁾.

Angiotensin II fungiert über diese AT1-Rezeptoren als Mediator der zahlreichen klassischen Effekte des kanonischen RAAS. Dazu zählen vor allem Vasokonstriktion, gesteigerte proximaltubuläre Natriumretention und die Sekretion von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde mit konsekutiver renaler Natriumresorption über epitheliale Natriumkanäle (ENaC) in Sammelrohr und Verbindungstubulus ^{(6),(7)}. Des Weiteren bewirkt Ang II im Hypothalamus behaviorale Änderung des Individuums durch Salzhunger und Durstgefühl ⁽⁸⁾. Insgesamt führen

diese Mechanismen zu einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks und des Extrazellulärvolumens sowie angehobenen Plasmanatriumspiegeln⁽⁷⁾.

Neben diesen wichtigen endokrinen Funktionen des kanonischen RAAS existieren zahlreiche parakrine und auto- bzw. intrakrine Effekte, die maßgeblich den lokalen Zellstoffwechsel beeinflussen⁽⁹⁾. Zentraler Mediator ist hierbei wiederum Angiotensin II, das in vielen Geweben über AT1-Rezeptoren proliferative und profibrotische Wirkungen vermittelt. Außerdem ist es durch Hemmung der Fibrinolyse an der Entstehung thrombotischer Ereignisse beteiligt, trägt zur Entwicklung einer Insulinresistenz bei und fördert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Dadurch ist das lokale kanonische RAAS mit der Genese multipler Erkrankungen, beispielsweise endothelialer Dysfunktion oder Fibrose und Remodelling in diversen Organen assoziiert^(6, 9–13).

1.2 Das nicht-kanonische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das nicht-kanonische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stellt einen funktionellen Gegenspieler zur klassischen Ang II-AT1-Rezeptor Achse dar. Die zentrale Komponente dieses Systems ist das Enzym ACE2. Als Zink-Metalloprotease katalysiert es hauptsächlich die Abspaltung einer Aminosäure vom Octapeptid Angiotensin II und antagonisiert somit sämtliche Wirkungen des zentralen Mediators des kanonischen RAAS⁽¹⁴⁾. Das Produkt dieser proteolytischen Reaktion ist Ang(1-7), welches durch Interaktion mit dem G-Protein gekoppelten Mas-1-Rezeptor zusätzliche, zum klassischen System gegensinnige Effekte vermittelt. Diese sind im Wesentlichen antifibrotischer, antiinflammatorischer, antiproliferativer und vasodilatativer Art, was protektive Wirkungen auf mehrere Organsysteme zur Folge hat^(10, 15–17).

Alternative Wege zur Ang(1-7)-Synthese bestehen in der ACE-katalysierten Transformation von Ang(1-9), welches durch ACE2-vermittelte Proteolyse aus dem Decapeptid Angiotensin I hervorgeht, oder durch Umwandlung von Ang I und II durch diverse Peptidasen, wie Neprilysin, Prolyl oligopeptidase oder Thimet Oligopeptidase, um nur einige zu nennen^(18, 19). Neben Mas-1 existieren noch weitere Rezeptoren, die dem nicht-kanonischen RAAS zugeordnet werden: Der AT2-Rezeptor mit seinem

Hauptliganden Ang(1-9) und der Mas-related G protein-coupled receptor D (MrgD), der das decarboxylierte Ang(1-7)-Derivat Alamandin bindet^(12, 20).

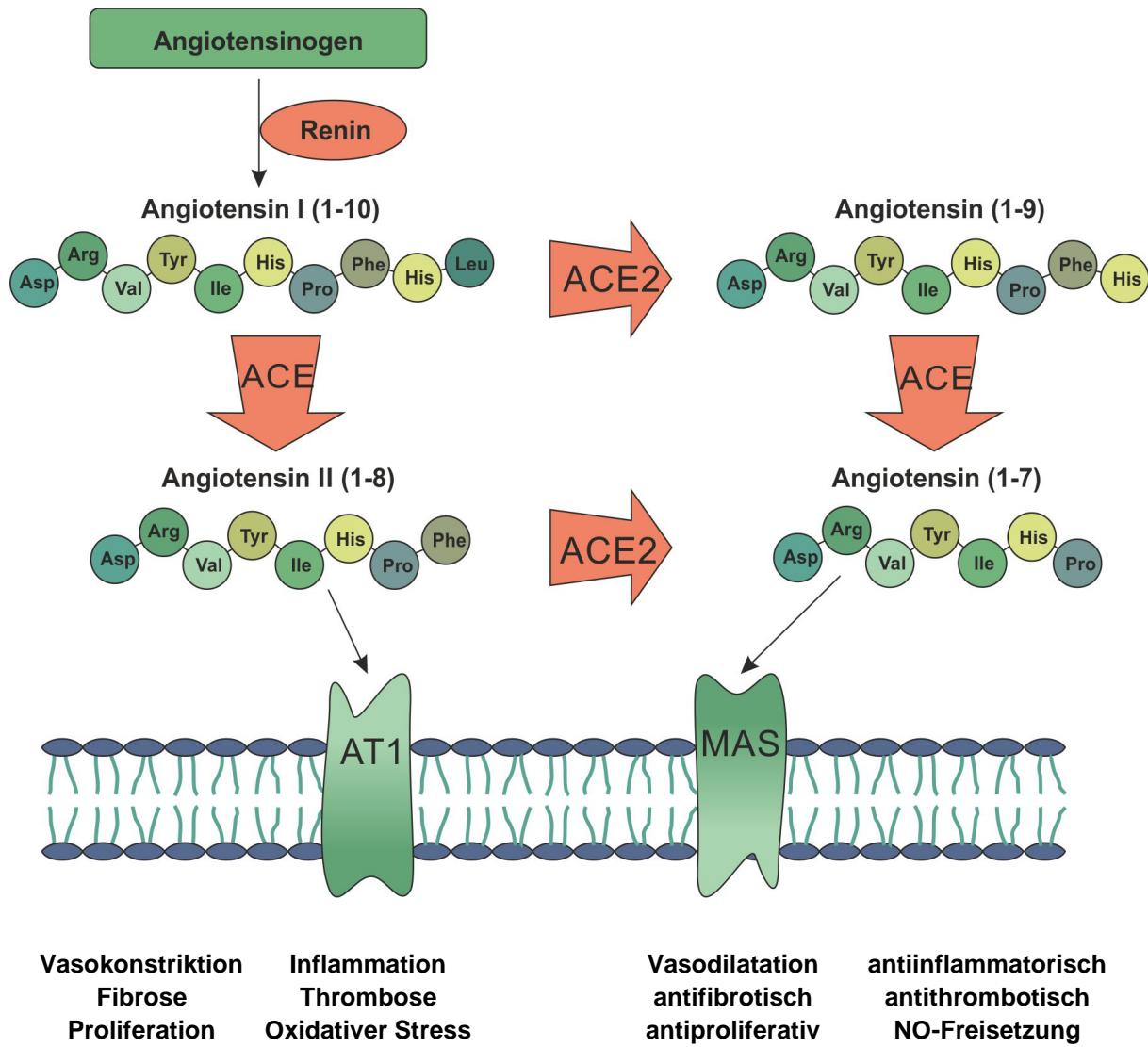


Abbildung 1: Schematische Übersicht über den kanonischen (links) und den nicht-kanonischen (rechts) RAAS-Pathway.

Eine genauere Beschreibung der gezeigten enzymatischen Kaskaden findet sich unter 1.1 und 1.2 im Text. Abbildung frei modifiziert nach (10).

1.3 Struktur und Funktion des Angiotensin Converting Enzyme 2

ACE2 wurde im Jahr 2000 als erstes zu ACE homologes Protein im Herzmuskel einer Patientin mit dilatativer Kardiomyopathie entdeckt⁽³⁾. Mittlerweile konnte es in einer Vielzahl anderer Organe und Zelltypen nachgewiesen werden, wobei etliche ambivalente Untersuchungsbefunde zur Lokalisation des ACE2 existieren. Hauptexpressionsorte in humanem Gewebe scheinen allerdings die Niere und der Gastrointestinaltrakt zu sein^(21, 22). In einigen Organen ist während der Fetalperiode eine erhöhte Abundanz zu beobachten, was für einen Einfluss des ACE2 auf die Ontogenese sprechen könnte⁽²³⁾.

Das zugehörige Gen hat seinen Locus auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms und codiert für ein ca. 120 kDa schweres Glykoprotein aus 805 Aminosäuren mit einer N-terminalen Zink-Metallopeptidase- und einer C-Terminalen Transmembrandomäne^(24, 25). Das dem Peptidaseelement inhärente katalytische Zentrum befindet sich in einer tiefen taschenähnlichen Struktur, die von zwei, durch eine α-Helix verbundene, Subdomänen begrenzt wird⁽²⁶⁾. Dieser proteolytisch aktive Anteil weist eine 42 prozentige Homologie zu ACE auf, während die Transmembrandomäne zu ca. 48% dem Protein Collectrin entspricht⁽²⁵⁾. Als Enzymsubstrat kommen, neben Ang II und anderen Angiotensinderivaten, weitere, unter anderem vasoaktive Peptide, wie Dynorphin A (1-13), Apelin-13 oder des-Arg(9)-Bradykinin, in Frage⁽²⁷⁾.

Bei Collectrin handelt es sich um ein renales Protein, das den membranständigen Aminosäuretransporter B0AT1 stabilisiert und dadurch eine adäquate Resorption aus dem Primärharn gewährleistet. Die C-terminale Membrandomäne des ACE2 ähnelt diesem Protein nicht nur strukturell, sondern vermittelt auf die gleiche Weise die intestinale Aminosäureaufnahme. Bei ACE2-defizienten Mäusen manifestiert sich dieser Funktionsverlust in der sogenannten Hartnup-Krankheit, die mit partiellem Aminosäuremangel einhergeht. Insbesondere betroffen ist dabei die essentielle Aminosäure Tryptophan, die den Startpunkt im Serotoninstoffwechsel darstellt^(14, 28).

Neben der membranständigen Form existiert ACE2 außerdem als lösliche Variante. Diese entsteht durch Proteolyse des Enzyms durch die Tumornekrosefaktor α-Konvertase (ADAM17) (29, 30). Der kleinere C-terminale Teil verbleibt dabei in der Membran, während der größere als lösliche Komponente in den extrazellulären Raum übergeht. Das Molekulargewicht dieser abgespaltenen Ektodomäne gestaltet sich variabel, was mehrere mögliche Angriffspunkte der ADAM17 an ACE2 nahelegen

könnte⁽³¹⁾. Bei diesem konstitutiv stattfindenden Prozess, der als Ectodomain Shedding bezeichnet wird, bleibt die Peptidaseeigenschaft des löslichen ACE2 erhalten^(29, 30, 32).

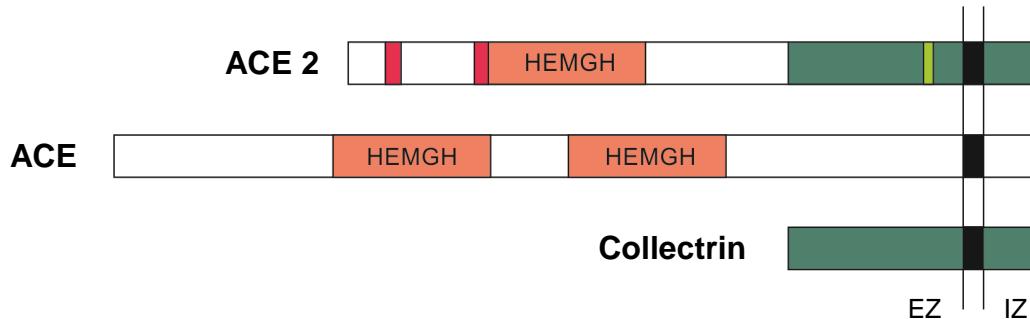


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Angiotensin Converting Enzyme 2 und den teilhomologen Proteinen ACE und Collectrin.

EZ: extrazellulär, IZ: intrazellulär, HEMGH: Zink bindendes katalytisches Zentrum, hellgrün: ADAM17-Spaltstelle, rot: SARS-CoV-Bindestellen. Abbildung frei modifiziert nach (14).

1.4 Mas-1- und AT2-Rezeptor

In den nachfolgenden Versuchen wurden neben ACE2 vor allem die beiden wichtigsten Ang(1-7)-Rezeptoren Mas-1 und AT2 betrachtet.

Mas-1 wurde bereits einige Jahre vor ACE2 als Protoonkogen entdeckt, jedoch erst im Jahr 2003 als Ang(1-7)-Rezeptor identifiziert⁽³³⁾. Es handelt sich dabei um einen aus 325 Aminosäuren bestehenden G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen in Form von α -Helices, der seine Wirkungen (Abb. 1) allerdings wahrscheinlich nur nachrangig über sein G-Protein vermittelt. Die genauen Signaltransduktionsmechanismen sind nicht abschließend geklärt^(18, 34). Vermutlich spielen die Mas-vermittelte Freisetzung von Arachidonsäure und deren Derivaten, die Aktivierung des PI3K/Proteinkinase B-Signalwegs und die Inhibition der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Nox2 eine Rolle^(11, 33, 35, 36). Außerdem heterooligomerisiert Mas mit dem AT1-Rezeptor und inhibiert auf diese Weise die Ang II vermittelten Effekte⁽³⁷⁾. Weitere in der Diskussion stehende Signalwege werden in Abb. 3 thematisiert. Der Mas-Rezeptor wird hauptsächlich in Gehirn und Hoden exprimiert, tritt aber auch in Herz, Niere und Gefäßen in Erscheinung⁽³⁸⁾. Die Abundanz in weiblichen Individuen ist dabei durch den Östrogeneinfluss gesteigert⁽³⁹⁾.

Der Angiotensin II Rezeptor AT2 ist ein weiterer wichtiger Mediator im nicht-kanonischen RAAS. Es handelt sich dabei um einen auf dem X-Chromosom codierten 41kDa schweren G-Protein gekoppelten Rezeptor, bestehend aus 363 Aminosäuren, der lediglich 34% Homologie zum AT1-Rezeptor aufweist. Während er in der Fetalperiode in vielen Organen eine starke Expression aufweist, tritt AT2 im gesunden adulten Organismus nur noch in wenigen Geweben und in niedrigerer Ausprägung auf (40, 41). Als Ligand fungieren neben Ang II sowohl Ang(1-7) als auch Ang(1-9) (42, 43). Der AT2-Rezeptor unterscheidet sich nicht nur strukturell immens vom AT1, sondern vermittelt auch funktionell antagonistische Wirkungen. Dazu zählen ähnlich wie bei Mas vasodilatative, proapoptotische, antiproliferative und antiinflammatorische Effekte (12).

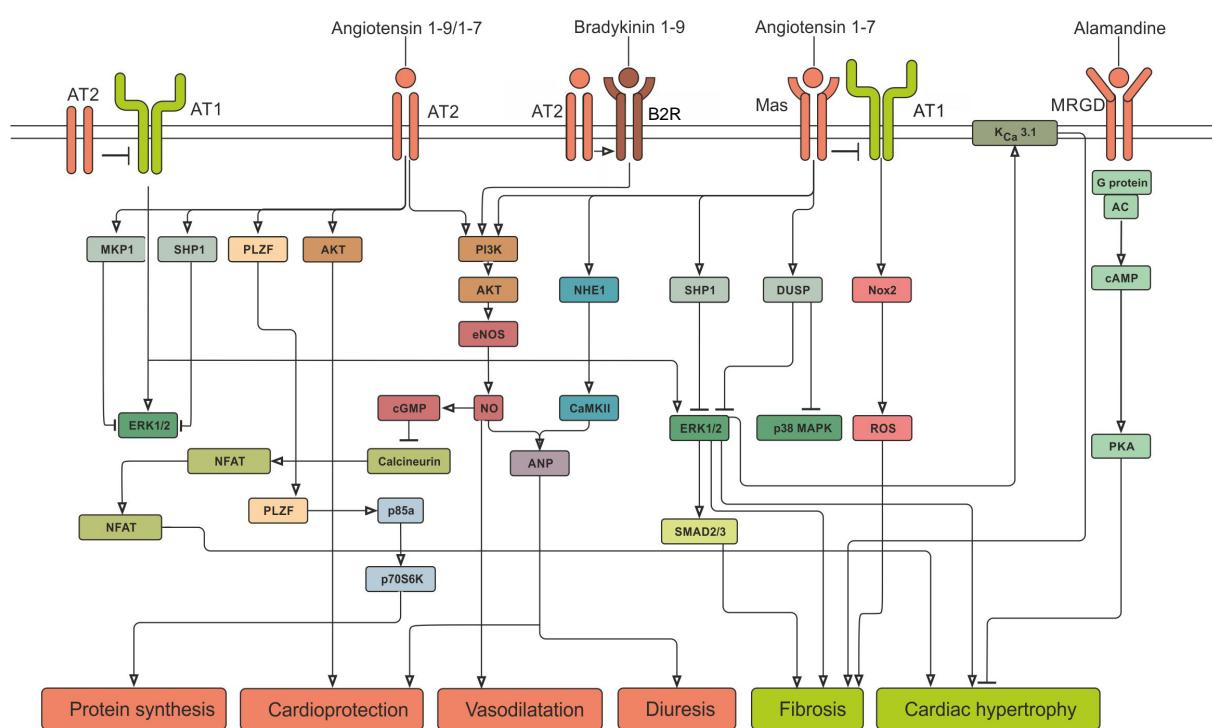


Abbildung 3: Darstellung verschiedener Signalwege der Rezeptoren des kanonischen und nicht-kanonischen RAAS.

AT1: Angiotensinrezeptor Subtyp 1, AT2: Angiotensinrezeptor Subtyp 2, B2R: Bradykininrezeptor B2, Mas: Mas-Rezeptor, MRGD: Mas-related g-protein-coupled receptor D, KCa3.1: Calcium-abhängiger Kaliumkanal, AC: Adenylylzyklase, cAMP: Zyklisches AMP, PKA: Proteinkinase A, Nox2: NADPH-Oxidase 2, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, DUSP: Dual-spezifische Phosphatase, p38 MAPK: p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 und 2, SMAD2/3: mothers against decantaplegic homologue 2 und 3, SHP1: Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1, NHE: Na⁺/H⁺-Austauscher, CaMKII: Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, ANP: Atriales natriuretisches Peptid, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT: Proteinkinase B, eNOS: Endothiale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, cGMP: Zyklisches GMP, NFAT: nuclear factor of activated T cells, PLZF: Promyelotisches Zinkfingerprotein, p85α: p85α, p70S6K: Ribosomale Protein-S6-Kinase, MKP1: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Phosphatase. Pfeile symbolisieren aktivierende Effekte, Querbalken inhibierende Effekte. Abbildung frei modifiziert nach (44).

1.5 Die Rolle des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organsystemen

1.5.1 Kardiovaskuläres System

Sämtliche Komponenten des nicht-kanonischen RAAS konnten bereits im kardiovaskulären System nachgewiesen werden. ACE2, Mas und AT2 wurden beispielsweise in Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatter Gefäßmuskulatur, und kardialen (Myo-)Fibroblasten detektiert (2, 12, 34, 45). Angesichts der ambivalenten Ergebnisse verschiedener Untersuchungen ist es allerdings schwierig, eine genaue Lokalisation vorzunehmen. Ebenso heterogen gestalten sich die Beobachtungen hinsichtlich des nicht-kanonischen RAAS in pathologischen Zuständen und ACE2-Defizienzmodellen.

Etliche Forschergruppen konnten eine Erhöhung der kardialen ACE2-Level im Rahmen verschiedener Erkrankungen des Herzens, darunter Herzinsuffizienz, (post-)ischämische Zustände oder dilative Kardiomyopathie, feststellen. Da die Genese und Progression vieler dieser Pathologien mit der Ang II/AT1R-Achse assoziiert zu sein scheinen, sprechen diese Beobachtungen für einen Kompensationsmechanismus (2, 45). Diese Vermutung wird unter anderem durch die Tatsache gestützt, dass eine Überexpression von ACE2 die Entstehung von Herzhypertrophie und ventrikulärem Remodeling durch Ang II-Infusion abmildert und die Kollagensynthese in kardialen Fibroblasten hemmt (46, 47). Des Weiteren wirkt die ACE2/Ang(1-7)-Achse mit ihren Rezeptoren Mas-1 und AT2 durch die Stabilisation der Gefäßintima, der reduzierten Bildung atherosklerotischer Plaques und ihren antioxidativen Eigenschaften endothelialer Dysfunktion entgegen, welche eine der Hauptursachen ischämischer Ereignisse darstellt (18, 25, 34, 44). Einige Untersuchungen beschreiben im Kontrast dazu verminderte ACE2-Level in pathologischen Zuständen des Herzens (2). Ursache hierfür könnten die erhöhten Ang II-Spiegel in erkranktem Herzgewebe sein, welche das bereits beschriebene Ectodomain Shedding des ACE2 durch ADAM17 stimulieren (48). Da die lösliche Variante des Enzyms ihre Peptidaseeigenschaft behält, wäre eine kompensatorische Funktion in diesem Fall dennoch denkbar. Im Tiermodell konnte beispielsweise beobachtet werden, dass die systemische Applikation von rekombinantem ACE2 die ventrikuläre Funktion verbessern kann (49).

In ACE2-defizienten Nagern konnte verminderte Myokardkontraktilität, erhöhte Ang II-Level im Herzgewebe und im Plasma sowie gesteigerte Transkription Hypoxie-assozierter Gene nachgewiesen werden, wenngleich diese Ergebnisse nur eingeschränkt reproduzierbar waren (2, 50). Ähnliche Resultate ergaben Untersuchungen an Mas-Knockoutmodellen (51).

Insgesamt scheint ACE2 also eher kardioprotektive Eigenschaften zu besitzen und sich positiv auf die Herzleistung auszuwirken. Analoge Beobachtungen konnten in Bezug auf die beiden Rezeptoren Mas-1 und AT2 gemacht werden (34, 44).

Die Überaktivität des kanonischen RAAS und damit einhergehende gesteigerte Ang II-Level spielen eine wichtige Rolle in der Genese arterieller Hypertonie. In hypertensiven Nagern konnte zusätzlich eine verminderte Aktivität des ACE2 gemessen werden (12). In ACE2-defizienten Mäusen zeigten sich je nach genetischem Hintergrund zwar meist keine oder nur mild erhöhte basale Blutdruckwerte im Vergleich zum Wildtyp, die allerdings bei Ang II-Infusion wesentlich stärker anstiegen. Dies legt nahe, dass das nicht-kanonische RAAS vor allem bei pathologischer Überaktivität der kanonischen Systemachse an der Regulation des systemischen Blutdrucks beteiligt ist (10). Ähnliche Resultate lieferten Untersuchungen an Mas-Knockoutmodellen (34). Bei ACE2-Überexpression in Ratten traten dagegen verminderte Blutdruckwerte auf (12). Diese Beobachtungen eröffnen unter Umständen neue Möglichkeiten der antihypertensiven Therapie in Form von teilweise bereits existierenden ACE2-Enhancern oder Mas-Rezeptor-Agonisten (12, 52). Interessanterweise steigt die ACE2-Expression unter der Einnahme bereits etablierter AT1-Rezeptorblockern und ACE-Inhibitoren, die gleichzeitig keinen Einfluss auf die ACE2-Aktivität besitzen. Dies könnte zusätzlich zur antihypertensiven und kardio- und nephroprotektiven Wirkung beitragen (10, 12).

1.5.2 Niere

In der Niere treten hauptsächlich ACE2 und der Mas-Rezeptor als wichtigste Komponenten des nicht-kanonischen RAAS auf. Aufgrund vieler verschiedener Untersuchungen unterschiedlichster Spezies und Methoden mit ambivalenten Ergebnissen ist eine zuverlässige Lokalisation des Enzyms und der zugehörigen Rezeptoren nur schwer vorzunehmen. Während beispielsweise die Beobachtungen in

Mäusen hinsichtlich der Expression von ACE2 im proximalen Tubulus weitgehend übereinstimmen, wird die genaue Proteinverteilung entlang des restlichen Nephrons kontrovers diskutiert^(53–57).

Ebenso unterschiedlich gestalten sich die Resultate zu Untersuchungen des ACE2 in diversen renalen Schädigungsmodellen, da sowohl eine erhöhte als auch verminderte Expression beobachtet werden konnten. Insgesamt spricht der Großteil der Studien allerdings eher für eine Erniedrigung der ACE2-Level bei verschiedenen Nierenerkrankungen, darunter beispielsweise diabetische und hypertensive Nephropathie^(10, 55, 56). Grund hierfür könnte unter anderem das gesteigerte Ectodomain Shedding sein, das durch Glucose im Primärharn zusätzlich stimuliert wird⁽³¹⁾. Das resultierende ACE2 im Urin könnte künftig als diagnostischer Marker bei Diabetes fungieren⁽¹⁰⁾. Teilweise konnte vor dem Abfall der Enzymexpression eine initiale Steigerung gemessen werden, was eine Erklärung für die ambivalenten Ergebnisse sein könnte. Diese Steigerung ist möglicherweise Ausdruck für einen frühen Kompensationsmechanismus im Falle einer Nierenerkrankung⁽¹⁰⁾. In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung, dass die Applikation von rekombinantem ACE2 Manifestationen renaler Schädigung, etwa in Form von Albuminurie bei diabetischer Nephropathie, abmildern kann⁽⁵⁸⁾. Als zusätzlich nephroprotektiver Mechanismus konnte mittlerweile gezeigt werden, dass ACE2 positiv mit der Glukosetoleranz bei diabetischer Stoffwechsellage in Verbindung steht und der Entwicklung einer Insulinresistenz entgegenwirkt^(6, 59).

Die Reduktion der ACE2-Expression bei diversen Erkrankungen der Niere könnte einen wesentlichen Faktor bei deren Genese darstellen, wie ACE2-Null-Modelle nahelegen. Beispielsweise agraviert ACE2-Defizienz in Akita-Mäusen die Ang II-vermittelte Nierenschädigung⁽⁶⁰⁾. In Mas-Knockoutmäusen tritt diese sogar spontan auf und äußert sich in Form einer Mikroalbuminurie⁽⁶¹⁾.

1.5.3 Leber

Sowohl ACE2 als auch der korrespondierende Rezeptor Mas-1 konnten in gesundem Lebergewebe nachgewiesen werden⁽⁶²⁾. ACE2 tritt dabei im Endothel, Gallengängen und Hepatozyten in Erscheinung⁽⁶³⁾. In humaner zirrhotischer und Hepatitis C-infizierter Leber sowie in Fibrosemodellen an Nagern wurde eine erhöhte Expression

von ACE2 und Mas beobachtet^(63–66), was wiederum einen kompensatorischen Mechanismus gegen den Ang II-vermittelten hepatischen Schaden darstellen könnte^(67–69). Diese Vermutung stimmt mit den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen überein, die belegen konnten, dass die Applikation oder Überexpression von ACE2 oder Ang(1-7) die Leberschädigung abmildern konnten^(70–73). Neben den therapeutischen Perspektiven könnte dem nicht-kanonischen RAAS künftig auch eine Bedeutung in der Diagnostik diverser Lebererkrankungen zukommen, da beobachtet werden konnte, dass die systemischen Ang(1-7)-Spiegel in manchen pathologischen Zuständen mit der Schwere der hepatischen Schädigung korrelieren⁽⁶⁶⁾. Des Weiteren könnte sich auch ACE2 als prognostischer Marker eignen. Beim hepatzellulären Karzinom, das sich häufig aus der Präkanzerose Leberzirrhose entwickelt, scheinen höhere ACE2-Level mit einer verlängerten Lebensdauer assoziiert zu sein⁽⁷⁴⁾. Eine Inhibition des Tumorwachstums und –angiogenese sowie der Metastasierung durch ACE2 konnte bereits bei anderen Neoplasien, wie Karzinomen der Mamma, der Prostata und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden^(75–77).

1.5.4 Zentrales Nervensystem

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Komponenten des nicht-kanonischen RAAS konnten bereits zuvor im Gehirn verschiedener Spezies nachgewiesen werden^(38, 78, 79). ACE2 zeigte in den meisten Untersuchungen eine ausgeprägte Expression im olfaktorischen System. Des Weiteren tritt es in der Substantia nigra, dem Plexus choroideus der Ventrikel und einigen weiteren Arealen in Erscheinung, wenngleich die Beobachtungen wiederum teilweise ambivalent waren^(78, 80–82). Hinsichtlich Mas-1 scheint das Gehirn Ort der höchsten Abundanz zu sein⁽³⁸⁾, die genaue Lokalisation wird ebenfalls kontrovers diskutiert.

Funktionell ist das nicht-kanonische RAAS offenbar an der Blutdruckregulation im Hypothalamus beteiligt. An ACE2-Überexpressionsmodellen konnte gezeigt werden, dass das Enzym die zentralen Ang II-Spiegel erniedrigt und die NO-Produktion steigert und dadurch neurogen antihypertensive und sympatholytische Effekte vermittelt⁽⁸³⁾. Außerdem scheint das nicht-kanonische RAAS protektiv gegenüber ischämischen Hirnschäden und Neuroinflammation durch Verminderung des oxidativen Stresses zu wirken^(84–86).

Andere Untersuchungen legen nahe, dass ACE2 und Mas essentielle Faktoren für die kognitiven und emotionalen Fähigkeiten darstellen. Dafür sprechen Beobachtungen an ACE2- und Mas-defizienten Nagern, bei denen behaviorale Veränderungen, kognitive Defizite und gestörte Lern- und Gedächtnisprozesse auftraten^(87–90).

1.5.5 Lunge

Seitdem bekannt wurde, dass beide aerogen übertragbare humanpathogene SARS-Co-Viren mitunter ACE2 als Entry-Rezeptor nutzen, gibt es intensive investigative Bestrebungen, diesen genauer zu lokalisieren⁽⁹¹⁾. Mittlerweile konnte das Enzym im gesamten humanem Respirationstrakt nachgewiesen werden, angefangen bei Epithelien der Mundhöhle, über das Flimmerepithel in Nasopharynx und Bronchialsystem, bis hin zu den alveolären Pneumozyten. Den Hauptexpressionsort scheinen dabei Typ 2 Pneumozyten darzustellen^(21, 22, 92, 93).

Das kanonische RAAS ist, ähnlich wie in anderen Organen, mit der Pathogenese pulmonaler Erkrankungen assoziiert^(94, 95). Erhöhte Ang II-Spiegel können sowohl in tierischen Schädigungsmodellen als auch in Patienten, beispielsweise bei RSV-Infektion, festgestellt werden^(96, 97). Hierbei könnte die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Rezeptor-Achse als protektiver Antagonist fungieren. Diese Vermutung legen Beobachtungen nahe, im Rahmen derer pulmonale Schädigung und ARDS durch rekombinantes ACE2 und Ang(1-7) abgemildert werden konnten^(97–99). ACE2-Defizienz hingegen verschlechtert das Outcome in diversen ARDS-Modellen⁽¹⁰⁰⁾.

1.6 ACE2 und SARS-CoV-2

Von aktuellem Interesse ist vor allem die Rolle des ACE2 im Entry-Mechanismus der SARS-Coronaviren. Bereits während der SARS-Pandemie 2002/2003 konnte das membranständige Enzym als Virusrezeptor identifiziert werden⁽¹⁰¹⁾. Die SARS-Viren binden bei Infektion mit ihrer Rezeptor bindenden Domäne des Spike-Glycoproteins an ACE2 und penetrieren in Folge dessen die Zielzelle⁽¹⁰²⁾. Bei diesem Andockmechanismus sind außerdem diverse Präaktivatoren der Wirtszelle, insbesondere TMPRSS2 und Furin, beteiligt, die das Spike-Protein vor Rezeptorinteraktion günstig modifizieren⁽¹⁰³⁾.

Des Weiteren induziert der Entry-Prozess der SARS-Coronaviren das ADAM17 vermittelte Ectodomain Shedding des ACE2. Ob dieser Mechanismus dem Erreger die Zellpenetration erleichtert oder erschwert, wird kontrovers diskutiert, ebenso ob eine Infektion die ACE2-Expression in netto steigert oder mindert^(94, 104–107).

Obwohl SARS-CoV-2 über den Respirationstrakt in Organismus gelangt und sich Covid-19 primär in den Atemwegen und pulmonal manifestiert, imponieren vor allem schwerere Fälle als Multisystemerkrankung. Ursache hierfür könnten unter anderem die oft beschriebene Downregulation des ACE2 und in Folge dessen höhere Ang II-Level sein. Diese Überaktivität des kanonischen RAAS induziert in vielen Geweben oxidativen Stress, wirkt proinflammatorisch und prothrombotisch und könnte so an der Genese der Schädigung verschiedener Organsysteme bei Covid-19 beteiligt sein^(11, 108).

Ein weiterer Pathomechanismus steht eventuell mit dem Kinin-Kallikrein-System in Verbindung. Auch dieses System besteht aus zwei Achsen: Bradykinin (BK) vermittelt eher protektive Effekte, wie Vasodilatation, und antagonisiert thrombotische Vorgänge. Andere Bradykininderivate (DEABK und LDEABK) wirken hingegen proinflammatorisch und tragen zur Gewebsschädigung bei. Während ACE BK inaktiviert, verhindert ACE2 die Interaktion von DEABK und LDEABK mit ihrem Rezeptor. Durch die Aktivierung des kanonischen RAAS wird auch das Kinin-Kallikrein-System in Richtung des prothrombotischen, proinflammatorischen Armes beeinflusst⁽¹⁰⁹⁾. Die Hyperkoagulabilität ist ein zentrales Problem bei schwer erkrankten Covid-19-Patienten. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass diese, neben den genannten Mechanismen, durch direkte Interaktion des Virus mit ACE2 auf der Thrombozytenoberfläche zustande kommt⁽¹¹⁰⁾.

Eine direkte Infektion extrapulmonaler Gewebe, beispielsweise der Niere oder des Gehirns, ist wahrscheinlich, allerdings nur teilweise in vivo nachweisbar. Dies könnte eine weitere Ursache der Dysfunktion multipler Organsysteme, wie Nierenversagen oder olfaktorische Missemmpfindungen, bei Covid-19 darstellen^(111–114).

Interessanterweise ist eine Infektion mit SARS-CoV-2 bei Wildtyp-Mäusen nicht möglich. Grund hierfür ist die niedrige Affinität des Spike-Proteins gegenüber murinem ACE2⁽¹¹⁵⁾. Für investigative Zwecke wurden deshalb transgene Mäuse entwickelt, die humanes ACE2 exprimieren und so mit SARS-CoV-2 infiziert werden konnten. Covid-19 manifestiert sich in diesen Tieren auf ähnliche Weise wie im Menschen, beispielsweise in Form von interstitieller Pneumonie, Neuroinfektion, Vaskulitis, Zytokinfreisetzung, etc. und verläuft in vielen Fällen letal^(115–117).

1.7 Zielsetzung der Dissertation

ACE2 ist mit seinen beiden korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 ein essentieller Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Die beiden Arme des RAAS stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht zueinander, das an der Aufrechterhaltung vieler physiologischer Funktionen im Organismus maßgeblich beteiligt ist.

Im Rahmen der Genese und Progression etlicher Erkrankungen kommt es zu einer Überaktivität der kanonischen Systemachse, welche sowohl systemisch als auch lokal im Gewebe nachteilige Effekte vermittelt. In diesen pathologischen Zuständen fungiert das nicht-kanonische RAAS als zentraler Mediator protektiver antagonistischer Effekte. Künftig könnten seine Komponenten deshalb eine wichtige Rolle in klinischen Therapie- und Diagnoseverfahren einnehmen, etwa bei arterieller Hypertonie, Herzinsuffizienz, ischämisch-thrombotischen Ereignissen, fibrotisch-degenerativen und neoplastischen Organveränderungen und nicht zuletzt Infektionskrankheiten wie Covid-19.

Trotz der intensiven biomedizinischen Forschung hinsichtlich des ACE2 seit seiner Beschreibung als SARS-CoV-2-Rezeptor zeigt die Datenlage bezüglich der Lokalisation des Enzyms in verschiedenen Organen ein äußerst heterogenes Bild. Da der Expressionsort und die Funktionalität eines Proteins eng miteinander verknüpft sind, ist es von großem Interesse, mehr über seine genaue Organ- und Zellverteilung zu erfahren.

Ziel dieser Dissertation ist es, das Schlüsselenzym des nicht-kanonischen RAAS ACE2 gemeinsam mit seinen beiden korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 und seinem kanonischen Analogon ACE in ausgewählten Organen näher zu lokalisieren. Dabei kamen die vorab beschriebenen Gewebe Herz, Niere, Leber, Lunge und Gehirn zum Einsatz. Als zentraler endokriner Regulator der Blutdruckverhältnisse und der autonomen Körperfunktionen war zusätzlich die Nebenniere Gegenstand der Betrachtung.

Während die bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema meist nur auf mRNA-Ebene oder Proteinebene getrennt voneinander stattfanden, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine parallele Betrachtung und Gegenüberstellung erfolgen. Hierzu dienten einerseits RNA-analytische Methoden und andererseits Proteindetektionsverfahren, die im Folgenden genauer erläutert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Chemidoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Computer	Dell, Intel Core i7, NVIDIA GeForce GTX1080 8 GB
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophorese-Netzteil	EPS 3501, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK
ELISA-Reader	Ao Microplate Reader, Azure Biosystems, Dublin, USA
Feuchtekammer	Gies, Niederaula
Filtersets	
Cy2-Filter	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Cy3-Filter	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy5-Filter	Filter set 50, Zeiss, Jena
DAPI-Filter	Filter set 49, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	Colibri 7, Zeiss Jena
Gelelektrophorese-System	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Homogenisator (RNA-Analyse)	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Homogenisator (Protein-Analyse)	Bandelin Sonopuls, Bandelin electronic, Berlin
Kamera	AxioCam 506 mono, Zeiss, Jena
Magnetrührer	IKA-Combimag RCT, IKA, Staufen im Breisgau
Mikroskop	Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Geräte	Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, England
Photometer	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen

Pipetten	Pipetman P2, P10, Gilson, Middleton, USA Finnpipette Thermo Labsystems (5-50µl, 20-200µl, 200-1000µl), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
RNAscope® Wärmeofen	HybEZ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Schüttler	Shaker Dos-10L, neoLab, Heidelberg
Steamer, Typ 3216	Braun, Neu-Isenburg
Thermoblockcycler	Fast Gene Ultra Cycler Gradient, Nippon Genetics, Düren
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	pH 50 set, Roth, Karlsruhe
Vortexgerät	Genie 2, Scientific Industries
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Waagen	sartorius-Waage 1502, IKA, Darmstadt Feinwaage ABT 120-5DM, Kern, Balingen-Frommern
Wasserbäder	Aqualine AL12, Lauda, Lauda-Königshofen 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Kühlzentrifuge, VWR, Radnor, USA Zentrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg Tischzentrifuge, neoLab, Heidelberg Plattenzentrifuge, Hermle Z300

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Blotting Papier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Chemilumineszenz-Filme Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einmalwiegeschalen	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter (Sartorius)	Fisher Scientific, Waltham, USA
Fettstift ImmEdge™ hydrophobic barrier Pen (FISH)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Fettstift Liquid Blocker, PAP-Pen-Mini, Liquid-Repellent Slide Marker Pen (IF)	Science Services, München
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Glas-Pasteur-Pipetten 150mm	VWR, Radnor, USA
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Mikrotomklingen	Feather Microtome Blade (Stainless Steel) R35
Multiwellplatten 96er	Sarstedt, Nümbrecht
Multiply® - Pro Gefäß 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran (\varnothing 0,45 µm)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Objekträger, Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm (Nescofilm)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-One, Frickehausen
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 13 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 50 ml (Cellstar Tubes)	Greiner Bio-One, Frickehausen
Reagiergefäße 2 ml	Nerbe plus, Winsen
Serologische Pipetten 10 ml, 20 ml	Nerbe plus, Winsen
Stabpipette 25ml (Cellstar)	Greiner Bio-One, Frickehausen
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Western Blot-Gele Mini-PROTEAN TGX Gels	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Azur II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borax ($Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$)	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eindeckmedium ProLong Gold (FISH)	Thermo Scientific, Waltham, USA

Eindeckelmedium Glycergel mounting medium (IF)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Entwicklerlösung (G153)	Agfa, Mortsel, Belgien
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Fixiererlösung (G354)	Agfa, Mortsel, Belgien
Formaldehyd-Lösung (mind. 37%)	Merck-Darmstadt
Glycerin 87%	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Labochem international, Heidelberg
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Horse serum	Gibco, Life technologies, Grand Island, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol p.a.	Fisher Chemical, Loughborough, UK
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Leupeptin Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lightcycler® 480 SYBR Green Master PCR Kit	Roche, Mannheim
Magermilchpulver Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl	Promega, Mannheim
NaCl	VWR, Radnor, USA
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5 µg/µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Paraplast-Plus Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCR Nucleotide Mix (dNTP, 2,5 mM)	Promega, Mannheim
Pefabloc® SC Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim

Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RNAscope® H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Multiplex Fluorescent Detection Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Multiplex TSA® Buffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Target Retrieval Reagent	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Wash Buffer (50x)	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TriFast™-Reagenz	VWR, Radnor, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Affymetrix, Cleveland, USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opal™ Fluorophore Reagent Packs (Opal 570, Opal 690)	Akoya Biosciences, Marlborough, USA
Xylol	Honeywell, Morris Plains, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien für die nachstehenden Puffer und Lösungen in Reinstwasser (Milli-Q-Wasser) gelöst. Die pH-Titration erfolgte mittels HCl- bzw. NaOH-Lösung (1 mol/L).

Fixierlösung zur Perfusion, pH 7,4, filtriert (Immunfluoreszenz)

Dulbecco's PBS	
Paraformaldehyd	30 g/l

Fixierlösung zur Perfusion, pH 7,0, filtriert (FISH)

Formalin (37% Stammlösung)	10%
NaH ₂ PO ₄	4,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	6,5 g/l

Richardsonlösung

Methylenblau	5 mg/ml
Borax	5 mg/ml
Azur II	5 mg/ml

Tris-EDTA-Puffer, pH 8,5

Tris	1,20 g/l
EDTA	0,37 g/l

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

Lösung A	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	3,04 g/l
NaCl	10,91 g/l
Lösung B (zur pH-Titration)	
KH ₂ PO ₄	1,36 g/l

Blockierlösung (Immunfluoreszenz), filtriert

PBS-Otto	
BSA (Bovine Serum Albumin)	1 %
Horse Serum	10 %

Dissection Buffer

Saccharose	102,7 g/l
Imidazol	1,7 g/l
EDTA	2,0 g/l
Leupeptin	4 mg/l
Pefabloc	96 mg/l

Tris-HCl, pH 6,8

Tris	121,14 g/l
------	------------

Sample Buffer

SDS (Natriumdodecylsulfat)	100 mg/ml
Tris-HCl	25 %
β -Mercaptoethanol	5 %
Glycerin	50 %
Bromphenolblau	0,5 mg/ml

Running Buffer

Tris	3,0 g/l
Glycin	14,0 g/l
SDS (Natriumdodecylsulfat)	1,0 g/l

Blotting Buffer

Tris	3,0 g/l
Glycin	14,0 g/l
Methanol	20 %

PBS-T-Puffer

NaCl	5,8 g/l
NaH ₂ PO ₄	2,4 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,4 g/l
TWEEN® 20	0,1 %

Blockierlösung (Western Blot)

PBS-T-Puffer	
Magermilchpulver	5 %

2.1.5 Primer

Die Primer für die quantitative Real-Time PCR wurden von den Firmen Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) und biomers.net GmbH (Ulm) in der gewünschten Nukleotidsequenz synthetisiert. Durch Lösen in nukleasefreiem Reinstwasser wurden die als lyophyliertes Pulver vorliegenden Primer auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Gen	Hersteller	Primer	Sequenz (5' à 3')
ACE	Eurofins Genomics	s	CCACCGTTACCCGACAACTATCC
		as	GCGTACTCGTTCAACAAACACTT
ACE2	Eurofins Genomics	s	ACCCTTCCTACATCAGCCCCACTG
		as	TGTCCAAAATCTACCCCCACATAT
AT1a	Eurofins Genomics	s	TCACCAGATCAACTGCATTGTA
		as	AGAGTTAAGGGCCATTTGCTTT
AT1b	Eurofins Genomics	s	TGGCTTGGCTAGTTGCCG
		as	ACCCAGTCCAATGGGGAGT
AT2	biomers.net	s	GAAGCTCCGCAGTGTGTTA
		as	TGGCTAGGCTGATTACATGC
GNB2L1	biomers.net	s	TCTGCAAGTACACGGTCCAG
		as	GAGACGATGATAGGGTTGCTG
Mas	Eurofins Genomics	s	GGTGCCTATCGGT CCTCTAC
		as	CATGGTGGTCACCAAGCACG

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Western Blot
Rabbit-anti-ACE	Novus Biologicals, Littleton, USA	1:100	1:1000
Goat-anti-ACE2	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:100	1:1000
Mouse-anti-asma	Abcam, Cambridge, UK	1:400	-
Rabbit-anti-PDGFRβ	Abcam, Cambridge, UK	1:100	-

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey-anti-Goat	Cy3	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-mouse	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-rabbit	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-goat	HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	1:2000
Donkey-anti-rabbit	HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	1:2000

2.1.7 Sonden für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Alle verwendeten Sonden wurden vom Hersteller Advanced Cell Diagnostics (Hayward, USA) bezogen.

Sondenbezeichnung	Ziel-mRNA
Mm-Acta2-C1/C2	αsma
Mm-Ace-C1	ACE
Mm-Ace2-C2	ACE2
Mm-Agtr2-C1	AT2-Rezeptor
Mm-AQP2-C2	Aquaporin 2
Mm-Calb1-C2	Calbindin
Mm-Pecam-1-C2	cluster of differentiation CD31
Mm-Gja1-C1	Connexin 43
Mm-Gjb2-C1	Connexin 26
Mm-Nphs-1-C2	Nephrin
Mm-Lrp2-C2	Megalin
Mm-Pdgfrb-C2	PDGFRβ

2.1.8 Software und Internetdienste

Die vorliegende Arbeit wurde mit *Microsoft Office 2016* verfasst. Als Mikroskopiesoftware diente *ZEN blue* von Zeiss. Zur Bearbeitung der Aufnahmen wurde ebenfalls *ZEN blue* sowie *Adobe Photoshop CS5* verwendet. Die Quantifizierung der Western Blot-Analyse erfolgte mit *Image LabTM* von Bio-Rad. Die aufgeführten Diagramme und Graphiken wurden mit *GraphPad Prism 8* und *CorelDRAW X6* erstellt. Zur Literaturrecherche wurde *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information) herangezogen. Als Zitiersoftware kam *Citavi 6.10* der Swiss Academic Software GmbH zum Einsatz.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Untersuchte Mauslinien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurden entsprechend den „Guidelines for the care and use of laboratory animals“ der National Institutes of Health durchgeführt und von den lokalen Tierschutzbehörden bewilligt (Aktenzeichen: 55.2-2532.2-935-28). Die Tierhaltung erfolgte dabei unter den vorgeschriebenen Optimalkonditionen (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-/Dunkelintervall 12 h, Ernährung ad libitum).

Für die nachfolgenden Versuche wurden ausschließlich Wildtypen der C57Bl6/N-Maus im Alter von 8-12 Wochen verwendet.

2.2.1.2 Renale Schädigungsmodelle

Neben basalen Mausnieren kamen im Rahmen der durchgeführten Experimente außerdem Organe aus folgenden renalen Schädigungsmodellen zum Einsatz:

- Adenin-induzierte Nephropathie: Die dreiwöchige Gabe von adeninhaltigem Futter (0,2% Adenin) führt zur proximaltubulären Akkumulation von Adeninkristallen und zu konsekutiver tubulointerstitieller Fibrose und Tubulusatrophie⁽¹¹⁸⁾.
- Unilaterale Ureterobstruktion (UUO): Unter Isoflurananästhesie wird um den linken Ureter eine Ligatur etabliert, während der kontralaterale ohne Obstruktion verbleibt. In Folge dessen entwickelt sich in der Niere mit ligiertem Ureter ein tubulärer Schaden, der mit Fibrose einhergeht⁽¹¹⁹⁾. Nach fünf Tagen erfolgt die Organentnahme.

Die verwendeten Nierenpräparate wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Organpräparation

2.2.2.1 Präparation zur histologischen Untersuchung

Retrograde arterielle Perfusion

Zur Fixation wurden die Organe unter Allgemeinanästhesie *in situ* zunächst mit sterilem NaCl/Heparin-Gemisch und anschließend mit der entsprechenden Fixierlösung (IF oder FISH) retrograd arteriell perfundiert. Die so präparierten Gewebe wurden entnommen und für 24-36 h bei RT in der Perfusionslösung (FISH) oder in 70% Methanol (IF) gelagert. Die verwendeten fixierten Organe wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Einbettung in Paraffin

Die fixierten Organe wurden in steriles PBS-Puffer gewaschen und nach folgendem Schema eingebettet:

Immunfluoreszenzfärbung	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	
70% Methanol	70% Ethanol	2 x 30 min, RT
80% Methanol	80% Ethanol	2 x 30 min, RT
90% Methanol	90% Ethanol	2 x 30 min, RT
100% Methanol	100% Ethanol	2 x 30 min, RT
100% Isopropanol		2 x 30 min, RT
100% Isopropanol		1 x 30 min, 45°C
1:1 Isopropanol/Paraffin		1 x 30 min, 60°C
Paraffin		2 x 24 h, 60°C

Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin gefüllte Silikon-Formen und die Aushärtung bei RT.

Anfertigung von Gewebsschnitten

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden von den eingebetteten Organen jeweils 3 µm (Nebenniere) bzw. 5 µm (sonstige Organe) dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden in ein 41°C warmes Wasserbad zur Entfaltung überführt und anschließend auf Objektträger transferiert. Angesichts der geringen Organgröße wurde bei den zu Beginn abgenommenen Schnitten der Nebenniere eine Schnellfärbung mittels

Richardsonlösung durchgeführt, um sicherzustellen, sämtliche wesentliche Organstrukturen zu erfassen. Sobald unter dem Mikroskop die gesamte organspezifische Histologie adäquat zu beurteilen war, wurden die nachfolgenden Schnitte nicht mehr schnell gefärbt und für die FISH und IF verwendet. Vor der weiteren Verwendung ist eine mind. zwölfstündige Trocknungszeit bei RT erforderlich.

2.2.2.2 Präparation zur quanitativen mRNA- und Proteinanalyse

Die Entnahme der Organe zur weiteren mRNA- und Proteinanalyse erfolgte nach kurzer Narkose mittels Isofluran und anschließender Dekapitation. Die Gewebe wurden freipräpariert, ektomiert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate bei -80°C gelagert.

Sämtliche verwendeten Organe wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.3 mRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR

Zur Messung der mRNA-Abundanz in den untersuchten Geweben war zunächst ein RNA-Isolierungsschritt mit anschließender Transkription in cDNA notwendig. Um eine Degradation der Nukleinsäuren zu vermeiden, wurden alle Proben während des Experiments, soweit nicht anders beschrieben, stets auf Eis gelagert.

2.2.3.1 Isolierung der RNA

Die angewandte RNA-Isolierungsmethode basiert auf dem Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahren nach Chomczynski und Sacchi⁽¹²⁰⁾.

Die bei -80°C gelagerten Organe wurden in jeweils 1ml TriFast™ vollständig homogenisiert und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 200 µl Chloroform und mehrmaligem Invertieren folgte der erste Zentrifugationsschritt (13000 rpm bei 4°C für 20 min). Dabei erfolgte eine Auftrennung in mehrere Phasen, wovon nur der wässrige RNA-haltige Überstand zur weiteren Verwendung abpipettiert wurde. Die DNA-haltige Phenolphase und die proteinhaltige Interphase wurden

vollständig verworfen. Daraufhin wurden jeweils 500 µl Isopropanol zur RNA-Fällung zugegeben. Nach weiterer Zentrifugation (13000 rpm bei 4°C für 30 min) wurde der Überstand abgekippt und das entstandene Pellet in 1 ml Ethanol (75%) gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (13000 rpm bei 4°C für 5 min) wurde der Überstand wiederum verworfen und das RNA-Pellet für 15 min bei RT getrocknet und anschließend in Milli-Q-Wasser gelöst. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA in die deutlich stabilere cDNA ist für die nachfolgende qPCR-Analyse von Vorteil.

Mit Hilfe des Nanodrop-Photometers wurde die RNA-Konzentration der einzelnen Proben ermittelt. Außerdem wurde das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt und nur Proben zugelassen, die dabei einen Wert von 1,8 nicht unterschreiten.

Für die Reverse Transkription wurden jeweils 1 µg RNA, 1 µl Oligo dT₁₅-Primer und Milli-Q-Wasser (ad 10 µl) vorgelegt und bei 65°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des folgenden Mastermix hinzu pipettiert:

5x First Strand Buffer	4 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Milli-Q-H ₂ O	1 µl

Die Proben wurden im Blockcycler für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 2 min auf 95°C geheizt. Dabei binden die Oligo dT-Primer an die Poly-A-Schwänze der mRNA-Moleküle und ermöglichen so die Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase *Reverse Transkriptase*.

Zur weiteren Verwendung zur RT-qPCR wurden die Proben mit 35 µl Milli-Q-Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative Real-Time-PCR

In der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR oder RT-qPCR) wurde die eingesetzte cDNA mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert. Nach Denaturierung der Nukleinsäuren und Anlagerung der Primer kann durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase die gewünschte Ziel-cDNA vervielfältigt werden. Durch Einsatz eines mit der amplifizierten DNA interkalierenden Farbstoffs kann durch ständige Messung der Fluoreszenz und deren Entwicklung im Verlauf indirekt der DNA-Gehalt der Probe ermittelt werden, da dieser proportional zur Intensität des emittierten Lichts ist.

Zur qPCR im LightCycler® wurden zu 1 µl der entsprechenden cDNA-Probe 9 µl des folgenden Ansatzes pipettiert:

LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Primer-Mix (15 µl s + 15 µl as + 270 µl Milli-Q-H ₂ O)	1 µl
Milli-Q-H ₂ O	3 µl

Nach einer zehnminütigen Aktivierungsphase bei 95°C folgten 45 Amplifikationszyklen folgenden Schemas:

1. Denaturierung	95°C	15 s
2. Annealing	58°C	15 s
3. Elongation	72°C	20 s

Mit Hilfe einer entsprechenden Standardverdünnungsreihe (1:10, 1:100 und 1:1000) und den Fluoreszenzmessungen am Ende jedes Zyklus wurde der cDNA-Gehalt der Probe bestimmt. Nach Ablauf aller Zyklen erfolgte außerdem die Analyse des Schmelzverhaltens der amplifizierten DNA. Als Housekeeper-Gen diente GNB2L1.

2.2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

Zur Bestimmung der Proteinexpression in den untersuchten Geweben war zunächst ein Proteinisolierungsschritt vor der weiteren Verwendung im Western Blot notwendig. Um eine Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden alle Proben bis zur SDS-PAGE, soweit nicht anders beschrieben, stets auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde der verwendete Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitoren versetzt.

2.2.4.1 Proteinisolierung

Die bei -80°C gelagerten Organe wurden in der zehnfachen Menge ihres Eigengewichts an Dissection Buffer vollständig homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10000 rpm bei 4°C für 5 min). Der proteinhaltige Überstand wird abpipettiert und zur weiteren Verwendung in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Das zurückbleibende Pellet kann verworfen werden.

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion

Aliquots der zu untersuchenden Proben wurden 1:26 mit Dissection Buffer verdünnt und je 25 µl dieser Verdünnung mit 200 µl folgender Working Solution aus dem Pierce® BCA Protein Assay Kit versetzt:

Reagent A (BCA)	10 ml
Reagent B (CuSO ₄)	200 µl

Anschließend folgt eine 30-minütige schüttelnde Inkubation bei 37°C und 80 rpm.

Die Cu²⁺-Ionen werden von den Proteinen zu einwertigen Kupferionen reduziert, die mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden (121). Durch photometrische Messung bei 562 nm und einer entsprechenden Standardproteinreihe mit im Kit enthaltenen BSA kann der Proteingehalt der eingesetzten Proben bestimmt werden.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE können Proteine in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Zur Denaturierung wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein mit Sample Buffer im Verhältnis 5:1 versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Der enthaltene β-Mercaptoethanol dient der Reduktion der den Proteinen inhärenten Disulfidbrücken. Zur weiteren Denaturierung kam Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Einsatz, das den Proteinen zusätzlich negative Ladung proportional zu ihrer Größe verleiht.

Anschließend erfolgte die Elektrophorese in Running Buffer bei 110 V für 90 min. Die Laufgeschwindigkeit im Gel ist indirekt proportional zum Molekulargewicht. Für die spätere Auswertung wurde neben den untersuchten Proben ein farbiger Protein-Molekulargewichtsstandard mit aufgetrennt.

2.2.3.4 Western Blot

Proteintransfer

Nach erfolgter SDS-PAGE ist zur weiteren Verwendung im Western Blot ein elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran notwendig. Dazu wurde auf die Anodenplatte eine Glasfasermatte geschichtet, gefolgt von zwei Blotting Papieren und dem Polyacrylamid-Gel. Darüber wurde luftblasenfrei die Nitrocellulosemembran gelegt. Als Abschluss des Aufbaus folgten wiederum zwei Schichten Blotting Papier, eine Glasfasermatte und schließlich die Kathodenplatte. Die Proteine wurden in Blotting Buffer bei 150 mA für 120 min transferiert. Anschließend erfolgte eine reversible Kontrollfärbung mit Ponceau S-Lösung. Die darin enthaltene Essigsäure dient der zusätzlichen Fixation der Proteine auf der Membran.

Die nicht besetzten Proteinbindungsstellen wurden während einer zweistündigen schüttelnden Inkubation bei 80 rpm in Magermilchpulverlösung blockiert und die Membran danach für 15 min in PBS-T-Puffer gewaschen.

Immunologisch vermittelte Proteindetektion

Der erste Detektionsschritt besteht in der Bindung des primären Antikörpers an das entsprechende Zielprotein. Dazu wurden die Immunglobuline in Blockierlösung verdünnt und die Nitrocellulosemembran mit dieser Verdünnung überschichtet. Die

Inkubation erfolgte für mind. 12 h bei 4°C. Anschließend wurde die Membran 3 x 15 min in PBS-T-Puffer schüttelnd bei 80 rpm gewaschen. Nach Überschichtung mit der Verdünnung des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers folgte eine zweistündige Inkubation bei RT, an die sich wiederum ein 3 x 15 min Waschschnitt mit PBS-T-Puffer anschloss. Die Detektion der an die Antikörper gekoppelten Proteine erfolgte mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL). Dabei wird Luminol oxidiert und somit in einen energetisch angeregten, chemilumineszenten Zustand versetzt. Dieser Vorgang wird durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Horseradish Peroxidase (HRP) katalysiert⁽¹²²⁾. Dazu wurde die Membran mit 8 ml des Pierce® ECL Western Blotting Substrate für 60 s überschichtet. Durch Auflegen eines Chemilumineszenz-Films für 5 min (ACE2) bzw. 1 min (ACE) und anschließender Entwicklung im Fotolabor konnten die so entstandenen Signale visualisiert und mit Hilfe der ImageLab™-Software relativ zu einander quantifiziert werden.

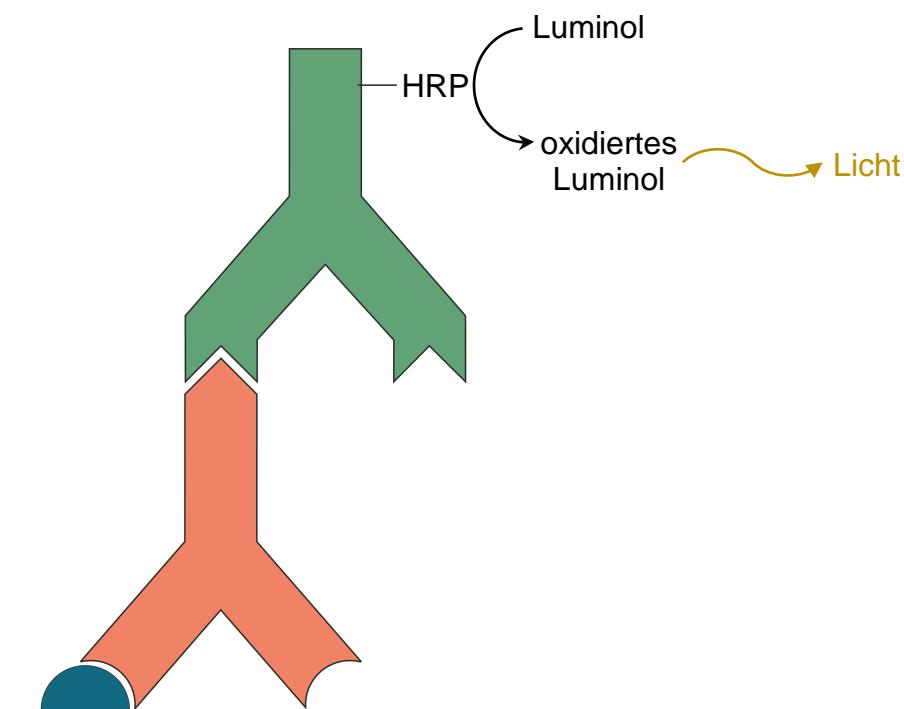


Abbildung 4: Schematische Darstellung der immunologischen Detektion eines Zielproteins im Western Blot.

Der Primärantikörper (orange) bindet an das Zielantigen (blau) auf der Nitrocellulosemembran. Der erste Antikörper besitzt ein Epitop, wogegen sich der Sekundärantikörper (grün) richtet. Die daran gekoppelte Horseradish Peroxidase katalysiert die chemilumineszente Reaktion.

2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) stellt eine molekularbiologische Möglichkeit zur selektiven Visualisierung einer Ziel-mRNA in situ dar. Dafür hybridisieren nach mehreren Permeabilisierungsschritten spezifische, zur Ziel-Nukleinsäure partiell komplementäre Sonden mit der RNA. Durch mehrere Amplifizierungsvorgänge werden die Hybridisierungssignale verstärkt und mittels Konjugation fluoreszenter Farbstoffe visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht.

Zunächst wurden die Objektträger mit den zu untersuchenden Organen für 1 h bei 60°C inkubiert, danach für 2 x 5 min in Xylol und 2 x 1 min in Ethanol entparaffiniert und für 5 min bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Gewebe für 10 min mit H₂O₂ bei RT bedeckt. Nach kurzem Waschen in Milli-Q-H₂O wurden die Schnitte in 200 ml 1x konzentrierter RNAscope® Target Retrieval-Lösung für 15 min gekocht. Es folgten zwei weitere kurze Waschschrifte in H₂O und Ethanol. Die Gewebe wurden mit einem Fettstift umrandet und mind. 5 min getrocknet. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des RNAscope® Multiplex Fluorescent v2 Assay im HybEZ™-Oven bei 40°C. Nach jedem einzelnen Versuchsschritt erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, ein Waschvorgang in 1x konzentriertem RNAscope® Wash Buffer für 2 x 2 min. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte jeweils vollständig bedeckt und stets feucht gehalten wurden.

Protease Plus	30 min
Waschen in Milli-Q-H ₂ O	2 x kurz
Sondenmix (C2/C1: 1:50)	2 h
AMP 1	30 min
AMP 2	30 min
AMP 3	15 min
HRP C1	15 min
Opal™ Fluorophor 570/Cy3 (1:750 Verdünnung in TSA®-Puffer)	30 min
HRP Blocker	15 min
HRP C2	15 min
Opal™ Fluorophor 690/Cy5 (1:750 Verdünnung in TSA®-Puffer)	30 min
HRP Blocker	15 min

DAPI

30 s

Zur Mikroskopie wurden die Objektträger mit Hilfe eines Eideckelmediums mit einem Deckglas versehen. Die Lagerung erfolgte bei Dunkelheit und 4°C.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung können Epitope in histologischen Schnitten durch immunologische Verfahren visualisiert werden. Durch Bindung von primären und fluoreszent markierten sekundären Antikörpern lässt sich die Expression der Zielstrukturen im Gewebsschnitt beobachten.

Bevor die Immunfluoreszenzfärbung vorgenommen werden konnte, mussten die Schnitte zunächst nach folgendem Schema entparaffiniert und rehydriert werden:

Xylol	2 x 15 min
100% Isopropanol	1 min
96% Isopropanol	mehrmals kurz
80% Isopropanol	mehrmals kurz
70% Isopropanol	mehrmals kurz
H ₂ O	kurz

Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 45 min in Tris-EDTA-Puffer gekocht und für weitere 30 min bei RT abgekühlt. Die Objektträger wurden 3 x 5 min in PBS-Otto bei 80 rpm gewaschen. Nach der Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift erfolgte die Blockade unspezifischer potentieller Bindungsstellen für 20 min. Mit der dazu verwendeten Blockierlösung wurden außerdem Primär- und fluoreszent markierter Sekundärantikörper verdünnt. Mit Ersterem wurden die Schnitte bedeckt und für mind. 12 h bei 4°C inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte à 5 min in Blockierlösung. Danach wurde die Sekundärantikörper-Verdünnung auf die Gewebe pipettiert und für 1,5 h bei RT und Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger 3 x 15 min in PBS-Otto gewaschen, kurz in H₂O getaucht und anschließend mit Hilfe eines Eideckelmediums mit einem Deckglas versehen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C und Abwesenheit von Licht.

2.2.7 Mikroskopie

Die Aufnahmen der untersuchten Gewebe wurden mit Hilfe des *AxioObserver.Z1* Mikroskops mit motorisierter Objektauflage sowie der Schwarz-Weiß-CCD-Kamera *AxioCam 506 mono* von Zeiss angefertigt. Die Übersichten der gezeigten Organe wurden durch Kachelaufnahmen in 200-facher Vergrößerung zusammengesetzt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch passende Fluoreszenzfilter angeregt und das emittierte Licht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen.

Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy 2	450 – 490	500 – 550
Cy 3	533 – 558	570 – 640
Cy 5	625 – 655	665 – 715
DAPI	335 – 383	420 – 470

2.2.8 Statistische Auswertung

Sämtliche ermittelten Messwerte wurden jeweils als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Um auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu testen, fand der Student's t-Test Anwendung. Statistiken mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen murinen Organen

Folgende Diagramme basieren auf Daten der RT-qPCR verschiedener Komponenten des RAAS in den Organen Niere, Leber, Lunge, Herz, Gehirn und Nebenniere der Maus. Aufgrund des empfindlichen Gleichgewichts beider Systemarme, das bei der Genese und Progression zahlreicher Erkrankungen diverser Organe beteiligt ist, wurde neben dem nicht-kanonischen auch das kanonische RAAS betrachtet, um einen Eindruck darüber zu erhalten, wie sich das Verhältnis der beiden Achsen innerhalb und zwischen den Geweben quantitativ darstellt.

3.1.1 Nicht-kanonisches RAAS

Im Rahmen der quantitativen mRNA-Analyse des nicht-kanonischen RAAS wurden das Schlüsselenzym ACE2, sowie die beiden Ang(1-7)- bzw. Ang(1-9)-Rezeptoren Mas-1 und AT2 untersucht.

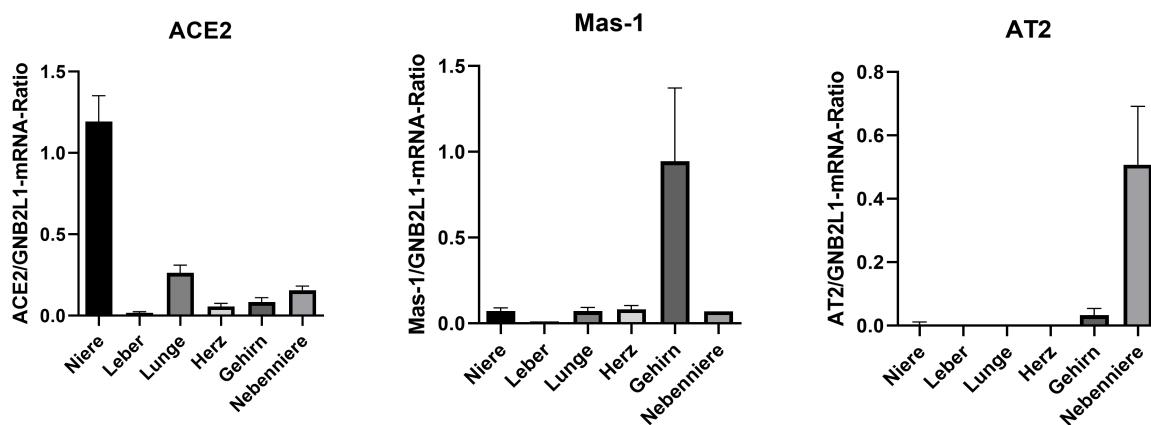


Abbildung 5: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organen der Maus.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; Niere: n=6, Nebenniere: n=4, andere Organe: n=7. Als Housekeeper-Gen diente GNB2L1.

ACE2-mRNA wies in der Niere die höchste Abundanz auf. Auf ca. 30% bzw. 15% dieses Niveaus bewegten sich die mittleren mRNA-Level in Lungen- bzw. Nebennierengewebe. In Herz und Gehirn betrug die ACE2/GNB2L1-Ratio im Schnitt etwa 5% des renalen Messwerts. Die geringste Gentranskription zeigte sich in der Leber (ca. 1%).

Die höchsten Mas-1-mRNA-Level imponierten im Gehirn. In Niere, Lunge, Herz und Nebenniere zeigte sich der Rezeptor ähnlich niedrig abundant mit etwa 7-8% der gemessenen Mas-1/GNB2L1-Ratio im Gehirn. In der Leber war kaum Mas-mRNA nachweisbar (ca. 1% des Mittelwerts des Gehirns).

Die einzige nennenswerte AT2-Rezeptor-mRNA-Level konnten in Nebenniere und Gehirn detektiert werden. Die mittlere AT2-GNB2L1-mRNA-Ratio betrug im Nebennierengewebe dabei etwa das 15-fache des Werts im Gehirn.

3.1.2 Kanonisches RAAS

Im Rahmen der quantitativen mRNA-Analyse des kanonischen RAAS wurden das Schlüsselenzym ACE, sowie die beiden Isoformen des Ang II-Rezeptors Subtyp 1 AT1a und AT1b untersucht.

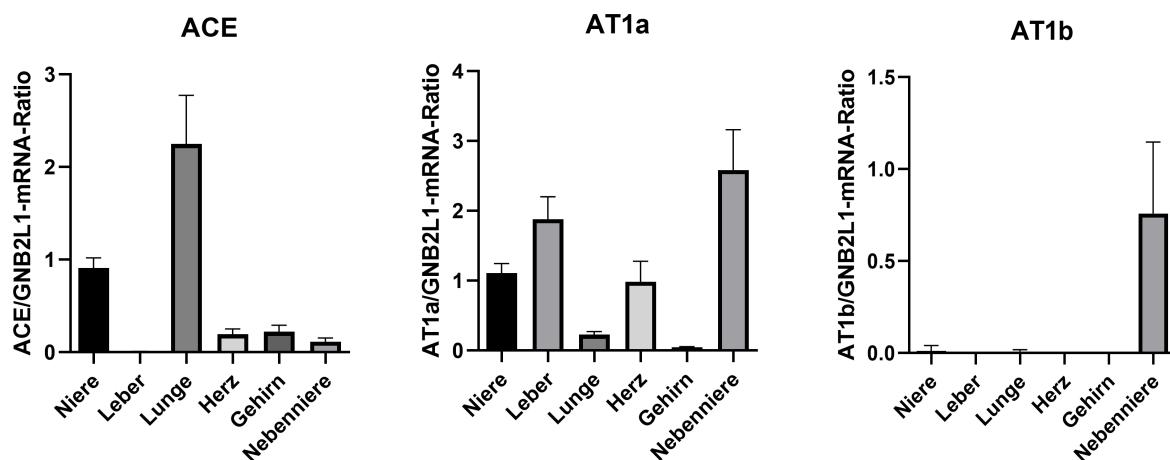


Abbildung 6: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des kanonischen RAAS in diversen Organen der Maus.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; Niere: n=6, Nebenniere: n=4, andere Organe: n=7. Als Housekeeper-Gen diente GNB2L1.

ACE-mRNA wies in der Lunge die höchste Abundanz auf (~248% des renalen Mittelwerts), mit größerem Abstand gefolgt von der Niere. Auf ähnlich niedrigem Niveau bewegten sich mRNA-Level in Herz (~21%) und Gehirn (~24%). Während die Gentranskription in der Nebenniere mit ca. 12% der mittleren renalen ACE/GNB2L1-Ratio noch geringer ausfiel, war sie in der Leber kaum messbar (<1%).

Die höchsten AT1a-Rezeptor-mRNA-Level zeigten sich in der Nebenniere (~233%), gefolgt von Leber (~170%), Niere und Herz (~89%), jeweils in Bezug auf die mittlere renale AT1a/GNB2L1-Ratio. Das untersuchte Lungengewebe wies die zweitgeringste Abundanz auf (~21%). Im Gehirn war kaum AT1a-mRNA nachweisbar (~4%).

AT1b-Rezeptor-mRNA wies lediglich die Nebenniere in nennenswerten Umfang auf.

3.2 Proteinexpression des ACE2 in diversen murinen Organen

Um zu eruieren, ob sich die gemessene mRNA-Verteilung des ACE2 über die verschiedenen Gewebe auch auf Proteinebene widerspiegelt, fand eine semiquantitative Analyse mittels Western Blot statt. Als indirekt antagonistisches Enzym des kanonischen RAAS wurde ACE zum Vergleich untersucht.

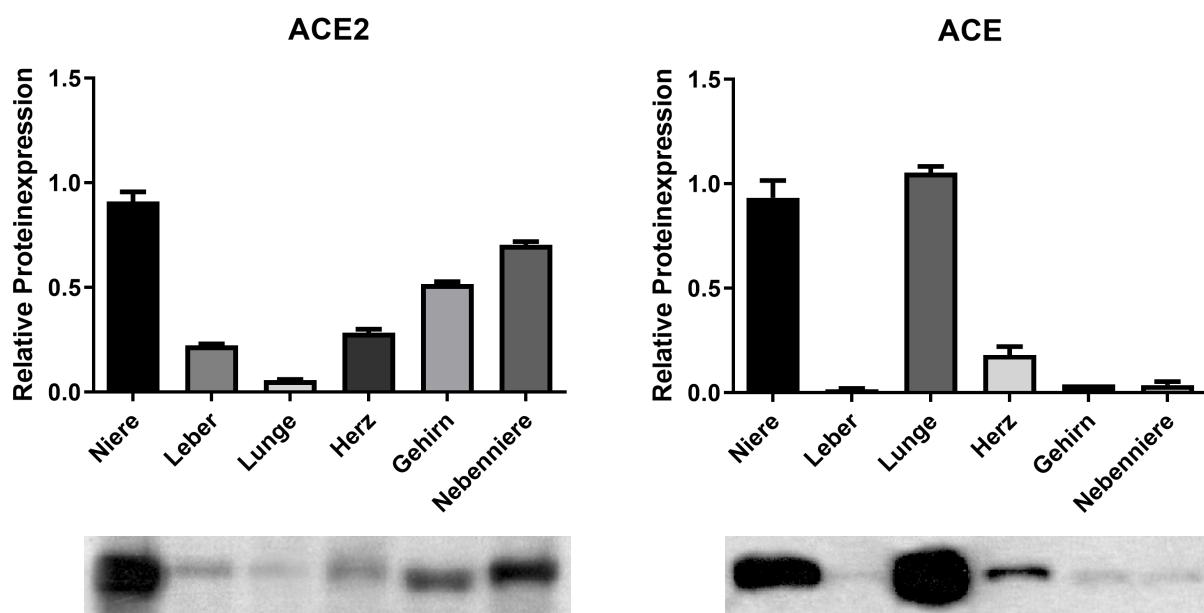


Abbildung 7: Proteinexpression der Enzyme ACE2 und ACE in diversen Organen der Maus

Linke Abbildung: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen ACE2-Proteinexpression in Organen aus 3 Tieren und repräsentative Banden des zugehörigen Western Blots bei 97 kDa in Referenz zum Molekulargewichtsstandard.

Rechte Abbildung: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen ACE-Proteinexpression in Organen aus 3 Tieren und repräsentative Banden des zugehörigen Western Blots bei 195 kDa in Referenz zum Molekulargewichtsstandard.

ACE2

Die Quantifizierung der Proteinexpression in den untersuchten Organen erfolgte in Bezug auf die ermittelten renalen Messwerte. ACE2 wird am stärksten in der Niere exprimiert. Es folgen in absteigender Reihenfolge Nebenniere (~77%), Gehirn (~57%), Herz (~31%), Leber (~25%) und Lunge (~6%). Insgesamt zeigten sich deutliche Abweichungen im Vergleich zu den Messwerten aus der RT-qPCR. Zwar blieb die Niere Hauptexpressionsort des ACE2, allerdings mit geringerem Abstand zu den anderen Organen. Bemerkenswert ist des Weiteren der Unterschied zwischen den Ergebnissen auf mRNA- und Proteinebene im Lungengewebe. Imponierte die Lunge in der qPCR noch als Organ mit der zweithöchsten ACE2/GNB2L1-Ratio, zeigte sich dort im Western Blot die niedrigste Proteinexpression der untersuchten Gewebe.

ACE

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte auch hierbei in Bezug auf die ermittelten renalen Messwerte. Die ausgeprägteste ACE-Expression zeigte sich in Lunge (~113%) und Niere. Mit größerem Abstand folgten die untersuchten Herzen (~19%). Kaum Protein war in Leber (~2%), Nebenniere und Gehirn (je ~4%) nachzuweisen.

Die Proteinmesswerte aus dem Western Blot zeigten sich im Wesentlichen kongruent zu den mRNA-Daten aus der qPCR. Auch bei ACE fielen die Unterschiede auf Proteinebene zwischen den einzelnen Geweben, insbesondere bei Lunge und Niere, geringer aus. Außerdem konnte im Gehirn wesentlich weniger Protein detektiert werden, als die qPCR nahegelegt hatte.

3.3 Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen murinen Organen

Im Folgenden wurden drei wesentliche Komponenten des nicht-kanonischen RAAS mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung in ausgewählten Organen der Maus lokalisiert: Das Schlüsselenzym ACE2 und die Ang(1-7)-Rezeptoren Mas-1 und AT2. Parallel dazu wurde als indirekt antagonistisches Enzym der kanonischen Systemachse ACE betrachtet.

Um eine etwaige Kolokalisation von ACE2-mRNA mit Mas-1, AT2 oder ACE zu untersuchen, wurden die jeweiligen Sonden kohybridisiert. Zur genauen Identifikation bestimmter histologischer Strukturen dienten verschiedene zellspezifische Marker. Um zu eruieren, ob sich die Beobachtungen auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene reproduzieren lassen, wurde in der Immunfluoreszenzfärbung ACE2 wiederum zusammen mit ACE und diversen Markerproteinen visualisiert.

3.3.1 Herz

Als Myokardzellmarker in der FISH diente Connexin 43 (Cx43). Die Immunfluoreszenzfärbung des Herzgewebes war mit den beschriebenen Methoden nicht möglich.

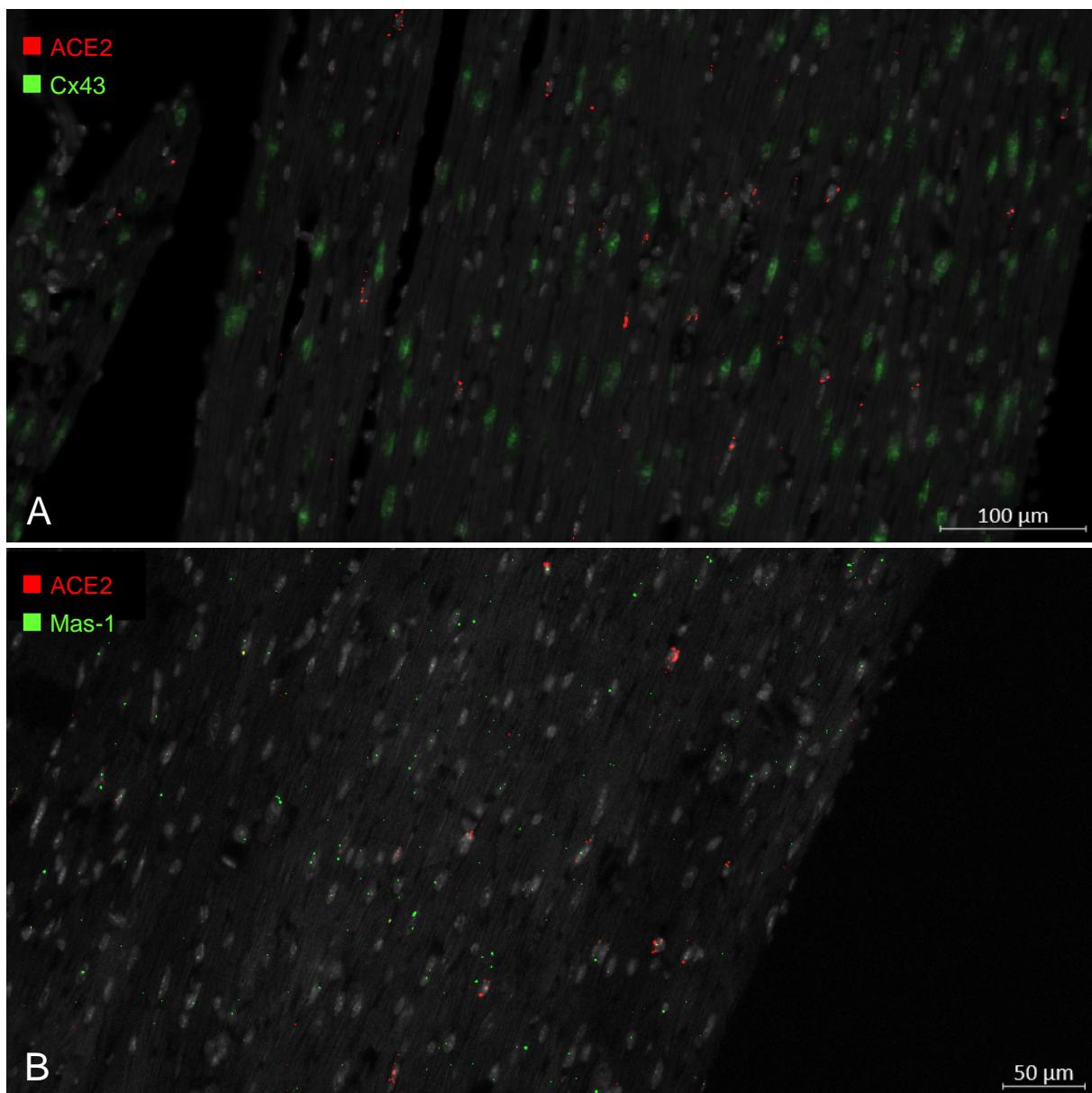


Abbildung 8: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit Cx43-mRNA (A) und Mas-1-mRNA (B) in murinem Herzgewebe.
Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht.

Es konnten nur wenige ACE2-Signale detektiert werden, die weder mit Connexin 43 noch mit Mas-1 eine Kolokalisation aufwiesen (Abb. 8). Aufgrund der Lage zwischen der Myokardzellen und der Zellmorphologie der ACE2-positiven Zellen, ist am ehesten

von interstitiellen Fibroblasten auszugehen (Abb. 9). Der korrespondierende Rezeptor Mas-1 zeigte eine ähnlich niedrige Abundanz, aber eine deutlich diffusere Verteilung im Gewebe.

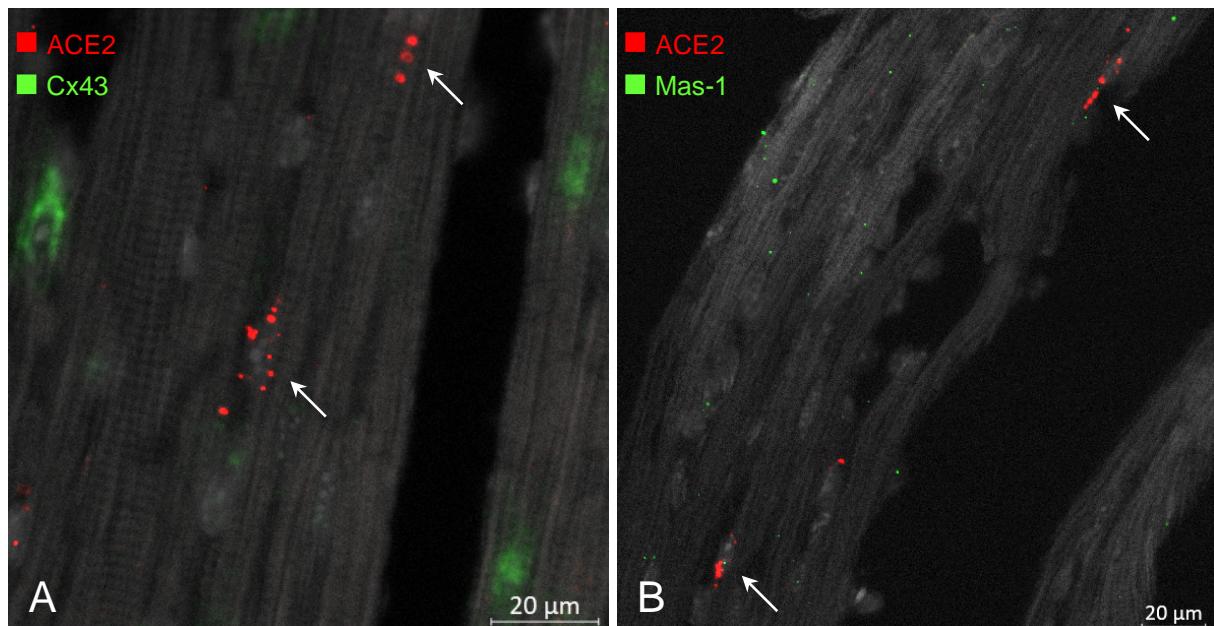


Abbildung 9: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit Cx43-mRNA (A) und Mas-1-mRNA (B) in murinem Herzgewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren ACE2-positive Zellen, die aufgrund ihrer länglichen Morphologie und ihrer interstitiellen Lage am ehesten als Fibroblasten zu identifizieren sind.

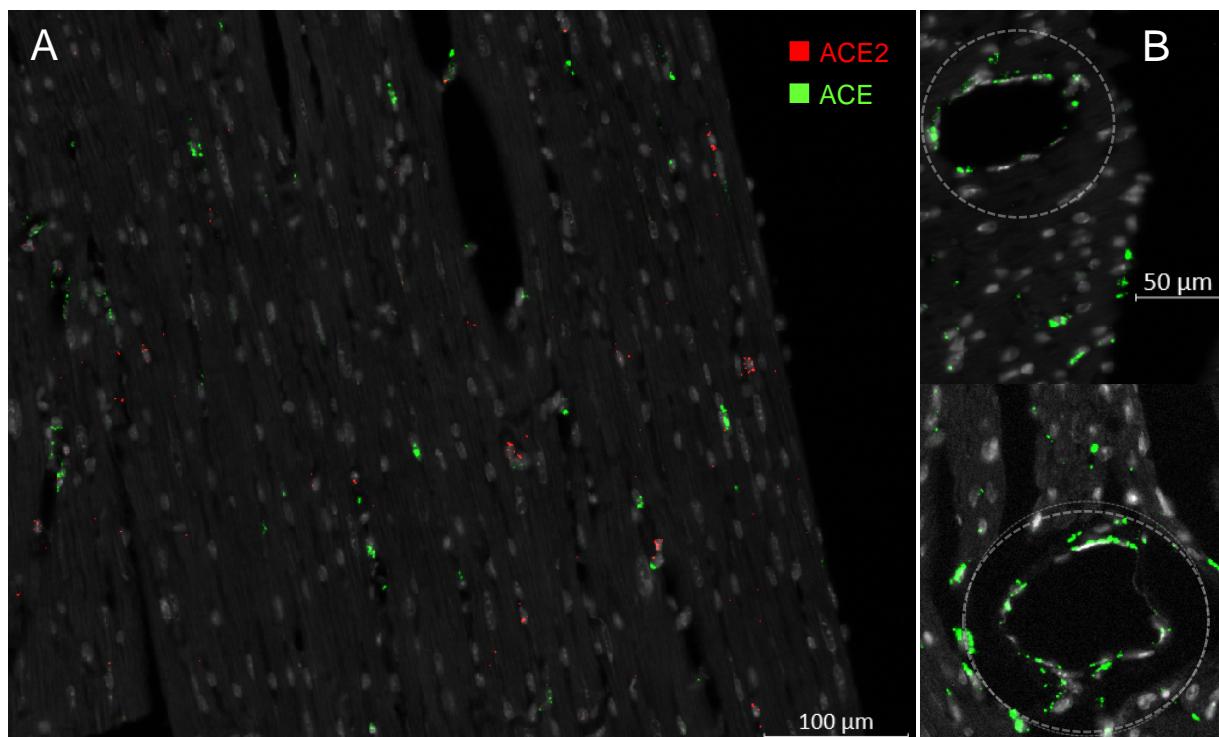


Abbildung 10: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit ACE-mRNA in murinem Herzgewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Kreise kennzeichnen kardiale Gefäße.

Die beiden untersuchten Enzyme zeigten keine zelluläre Kolokalisation. Insgesamt wies ACE-mRNA eine höhere Abundanz im Vergleich zu ACE2 auf (Abb. 10A). Außerdem konnte das Endothel der kardialen Gefäße als Transkriptionsort von ACE identifiziert werden (Abb. 10B).

Wie bereits die Daten aus der qPCR nahelegten hatten, waren keine nennenswerten AT2-mRNA-Signale detektierbar.

3.3.2 Lunge

Auch in der Lunge sollte die Expression von ACE2 zusammen mit den beiden korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 sowie seinem kanonischen Analogon ACE mittels FISH und IF untersucht werden. Als Marker für die glatte Muskulatur in Atemwegen und Gefäßen diente Alpha smooth muscle actin (asma).

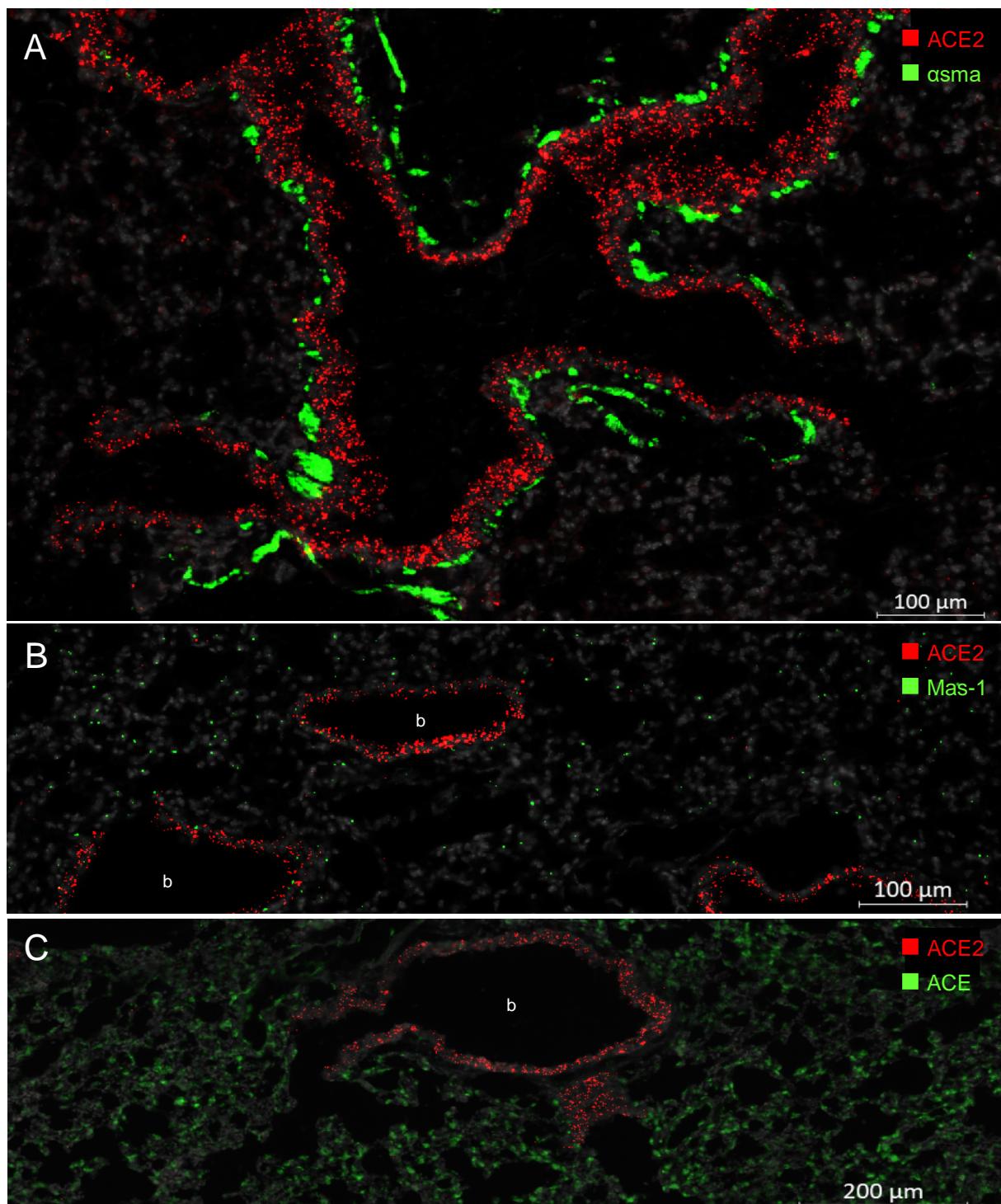


Abbildung 11: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit α sma (A), Mas-1 (B) und ACE (C) in murinem Lungengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. A zeigt einen sich verzweigenden Bronchialast, In B und C finden sich vom Lungenparenchym umgebene Bronchien (b).

ACE2-mRNA konnte pulmonal nur im respiratorischen Bronchialepithel detektiert werden (Abb. 11A-C). Als Protein wird ACE2 am apikalen Zellpol exprimiert (Abb. 12). Der Mas-Rezeptor zeigte eine relativ homogene Verteilung niedriger Abundanz über

das gesamte Lungengewebe und eine Kolokalisation mit ACE2 in den Atemwegen (Abb. 11B). ACE trat neben den Pneumozyten auch im Endothel pulmonaler Gefäße in Erscheinung, wobei es nie mit ACE2 kolokalisierte (Abb. 11C, 12). Des Weiteren waren keine nennenswerten AT2-mRNA-Signale detektierbar.

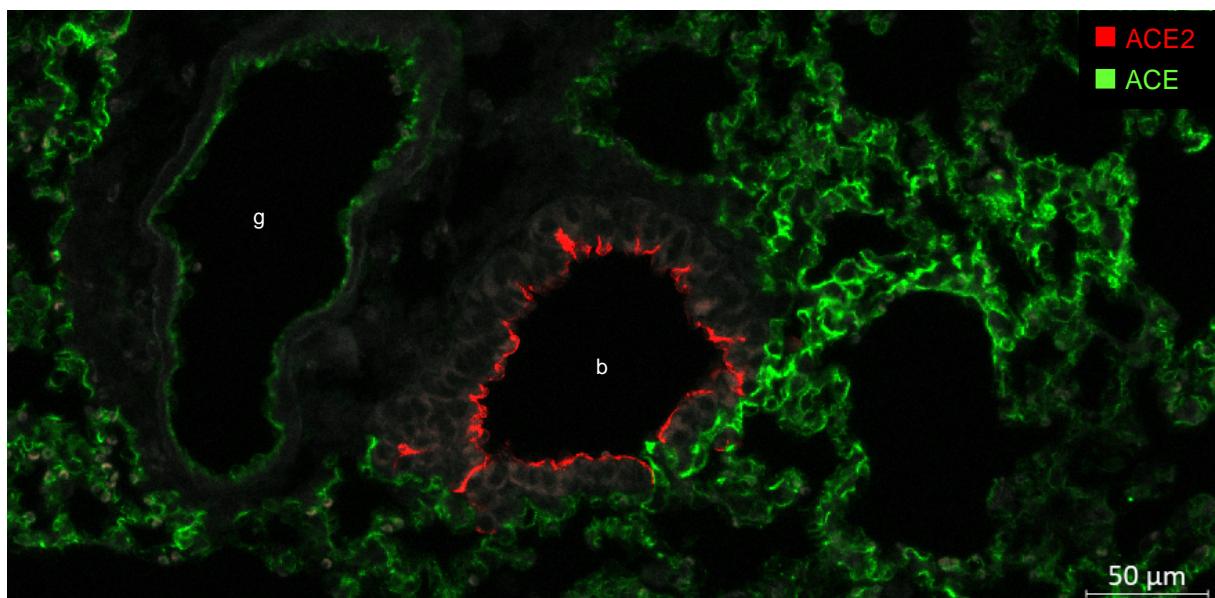


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lungengewebe.
Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt einen Querschnitt eines vom Lungenparenchym umgebenen Bronchus (b), der sich in direkter Nachbarschaft zu einem pulmonalen Gefäß (g) befindet.

3.3.3 Leber

In der Leber konnten trotz niedriger mRNA-Level in der Messung per qPCR sowohl ACE2 als auch ACE nachgewiesen werden. Zur exakten Lokalisation des ACE2 in der Leber kam PDGFR β als Markerprotein für Fibroblasten und fibroblastoide hepatische Sternzellen zum Einsatz (123).

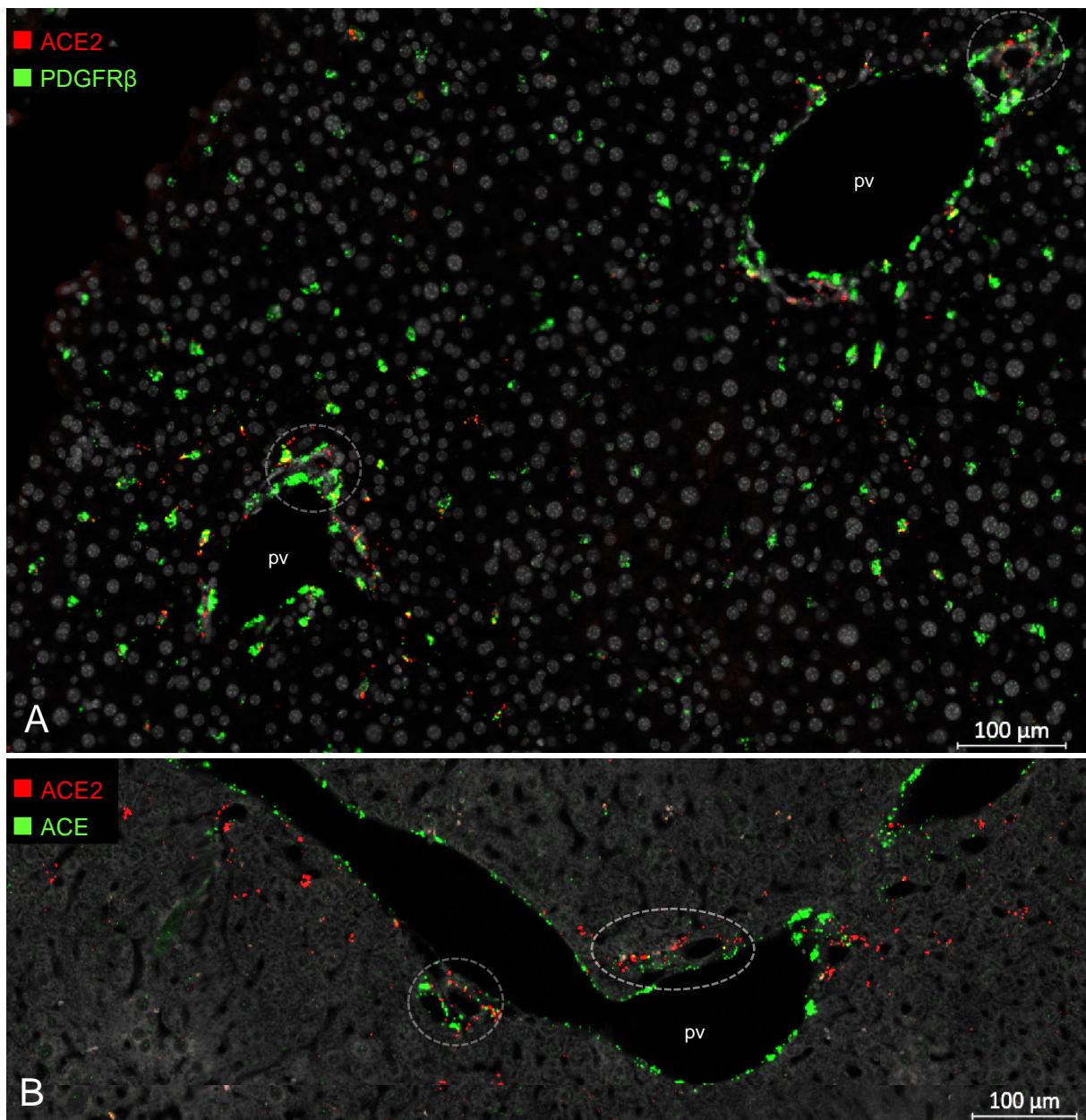


Abbildung 13: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (A) von ACE2 mit PDGFR β (A) und ACE (B) in murinem Lebergewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Beide Abbildungen zeigen Portalvenenäste (pv) in umliegendem Leberparenchym. Die Kreise kennzeichnen Gallengänge.

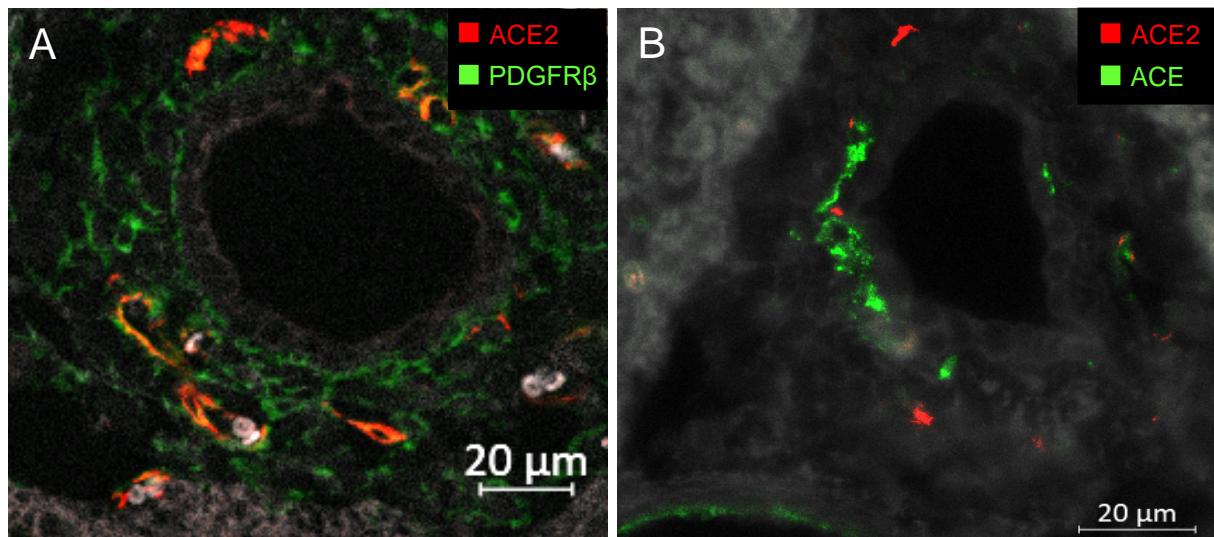


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 mit PDGFR β (A) und ACE (B) in murinem Lebergewebe.

Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Abbildungen zeigen Gallengänge mit kubischem Gallengangsepithel.

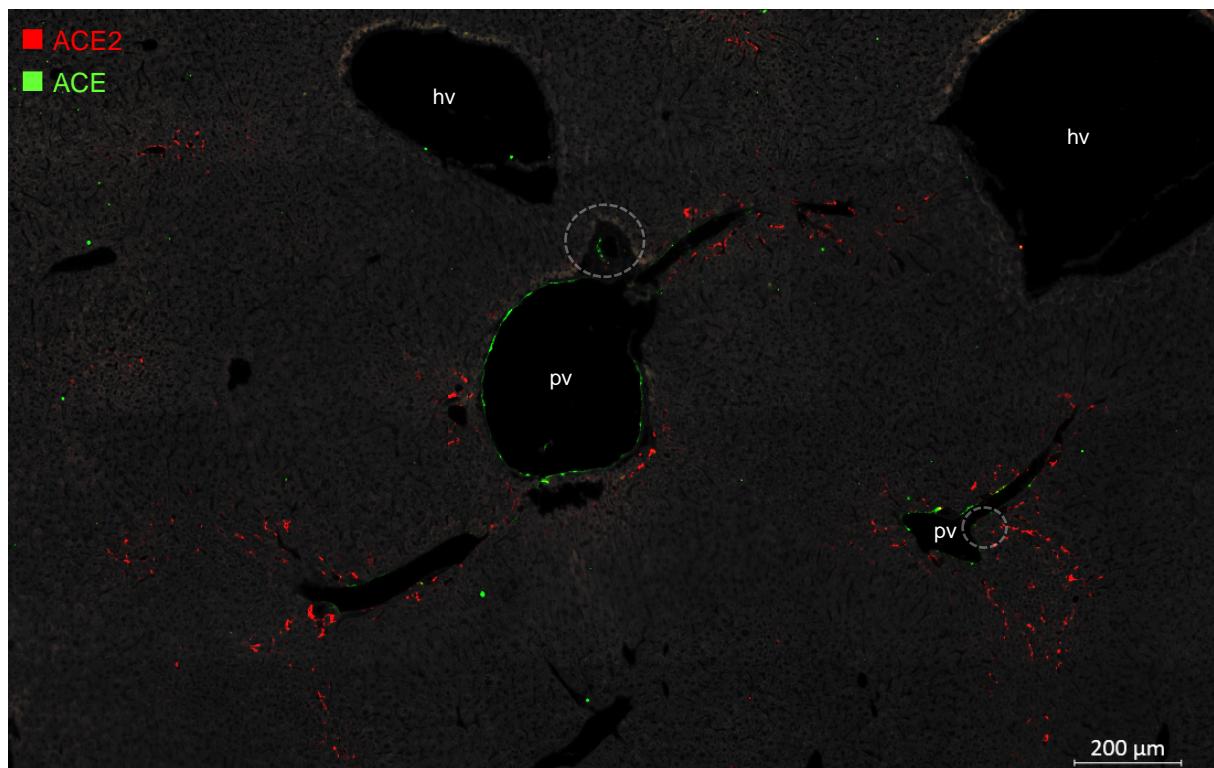


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lebergewebe.

Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt portalvenöse Gefäße (pv) und Lebervenenäste (hv) in umliegendem Leberparenchym. Die Kreise kennzeichnen Gallengänge.

ACE2 kolokalisierte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit PDGFR β in Sternzellen des Disse-Raums im Ursprungsbereich der Lebersinusoiden aus angrenzenden Portalvenen (Abb. 13A, 16A). Außerdem konnte ACE2 zusammen mit PDGFR β im, die Gallenwege umgebenden Bindegewebe nachgewiesen werden (Abb. 14A). Mit ACE zeigte es dort eine teilweise Kolokalisation (Abb. 14B). Hauptexpressionsort des ACE war jedoch das Endothel des portalvenösen Systems (Abb. 13B, 16B). Die Äste der Lebervenen waren weder mit dem Auftreten von ACE2 noch von ACE assoziiert (Abb. 15). Abb. 16B zeigt den Übergang eines Portalvenenasts in einen Sinusoid. Nach distal nimmt die endotheliale Expression von ACE ab, während im sich entwickelnden subendothelialen Disse-Raum bereits ACE2 exprimiert wird (Pfeil).

Die beiden Ang(1-7)-Rezeptoren Mas-1 und AT2 lieferten in der FISH keine nennenswerten mRNA-Signale.

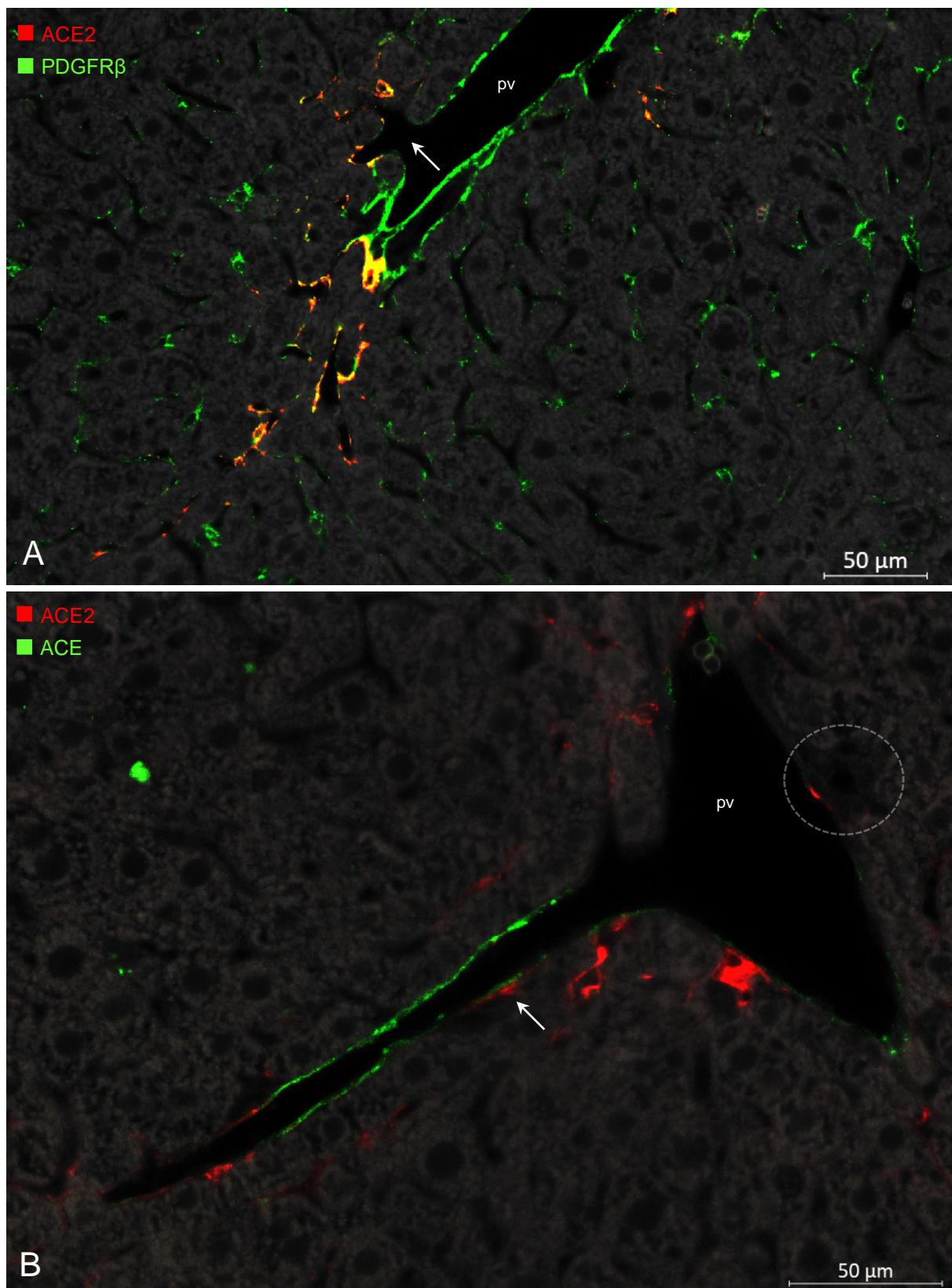


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lebergewebe.
Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Beide Abbildungen zeigen Portalvenenäste (pv) in umliegendem Leberparenchym. A zeigt einen Abgang eines Lebersinusoids aus dem portalvenösen Gefäß (Pfeil). In B ist die Verzweigung eines Portalvenenastes in Lebersinusoide erkennbar. Die Kreise kennzeichnen Gallengänge.

3.3.4 Nebenniere

In der Nebenniere konnte als einziges untersuchtes Organ sowohl ACE2 als auch die korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 nachgewiesen werden. Zur genaueren Lokalisation wurde PDGFR β als Fibroblastenmarkerprotein eingesetzt.

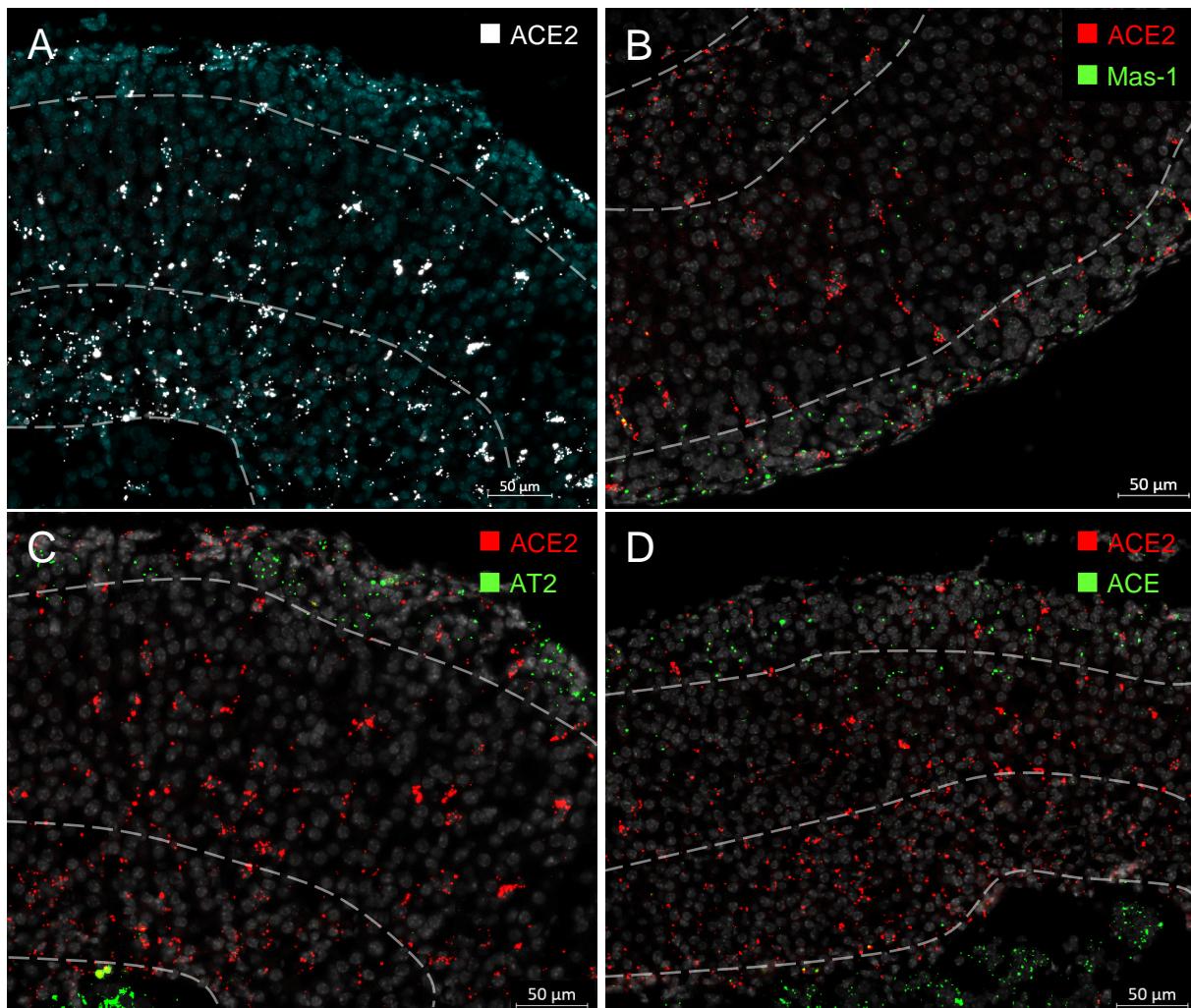


Abbildung 17: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 (A) mit Mas-1 (B), AT2 (C) und ACE (D) in murinem Nebennierengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt, Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Nebennierenrinde. Die Linien kennzeichnen die ungefähren Grenzen der drei Bereiche der Nebennierenrinde (von außen nach innen: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis) und des Nebennierenmarks.

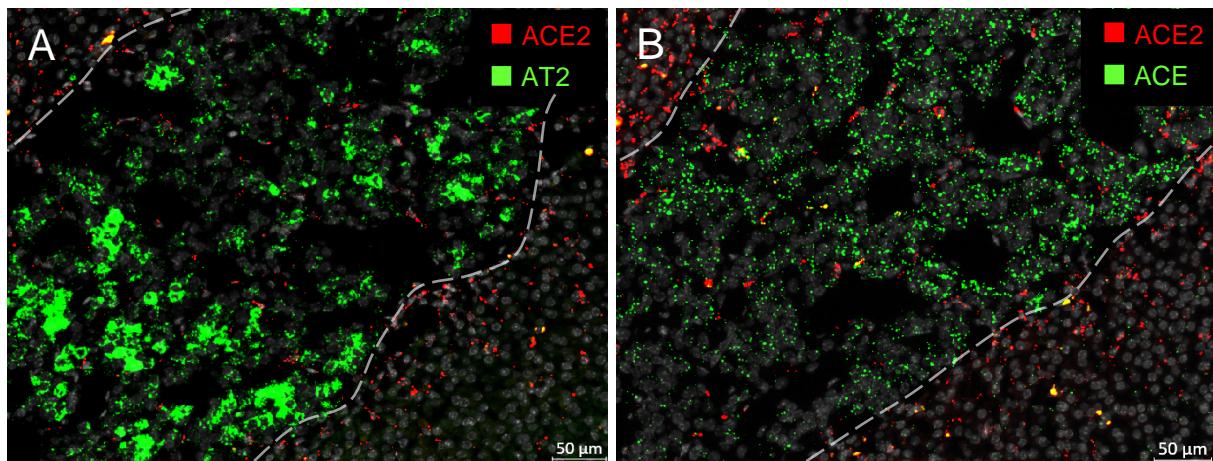


Abbildung 18: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit AT2 (A) und ACE (B) in murinem Nebennierengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte des Nebennierenmarks. Die Linien kennzeichnen die Grenze zum Kortex.

ACE2 zeigte sich im gesamten Nebenniereninterstitium exprimiert, wobei die Expression in den Zonae fasciculatae und reticulares am ausgeprägtesten erschien. Kortikal war es in PDGFR β -positiven Strukturen nachzuweisen, die am ehesten (Myo-)Fibroblasten des perisinusoidalen Bindegewebes entsprechen. Im Nebennierenmark trat es zwischen den in Gruppen angeordneten neuroendokrinen Zellen auf (Abb. 17-19).

Mas-Rezeptor-mRNA konnte lediglich in der Zona glomerulosa in nennenswerter Menge detektiert werden (Abb. 17B). Dort fand sich ebenfalls der AT2-Rezeptor wieder, der zusätzlich medullär in hoher Abundanz vorhanden war (Abb. 17C, 18A).

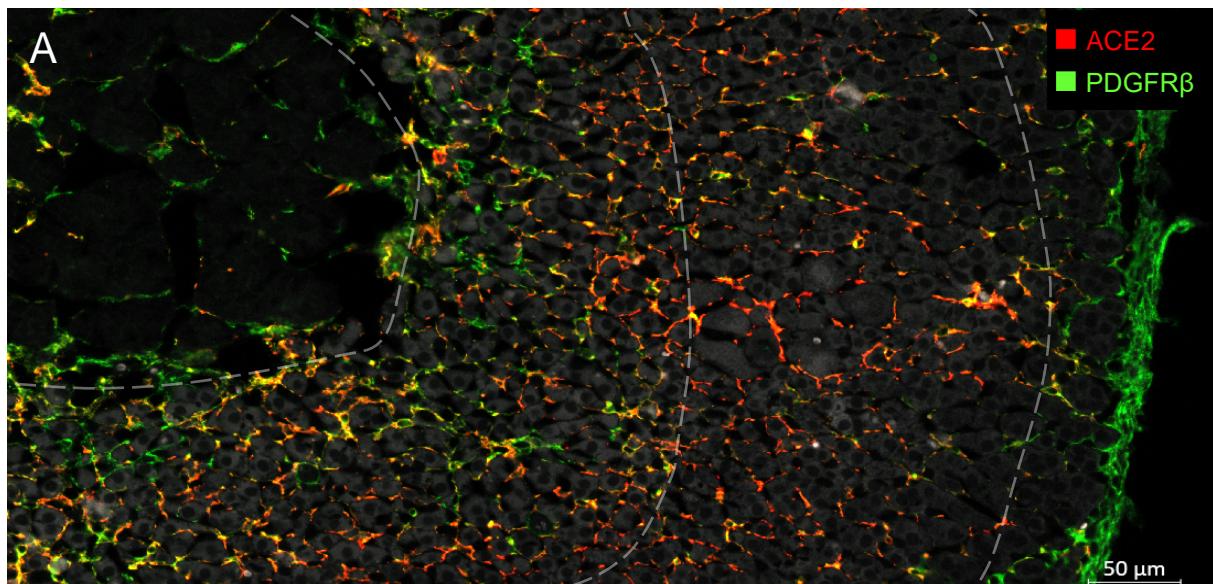


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und PDGFR β in murinem Nebennierengewebe.

Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Linien kennzeichnen die ungefähren Grenzen der drei Bereiche der Nebennierenrinde (von außen nach innen: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis) und des Nebennierenmarks.

ACE-mRNA konnte in der Zona glomerulosa und im Nebennierenmark nachgewiesen werden (Abb. 17D, 18B). Auf Proteinebene war ACE vereinzelt allenfalls schwach exprimiert (Abb. 20). Sowohl die beiden Ang(1-7)-Rezeptoren als auch ACE zeigten keine Kolokalisation mit ACE2.

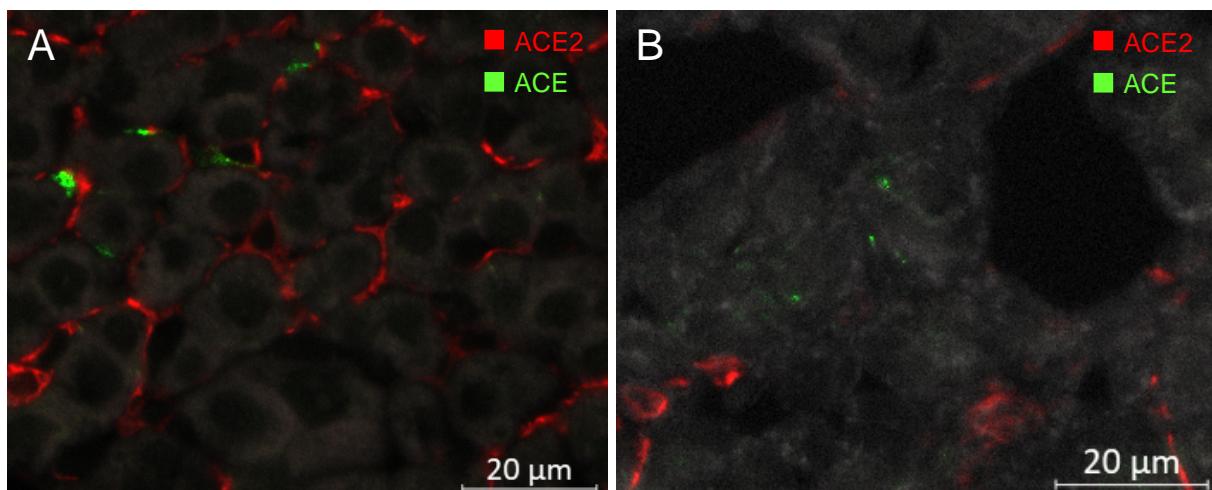


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Nebennierengewebe. Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. A zeigt einen Ausschnitt der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, B einen Ausschnitt aus dem Nebennierenmark.

3.3.5 Niere

Im Haupttranskriptions- und Expressionsorgan von ACE2 (Abb. 5 und 6) wurden die Komponenten des nicht-kanonischen RAAS sowie ACE besonders genau hinsichtlich deren Lokalisation untersucht. Im Rahmen dessen kamen folgende zelluläre Markerproteine zum Einsatz:

Markerprotein	Zielstruktur	Markerprotein	Zielstruktur
Connexin 26 (Cx26)	Proximaler Tubulus	Nephrin	Podozyten
Megalin	Proximaler Tubulus	PDGFR β	Fibroblasten, Mesangialzellen
Calbindin	Distaler Tubulus	α sma	Glatte Muskulatur
Aquaporin 2	Sammelrohr	CD 31	Endothel

3.3.5.1 ACE2

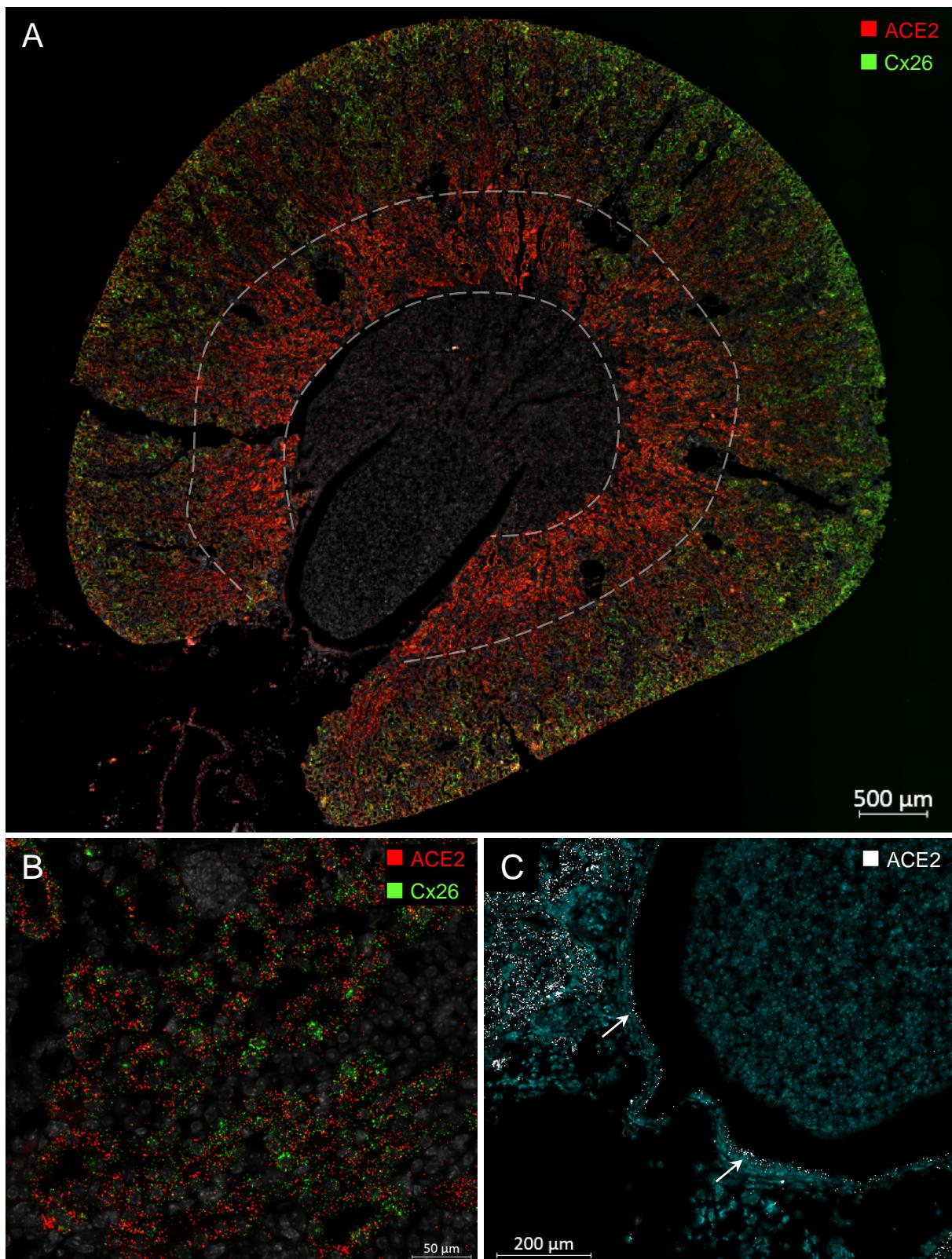


Abbildung 21: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit Cx26 (A, B) in murinem Nierengewebe.

Zellkerne sind grau bzw. türkis dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen Ausschnitt des Cortex. In C ist die Papille mit angrenzendem Nierenbecken und ACE2-exprimierendem Urothel (Pfeile) abgebildet.

ACE2-mRNA-Signale konnten in der FISH zusammen mit Cx26-mRNA im gesamten proximalen Tubulus detektiert werden (Abb. 21A, B). Im Außenstreifen des äußeren Marks, entsprechend den Partes rectae der Tubuli, wiesen die Zellen eine erhöhte Abundanz auf. Dazu kongruent zeigten sich die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzfärbung. Das Enzym ließ sich auf Proteinebene im luminalen Bürstensaum der proximalen Tubuli nachweisen (Abb. 22).

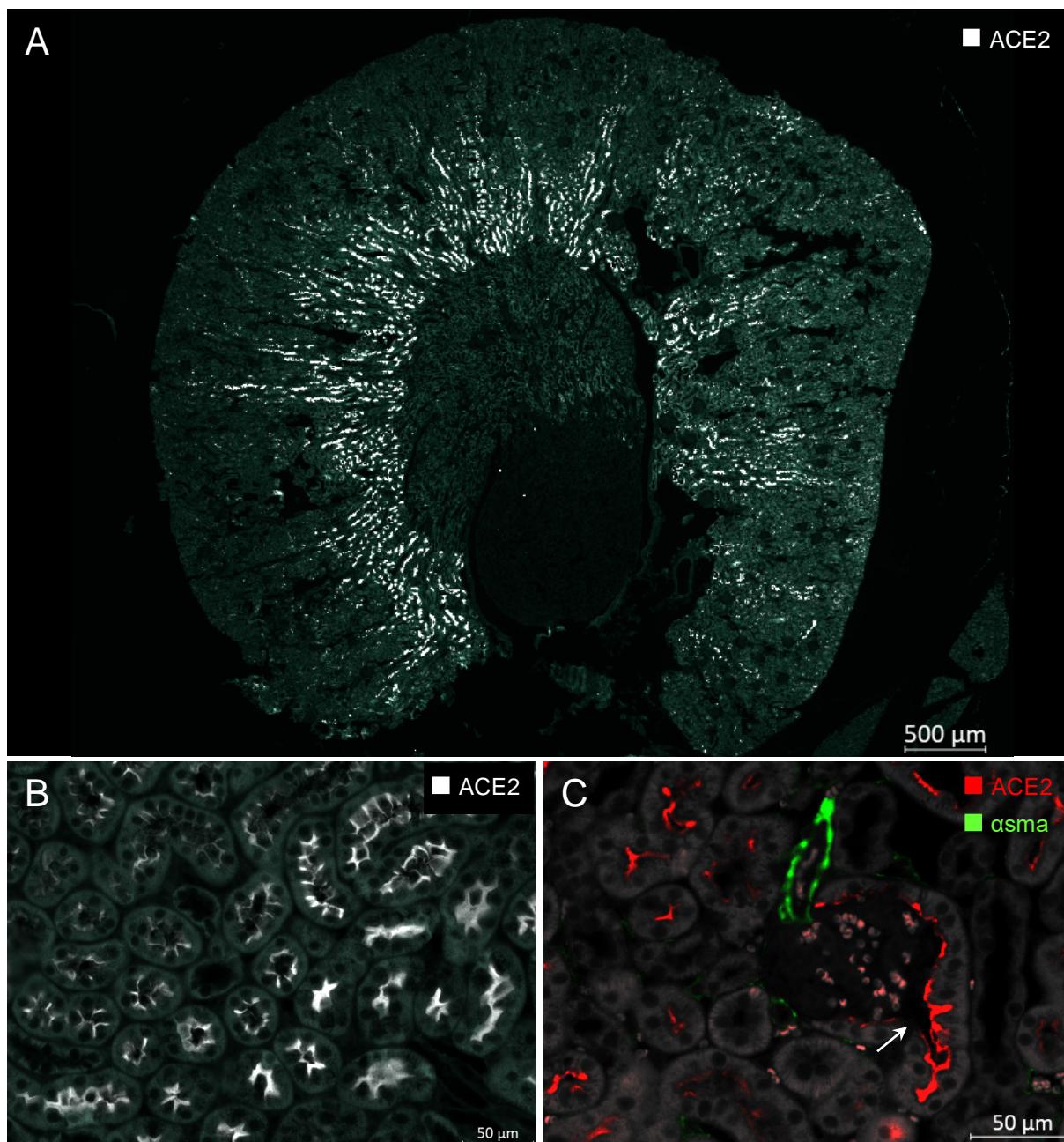


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 (A,B) mit αsma (C) in murinem Nierengewebe.

Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B eine Detailaufnahme proximaler Tubuli. In C ist ein Glomerulus mit Ateriole (grün), Bowman-Kapsel und Harnpol mit Abgang des proximalen Tubulus erkennbar (Pfeil).

Auffällig war in den Übersichtsaufnahmen eine radiär verlaufende Streifung mit ACE2-reichen Bereichen. Als weitere Transkriptionsorte konnten das parietale Blatt der Bowman-Kapsel und das Urothel identifiziert werden (Abb. 21C, 22C).

Mit den anderen erwähnten Zellmarkern konnte keine Kolokalisation beobachtet werden.

3.3.5.2 Mas-1

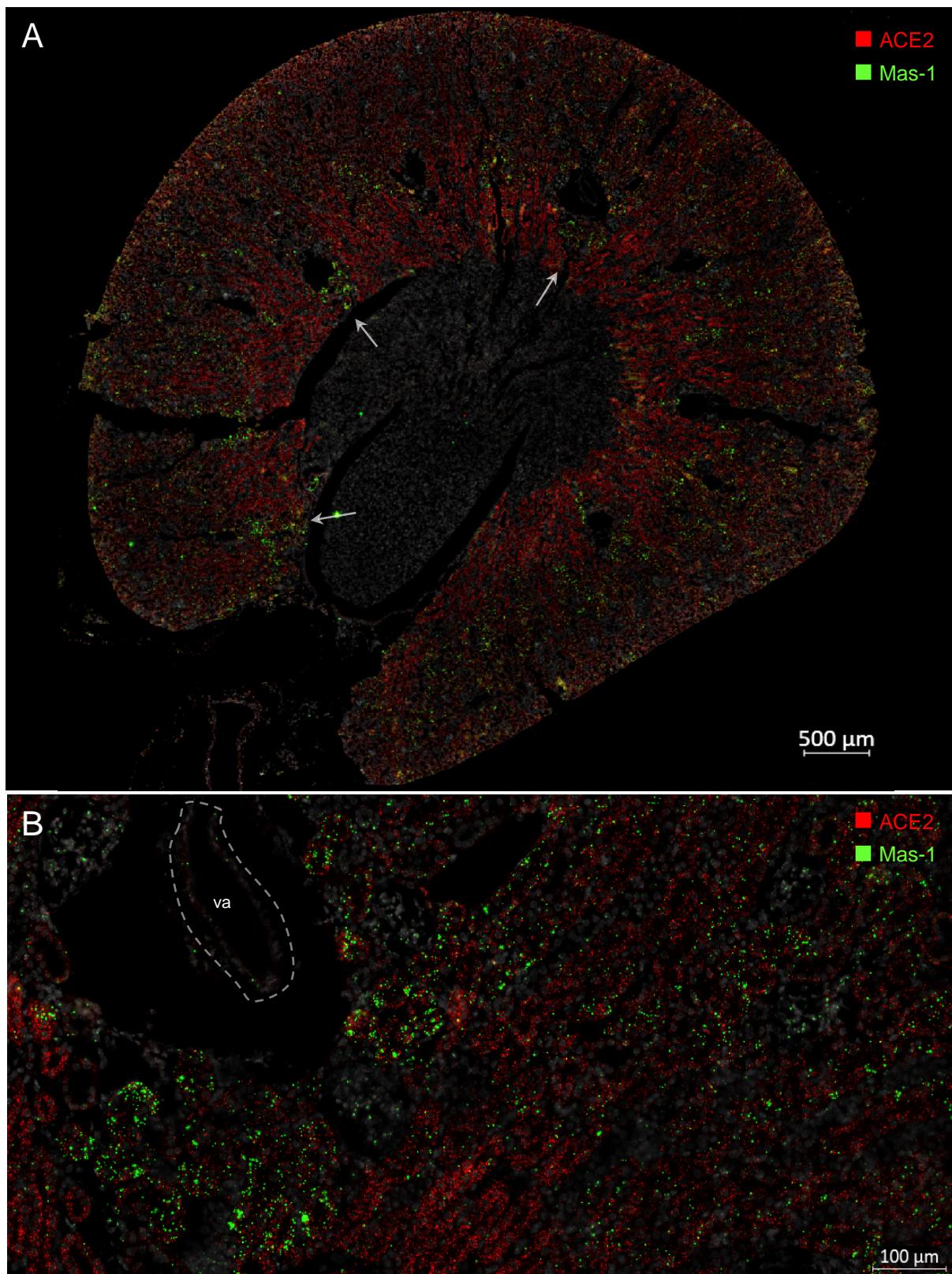


Abbildung 23: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Mas-1-mRNA mit ACE2-mRNA in murinem Nierengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen Nierenausschnitt um ein Vas arcuatum (va).

Mas-Rezeptor-mRNA kolokalisierte mit ACE2 in den proximalen Tubuli (pT). Dabei zeigten sich einzelne Mas-reiche pT-Cluster in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft der arcuaten Gefäße (Pfeile). In den ACE2-reichen S3-Segmenten war die Mas-mRNA-Abundanz im Vergleich zu den anderen Bereichen des proximalen Tubulus reduziert (Abb. 23). Außerdem konnte Mas-1 in der glatten Muskulatur größerer renaler Gefäße (Abb. 24A) und in Mesangialzellen (Abb. 24B) nachgewiesen werden. Die FISH des anderen untersuchten Ang(1-7)-Rezeptor AT2 ergab keine nennenswerten detektierbaren Signale.

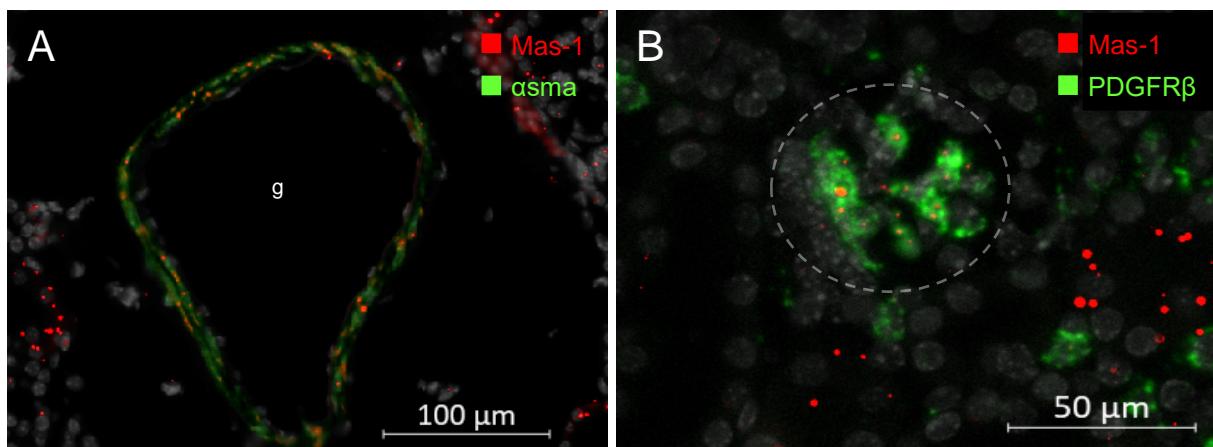


Abbildung 24: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Mas-1-mRNA mit α sma (A) und PDGFR β (B) in murinem Nierengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt ein renales Gefäß, B einen Glomerulus (Kreis).

3.3.5.3 ACE

Aufgrund des empfindlichen Gleichgewichts zwischen den beiden Achsen des RAAS und dessen Assoziation mit verschiedenen renalen Erkrankungen, wurde im Folgenden versucht, die intrarenale Verteilung der beiden Schlüsselenzyme ACE2 und ACE genauer zu untersuchen.

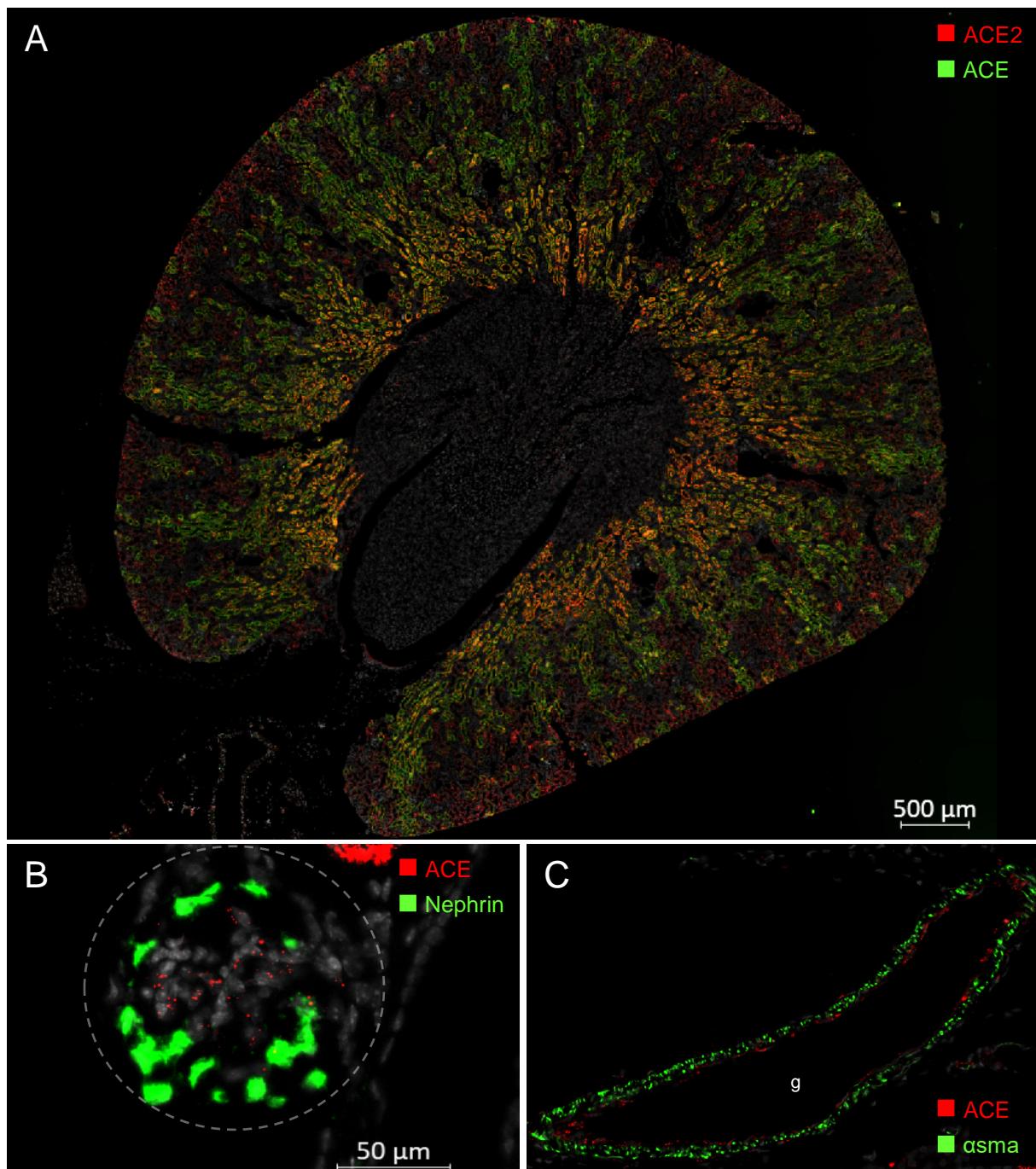


Abbildung 25: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE mit ACE2 (A), Nephrin (B) und α sma (C) in murinem Nierengewebe.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme. In B ist ein Glomerulus (Kreis), in C ein renales Gefäß (g) abgebildet.

ACE kolokalisiert sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit ACE2 im proximalen Tubulus (Abb. 25, 26). Dort tritt es im apikalen Bürstensaum in Erscheinung (Abb. 26). Wiederum imponiert eine gesteigerte Expression im S3-Segment. Gleichzeitig gibt es Bereiche im proximalen Tubulus, in denen ACE weder transkribiert noch exprimiert wird. In der Übersicht wird dies in Form einer ausgeprägten radiären Streifung deutlich, wobei Areale mit und ohne ACE alternieren. Außerdem konnte das Enzym im Endothel renaler Gefäße (Abb. 25 C) und in Nephrin-negativen Zellen der Glomeruli nachgewiesen werden, die am ehesten als kapilläres Endothel zu identifizieren sind⁽¹²⁴⁾ (Abb. 25 B).

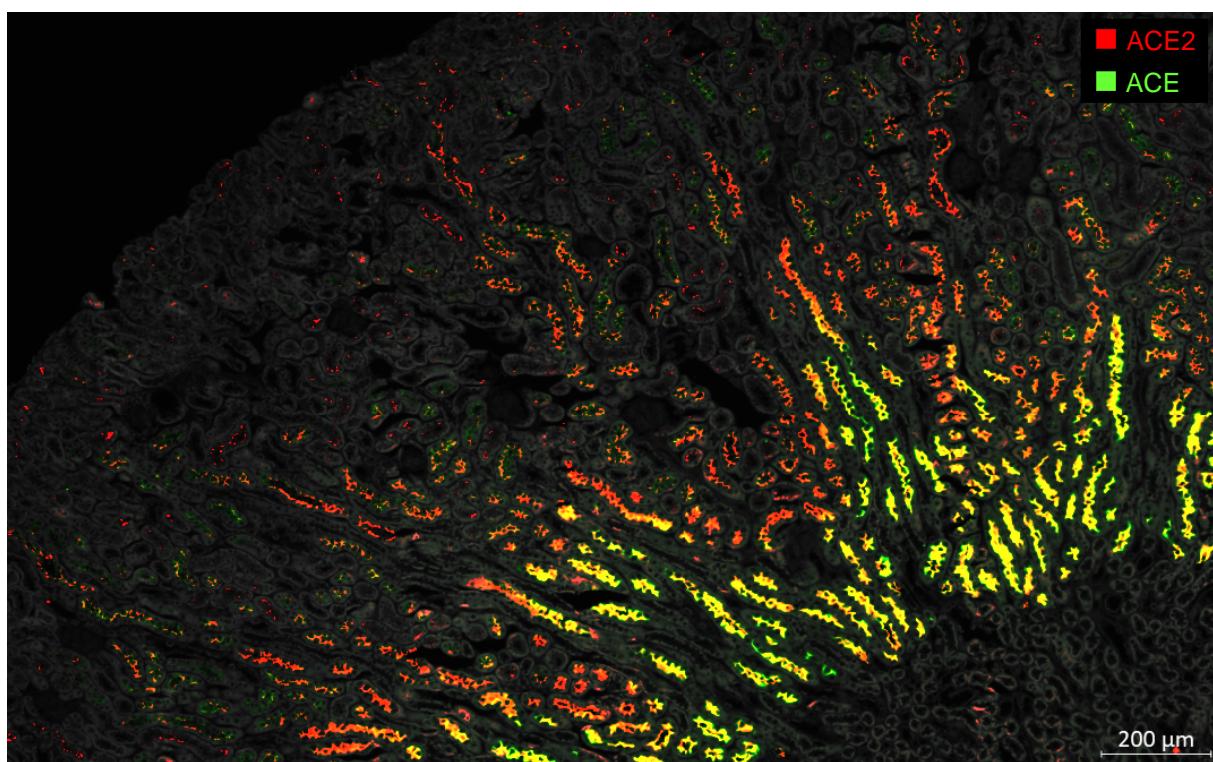


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von ACE und ACE2 in murinem Nierengewebe.
Zellstrukturen wurden mittels des Cy2-Filters sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Übersichtsaufnahme.

3.4 Einfluss renaler Schädigungsmodelle auf die Komponenten des nicht-kanonischen RAAS-Systems

Beide Systemachsen scheinen an der Genese und Progression verschiedener degenerativer Nierenerkrankungen maßgeblich beteiligt zu sein. Um die funktionelle Bedeutung des nicht-kanonischen RAAS bei renalem Schaden genauer zu eruieren, wurden neben den basalen Wildtypnieren auch Organe aus Tieren mit Adenin-induzierter Nephropathie und unilateraler Ureterobstruktion (UUO) untersucht. Zum Vergleich wurden wiederum Enzyme und Rezeptoren der kanonischen Systemsachse herangezogen.

3.4.1 Quantitative mRNA-Analyse

Folgende Diagramme basieren auf Daten der RT-qPCR verschiedener Komponenten des RAAS in basalen, Adenin- und UUO-Nieren der Maus.

3.4.1.1 Nicht-kanonisches RAAS

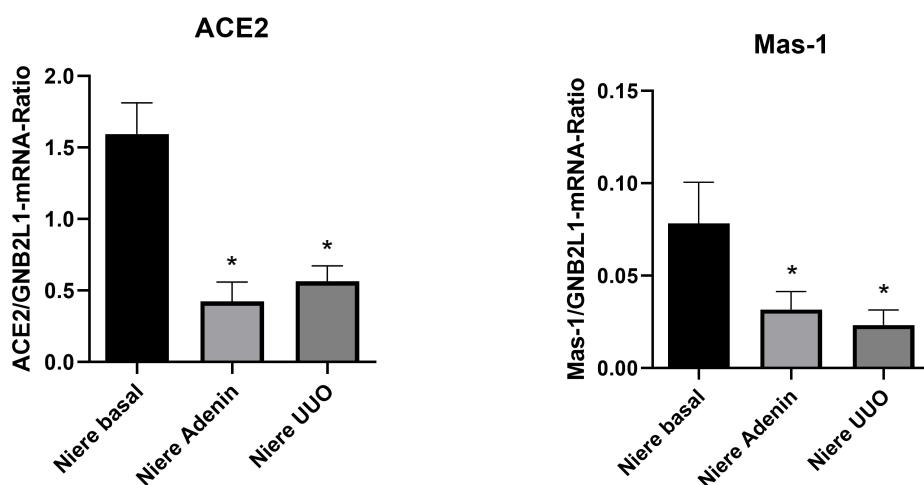


Abbildung 27: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in basalen, Adenin- und UUO-Nieren der Maus.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; Niere basal: n=6, Niere Adenin/UUO n=7. * p<0,05.

Sowohl die ACE2-mRNA- als auch die Mas-1-mRNA-Abundanz war in den untersuchten Nieren aus renalen Schädigungsmodellen um etwa 70% bzw. 65% reduziert. Zwischen den Adenin- und UUO-Tieren zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz. Die AT2-mRNA-Level lagen unterhalb der Detektionsgrenze.

3.4.1.2 Kanonisches RAAS

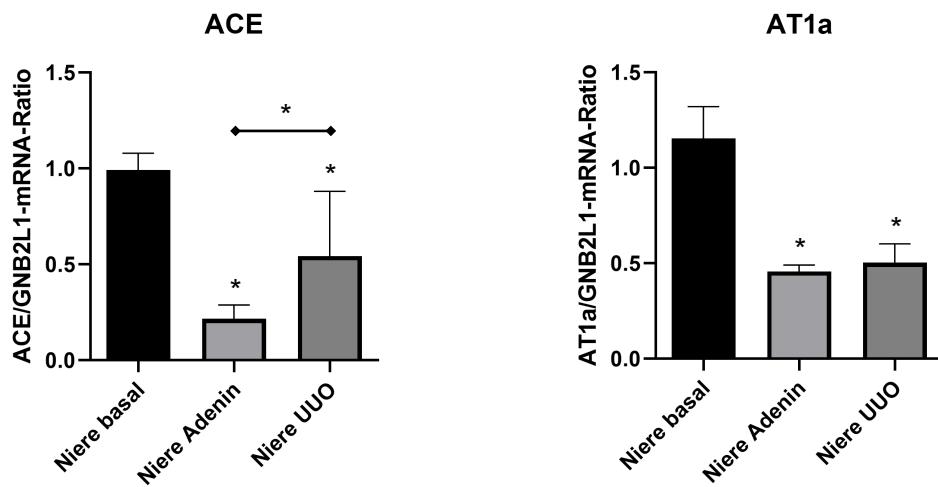


Abbildung 28: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des kanonischen RAAS in basalen, Adenin- und UUO-Nieren der Maus.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in Nieren aus 6 (basal) bzw. 7 (Adenin, UUO) Tieren. * p<0,05.

Bei ACE und AT1a konnte ebenfalls eine reduzierte Abundanz im renalen Schädigungsmodell beobachtet werden. Die Differenz zwischen den Adenin- (~22% des basalen Mittelwerts) und UUO-Tieren (~55% des basalen Mittelwerts) war lediglich beim untersuchten Enzym statistisch signifikant. Die AT1a-mRNA-Level in den geschädigten Nieren bewegten sich auf etwa 40% des basalen Niveaus. Der AT1b-mRNA-Gehalt der untersuchten Organe lag unterhalb der Detektionsgrenze.

3.4.2 Lokalisation wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in renalen Schädigungsmodellen

Mit Hilfe der FISH wurden die Nieren aus Adenin- und UUO-Tieren in gleicher Weise wie die basalen Organe hinsichtlich der Lokalisation der beiden Enzyme ACE2 und ACE und der beiden Ang(1-7)-Rezeptoren Mas-1 und AT2 untersucht.

3.4.2.1 Adenin-induzierte Nephropathie

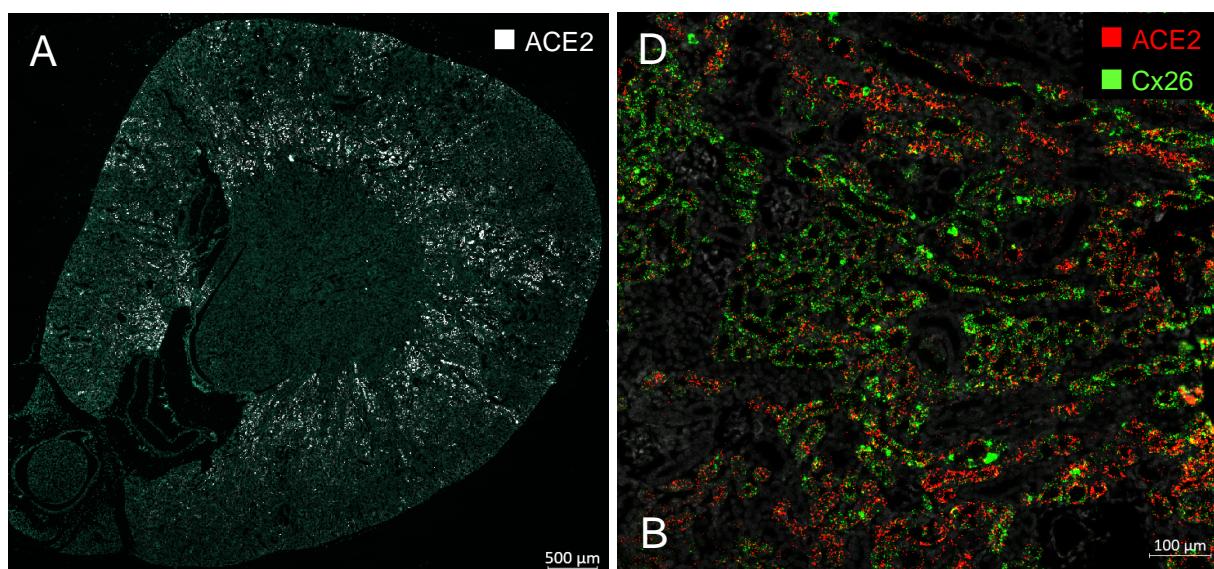


Abbildung 29: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.
Zellkerne sind grün bzw. grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen kortikalen Ausschnitt.

Wie im physiologischen Nierengewebe kolokalisiert ACE2-mRNA mit Cx26-mRNA im proximalen Tubulus. Deutlich erkennbar ist die nach wie vor stärker ausgeprägte, aber dennoch reduzierte Transkription im S3-Segment, kortikal zeigt sie sich stark vermindert. Erhalten ist außerdem die in der Übersicht sichtbare radiäre Streifung im Cortex mit ACE2-reichen Bereichen (Abb. 29).

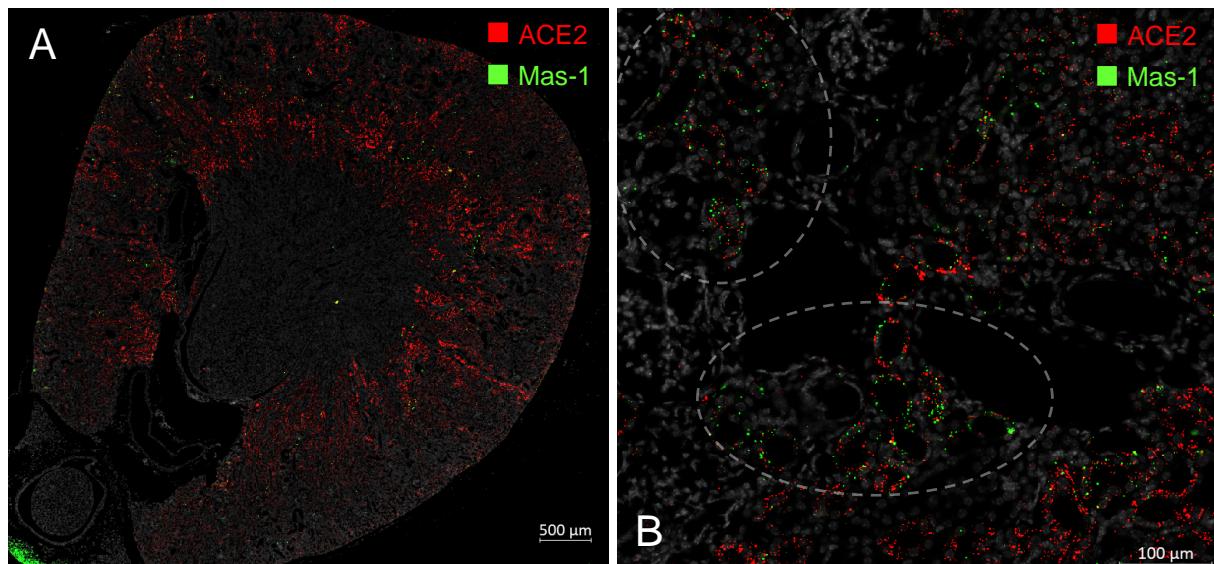


Abbildung 30: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit Mas-1-mRNA in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen kortikalen Ausschnitt. Die Ellipsen kennzeichnen die beschriebenen Mas-Cluster.

Insgesamt sind nur noch wenige Mas-mRNA Signale detektierbar. Die Mas-reichen pT-Cluster im Bereich der Vasa arcuata weisen jedoch nach wie vor eine gesteigerte Abundanz im Vergleich zum restlichen proximalen Tubulus auf. (Abb. 30).

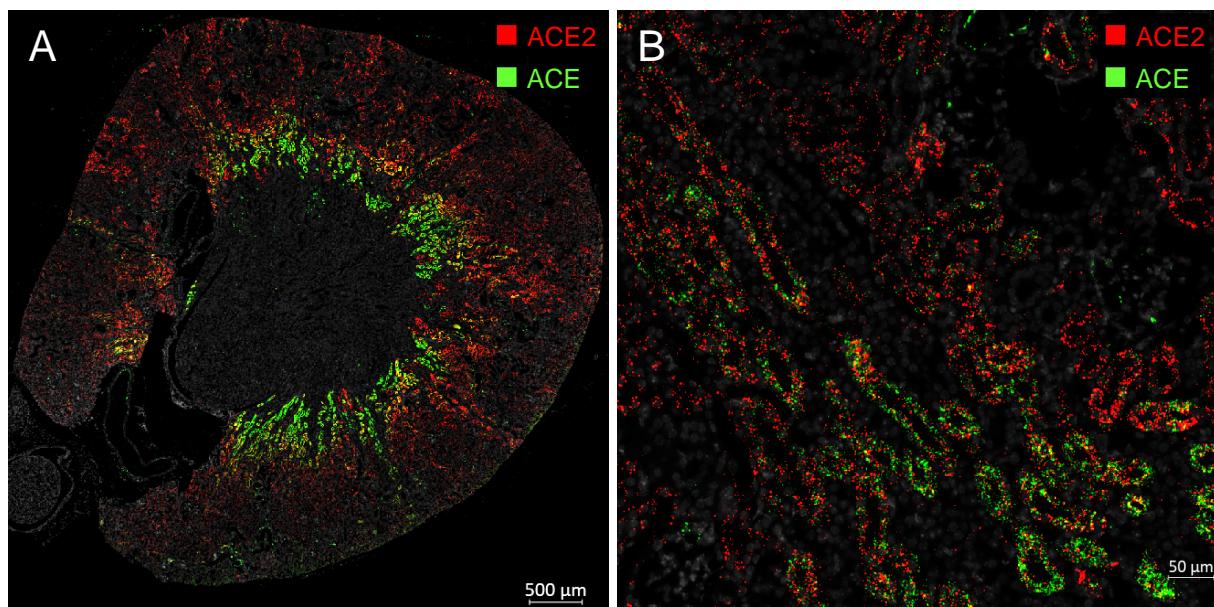


Abbildung 31: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit ACE-mRNA in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen Ausschnitt im Bereich des Übergangs von Cortex und Außenstreifen.

ACE zeigt sich kortikal ebenfalls stark reduziert, weniger deutlich ist der Rückgang im Außenstreifen des äußeren Markes. Anhand der FISH ließe sich eine stärkere Verminderung der mRNA-Abundanz bei ACE als bei ACE2 konstatieren (Abb. 31). Bei allen untersuchten Komponenten konnte keine Lokalisation außerhalb der in 3.3.5 identifizierten Strukturen festgestellt werden.

3.4.2.2 Unilaterale Ureterobstruktion

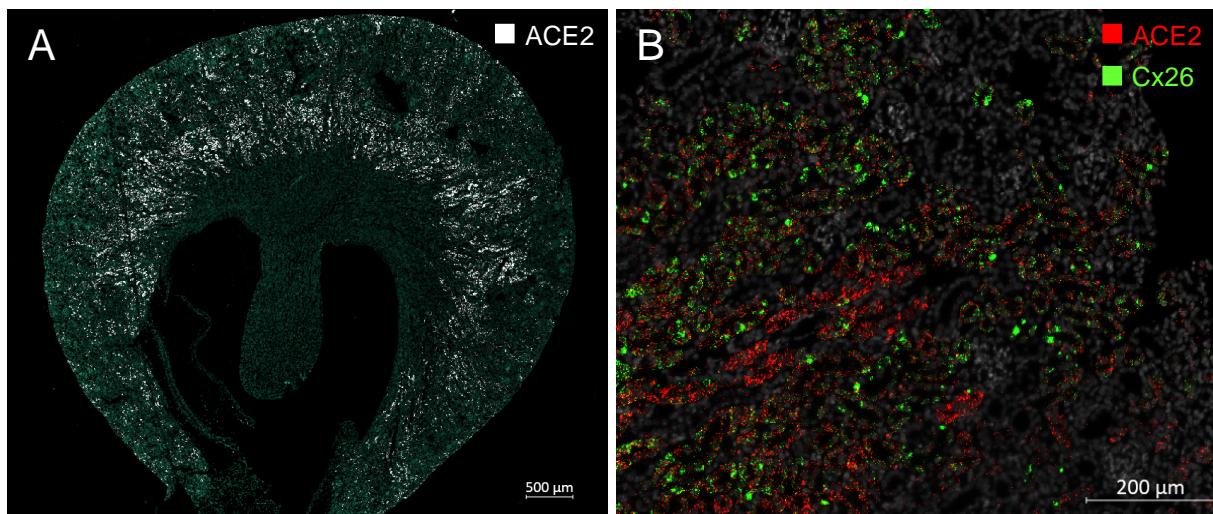


Abbildung 32: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx-26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei UUO.

Zellkerne sind grün bzw. grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen kortikalen Ausschnitt.

Wie in den Nieren der Tiere mit Adenin-induzierter Nephropathie zeigt sich die ACE2-mRNA-Abundanz proximal-tubulär herabgesetzt. In der FISH erscheint dieser Rückgang bei den UUO-Tieren etwas geringer. Erkennbar ist weiterhin die ausgeprägte Transkription im Außenstreifen des äußeren Marks und den strangförmigen Bereichen des Kortex (Abb. 32).

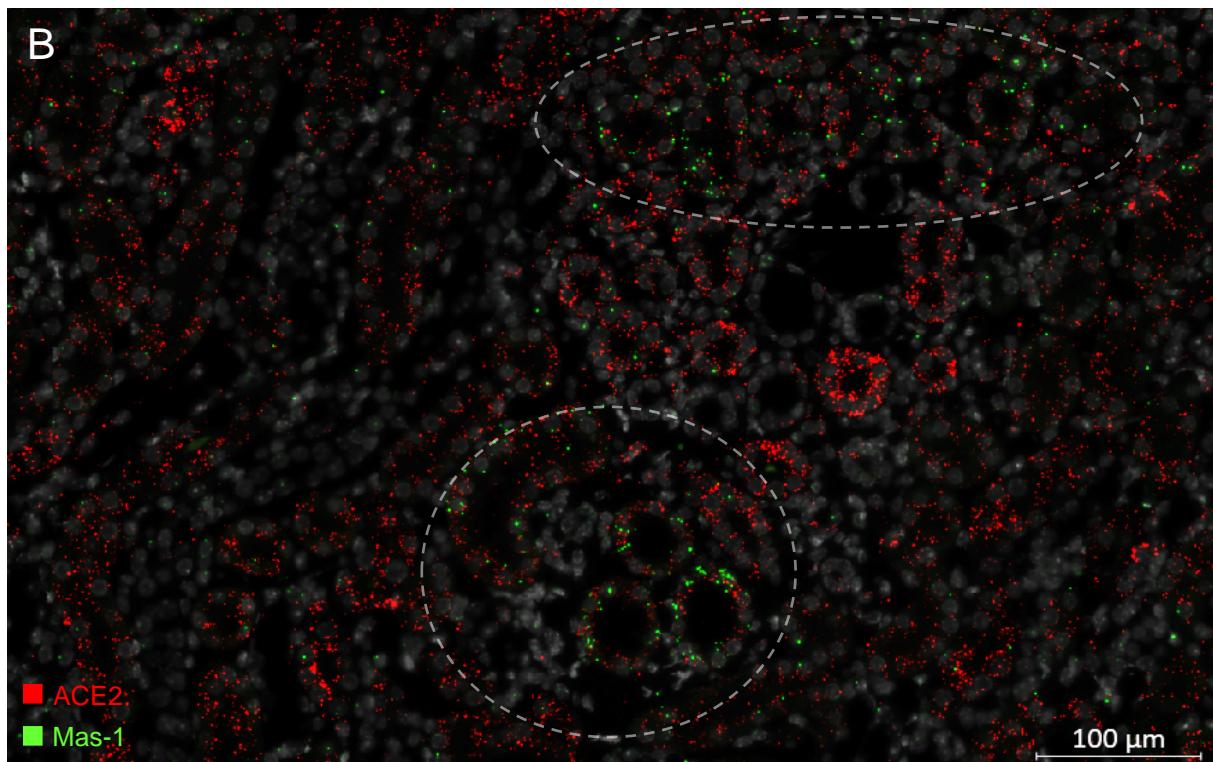


Abbildung 33: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit Mas-1-mRNA in murinem Nierengewebe bei UUO.

Zellkerne sind grau dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Detailaufnahme der Mas-Cluster, die mit Kreisen gekennzeichnet sind.

Mas-1-mRNA war im proximalen Tubulus kaum mehr nachzuweisen. Lediglich die beschriebenen Cluster im Bereich der arcuaten Gefäße wiesen nennenswerte Signale auf (Abb. 33).

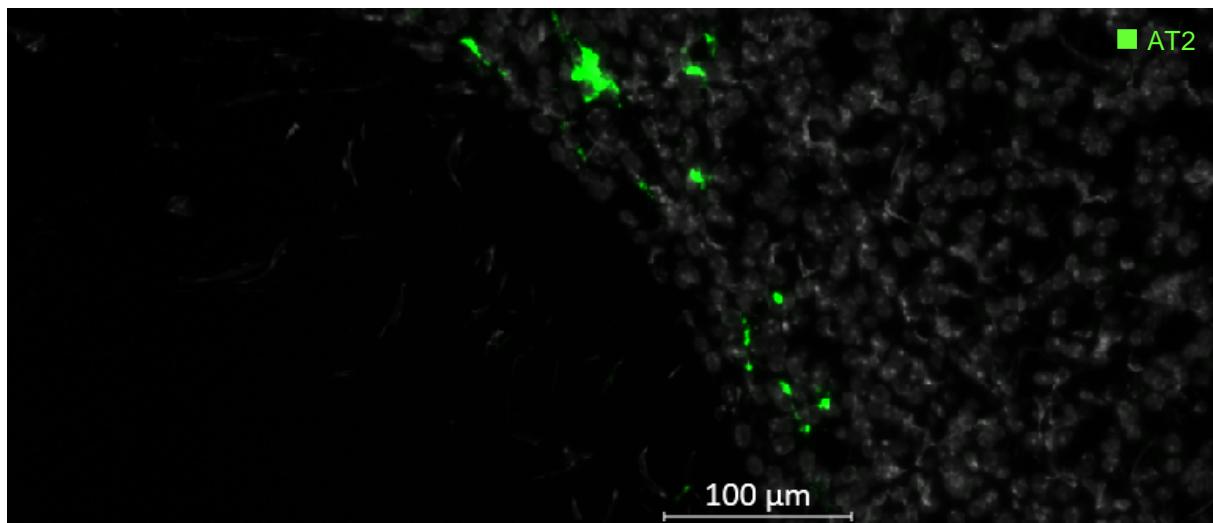


Abbildung 34: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von AT2-mRNA in murinem Nierengewebe bei UUO.

Zellkerne sind grau dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Detailaufnahme von suburothelialen AT2-positiven Zellen.

In allen untersuchten Nieren konnten peripapillär einzelne suburotheliale AT2-positive Zellen beobachtet werden. Das restliche Nierengewebe zeigte sich dahingehend gänzlich unauffällig (Abb. 34).

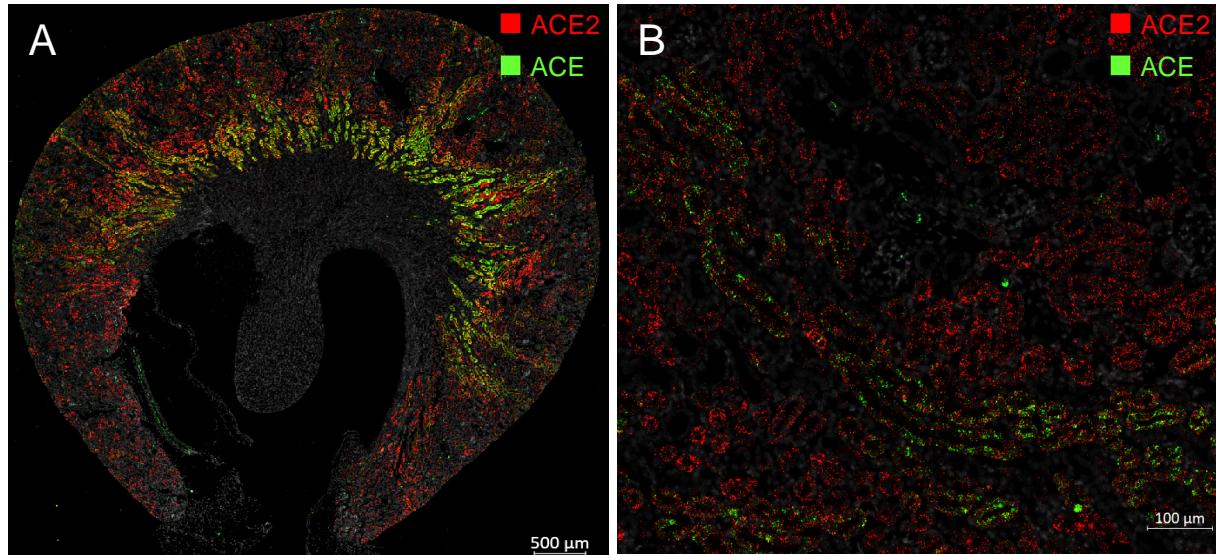


Abbildung 35: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx-26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei UUO.

Zellkerne sind grau dargestellt. A zeigt eine Übersichtsaufnahme, B einen kortikalen Ausschnitt.

Die Transkription von ACE zeigte sich in der FISH kortikal weniger vermindert als bei den Adenin-Tieren. Die mRNA-Signale im Außenstreifen des äußeren Marks blieben weitgehend unverändert (Abb. 35).

Bei allen untersuchten Komponenten konnte, bis auf den AT2-Rezeptor, ebenfalls keine Lokalisation außerhalb der in 3.3.5 identifizierten Strukturen festgestellt werden.

4 Diskussion

ACE2 ist mit seinen beiden korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 ein essentieller Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Die beiden Arme des RAAS stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht zueinander, das zum einen an der Aufrechterhaltung vieler physiologischer Funktionen im Organismus maßgeblich beteiligt ist. Zum anderen trägt es zur Pathogenese und Progression diverser Erkrankungen bei.

Da der Expressionsort und die Funktionalität eines Proteins eng miteinander verknüpft sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die essentiellen Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen Geweben genauer zu lokalisieren. Angesichts der in der Einleitung beschriebenen ambivalenten Befunde verschiedener Untersuchungen hinsichtlich der inter- und intraorganischen Verteilung des ACE2, aber auch der beiden Rezeptoren Mas-1 und AT2, ist es umso wichtiger, die vorliegenden Ergebnisse vergleichend einzuordnen.

4.1 Quantitative mRNA- und Proteinanalyse in verschiedenen Geweben

Im Zuge der durchgeföhrten quantitativen mRNA-Analysen konnte die Niere als Haupttranskriptionsort des ACE2 unter den untersuchten Organen identifiziert werden. Diese Beobachtung, sowie die übrigen Messungen an Leber, Herz und Gehirn zeigen sich weitgehend kongruent zu etlichen vorherigen Befunden diverser methodisch vergleichbarer Studien, die an unterschiedlichen Nagern vorgenommen wurden (125–127). Song et al. stellten hingegen höhere ACE2-mRNA-Level in murinem Lungengewebe fest, wobei dabei eine andere Mauslinie als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (23). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die ACE2-Expression massiven altersabhängigen Schwankungen unterworfen ist. Während die anfangs niedrige Abundanz der ACE2-mRNA in der Lunge von der Embryonalperiode über die Adoleszenz bis hin zum adulten Tier kontinuierlich zunahm, sank sie im renalen Gewebe nach einem perinatalen Peak ab (23). Der Zeitpunkt der quantitativen mRNA-Bestimmung muss daher bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden und könnte neben dem abweichenden genetischen Hintergrund der

Versuchstiere diese Diskrepanz erklären. Eine noch höhere Abundanz als in der Niere wurde bei einigen Untersuchungen beispielsweise im Dünndarm festgestellt (125, 126). In humanem Gewebe sind gegenüber der Maus einige Unterschiede hinsichtlich der Organverteilung der ACE2-mRNA zu konstatieren. Die mit Abstand höchsten Abundanzen treten hierbei wiederum in einigen Bereichen des Intestinums sowie der Niere auf. Allerdings werden in der Lunge im Gegensatz zu den Befunden aus Untersuchungen an Nagern um ein vielfaches niedrigere ACE2-mRNA-Level beschrieben, die teilweise unter der in den Studien festgelegten Nachweigrenze lagen. Angesichts der Rolle des ACE2 als Entry-Rezeptor der aerogen übertragenen SARS-Co-Viren und der resultierenden Covid-19-Pneumonie ist diese Beobachtung besonders bemerkenswert. In humanem Herzgewebe hingegen zeigt sich die Transkription im Vergleich zur Maus erheblich gesteigert und bewegt sich etwa bei ca. 50% des renalen Niveaus (21, 109, 128).

Bei den Ergebnissen der durchgeföhrten Experimente sind vor allem die massiven Diskrepanzen zwischen der ACE2-Expression auf mRNA- und Proteinebene auffällig. Dabei scheinen die verschiedenen Organe stark voneinander abweichende Translationsraten aufzuweisen. Zeigte beispielsweise ACE2-mRNA im Lungengewebe noch die zweithöchste Abundanz, konnte im Western Blot kaum mehr Enzym nachgewiesen werden. Dahingegen lagen die hepatischen ACE2-mRNA-Level auf nur ca. 1% der renalen Spiegel, während die Proteinexpression auf ca. 25% in Bezug auf die Messwerte der Niere anstieg. Letztere Beobachtung konnte in milderer Ausprägung ebenfalls bei den anderen untersuchten Organen festgestellt werden. Angesichts bisheriger Studien, die dieses Missverhältnis ebenfalls bestätigen, ist die Validität der ermittelten Daten nicht grundsätzlich in Frage zu stellen (23, 125). Es ist allerdings unklar, inwiefern methodische Limitationen, insbesondere die Schwierigkeit der Gewinnung von gleichzeitig spezifischen und hochaviden Antikörpern, bei der Interpretation dieser Ergebnisse zu berücksichtigen sind.

Die erhobenen Befunde legen nahe, dass die Niere nicht nur die höchste ACE2-mRNA-Abundanz aufweist, sondern auch die Proteinexpression renal am stärksten ausgeprägt erscheint, wenngleich in anderen Untersuchungen an Mäusen das Herz, die Lunge oder das Gehirn die größten ACE2-Vorkommen aufwiesen. Dabei war allerdings wiederum ein starker Einfluss des Zeitpunkts der Organentnahme zu beobachten und die Verwendung von Tieren unterschiedlichen genetischen

Hintergrunds sowie von anderen Antikörpern erschwert den Vergleich der ermittelten Daten^(23, 125).

Im humanen Organismus wird in etlichen Studien ebenfalls die Niere als Hauptexpressionsort des ACE2 unter den untersuchten Organen beschrieben. Weitere Gewebe, in denen größere Mengen an Enzym nachgewiesen werden konnte, sind insbesondere Darm und Hoden⁽²¹⁾. Angesichts der renalen Dysfunktion bei vielen kritisch kranken Covid-19-Patienten und der häufigen gastrointestinalen Manifestation sollte der eventuelle Zusammenhang zwischen der ACE2-Expression und der extrapulmonalen Organbeteiligung bei SARS-CoV-2-Infektion genauer eruiert werden^(129–131).

Hinsichtlich des Mas-Rezeptors wies das Gehirn bei Weitem die höchste Abundanz auf, was mit bisherigen Befunden übereinstimmt⁽¹⁸⁾. Der AT2-Rezeptor wurde nur in der Nebenniere und in geringem Ausmaß ebenfalls im zentralen Nervensystem nachgewiesen. Sein Vorkommen in Herz und Niere, wie es in der Literatur beschrieben wird, konnte in den durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden^(40, 132).

Es konnte gezeigt werden, dass die Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in manchen Geweben teilweise in ähnlicher oder sogar höherer Ausprägung präsent waren als die des kanonischen RAAS. Auch wenn von der Abundanz der Enzyme und Rezeptoren nicht unmittelbare Rückschlüsse auf ihre gewebsspezifische sowie systemische Bedeutung gezogen werden können, ist diese Beobachtung angesichts der Prädominanz der kanonischen Systemachse im pathophysiologischen Verständnis und der Pharmakotherapie vieler Erkrankungen, insbesondere der arteriellen Hypertonie, dennoch relevant.

4.2 Lokalisation und Bedeutung des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organsystemen

4.2.1 Herz

Im untersuchten murinen Herzgewebe konnten nur sehr geringe Mengen ACE2-mRNA detektiert werden, die am ehesten kardialen Fibroblasten zuzuordnen waren. Die Existenz in Kardiomyozyten oder kardialen Gefäßen, wie sie bereits in diversen Spezies beschrieben wurde, konnte dahingegen nicht bestätigt werden^(133–135), wobei wiederum die altersabhängigen Schwankungen der ACE2-mRNA-Abundanz zu berücksichtigen sind.

Stimuliert durch Ang II spielen diese Fibroblasten eine wichtige Rolle im Rahmen des kardialen Remodelings. Die dortige Expression von ACE2 könnte durch die Degradation von Angiotensin die Synthese extrazellulärer Matrix verringern und so die fibrotischen Prozesse kompensieren⁽⁴⁵⁾. Der Mas-Rezeptor wies zwar keine Kolokalisation mit ACE2 auf, eine Interaktion mit Ang(1-7) ist durch Diffusionsvorgänge allerdings dennoch denkbar. Außerdem ist durch die Fähigkeit des Ectodomain Sheding des ACE2 in das Interstitium eine pankardiale Wirkung durch seine lösliche Form möglich. Diese Überlegungen werden gestützt durch Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von ACE2 die Entstehung von Herzhypertrophie und ventrikulärem Remodeling durch Ang II-Infusion abmildert und die Kollagensynthese in kardialen Fibroblasten hemmt^(46, 47). In ACE2-defizienten Nagern konnten hingegen eine verminderte Kontraktilität und strukturelle Veränderungen des Myokards beobachtet werden^(10, 50).

Aufgrund dieser kardioprotektiven Eigenschaften könnte ACE2 künftig als ein neues pharmakotherapeutisches Target fungieren, insbesondere bei Erkrankungen des Herzens, die mit kardialem Remodeling assoziiert sind.

4.2.2 Lunge

Die Beobachtungen bezüglich der Lokalisation des ACE2 in murinem Lungengewebe zeigten sich auf mRNA- und auf Proteinebene absolut kongruent. Während im Lungenparenchym kein Enzym nachgewiesen werden konnte, zeigte sich im

respiratorischen Epithel der Bronchien eine ausgeprägte apikale Expression. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Booeshaghi und Pachter, die diese ACE2-exprimierenden Zellen mittels Single Cell Sequencing als Becher- und Zilien tragende Zellen identifizieren konnten⁽¹³⁶⁾.

Diese luminale Lokalisation legt nahe, dass das Ectodomain Shedding der löslichen Variante des Enzyms in das Bronchialsekret eine relevante Rolle in der Physiologie der murinen Lunge spielt, ohne genaue Aussagen über die tatsächliche Funktion treffen zu können. Möglich wären etwa protektive Effekte im Falle exogen induzierter Inflammationsprozesse. Eine erhöhte bronchiale Expression ist im Mausmodell beispielsweise bei bakterieller Pneumonie oder allergischer Reaktion zu beobachten (137).

Seit der Beschreibung des ACE2 als SARS-CoV-2-Rezeptor wurde eine Vielzahl an Studien bezüglich seiner Lokalisation im humanen Respirationstrakt publiziert. Diese unterscheiden sich nicht nur methodisch, sondern weisen auch in ihren Befunden mehr oder weniger ausgeprägte Unterschiede auf. Zusammengefasst scheint sich die ACE2-Expression im Menschen im Gegensatz zur Maus eher auf das Zilien tragende Flimmerepithel der oberen Atemwege sowie auf Pneumozyten vom Typ 2 zu konzentrieren, wobei die Abundanz im pulmonalen Gewebe insgesamt relativ gering ausfällt (21, 22, 93, 108, 137, 138).

4.2.3 Leber

Die ACE2-Expression in der Leber konzentrierte sich im Wesentlichen auf die sich im perisinusoidalen Disse-Raum befindlichen Sternzellen im Bereich der Portalvenenäste, wobei sich die Befunde auf mRNA- und Proteinebene wiederum kongruent zeigten. Eine Lokalisation in Hepatozyten, Gallengangsepithel oder dem Endothel, wie sie beispielsweise in humanem oder Rattengewebe mittels immunhistochemischer Färbung beobachtet wurde, konnte nicht bestätigt werden⁽⁶³⁾. Eine exakte Differenzierung von Endothelzellen, Hepatozyten und Sternzellen ist allerdings aufgrund des nur wenige hundert Nanometer breiten Disse-Raums ohne spezifische Kofärbung mit zellulären Markerproteinen kaum vorzunehmen.

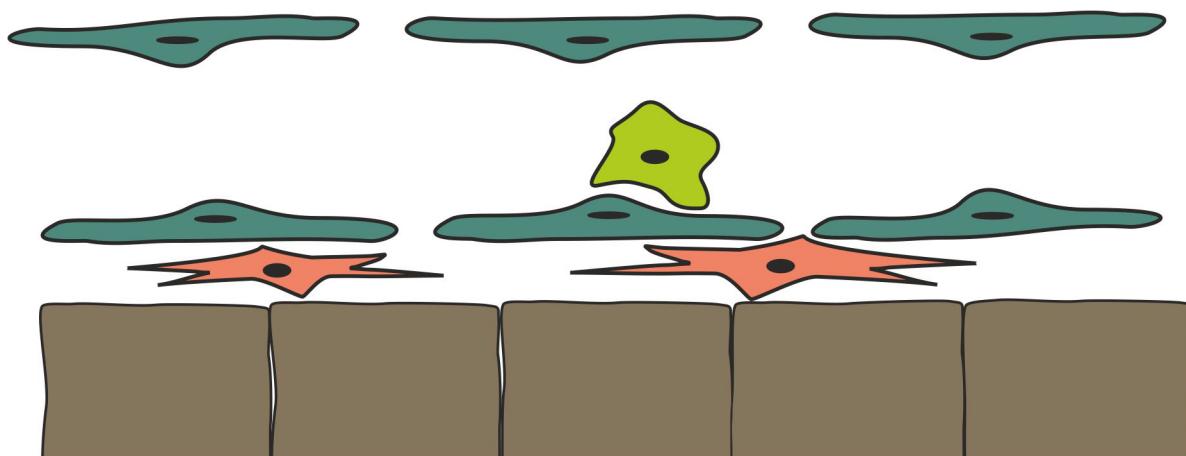


Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Lebersinusoids

Dargestellt sind Hepatozyten (braun), Endothelzellen (dunkelgrün), Kupferzellen (hellgrün) und hepatische Sternzellen (orange) des subendothelialen Disse-Raums.

Bei den Sternzellen handelt es sich um fibroblastoide Zellen, die in erster Linie eine Speicherfunktion für Vitamin A erfüllen und der Produktion extrazellulärer Matrix dienen. Dadurch sind sie maßgeblich an der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen der Leber, insbesondere der Zirrhose beteiligt. Dabei kommt es zu einer mitunter durch das kanonische RAAS induzierten Überaktivität der Sternzellen, die eine hepatische Fibrose herbeiführen⁽⁶²⁾. Die dortige Expression von ACE2 könnte durch die lokale Degradation von Ang II die Kollagensynthese verringern und die degenerativen Prozesse kompensieren. Mit dieser Vermutung stimmen auch die Befunde etlicher Untersuchungen überein, die zeigen konnten, dass die Applikation oder Überexpression von ACE2 und Ang(1-7) artifiziell verursachte Leberparenchymenschäden abmildern konnten^(62, 70–73, 139). Da die Zirrhose eine Präkanzerose zum HCC darstellt, könnte das nicht-kanonische RAAS auf diesem Wege der Entstehung von hepatischen Neoplasien entgegenwirken.

Des Weiteren konnte ACE2 zusammen mit ACE im, die Gallengänge umgebenden, Bindegewebe nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen macht die Assoziation des RAAS mit fibrotisch-degenerativen Erkrankungen der Gallenwege, beispielsweise der primär sklerosierenden Cholangitis denkbar, die künftig Gegenstand investigativer Vorhaben in diesem Bereich sein könnte.

4.2.4 Nebenniere

Bisher existieren nur vergleichsweise wenige Daten zur adrenalnen Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Komponenten des nicht-kanonischen RAAS, insbesondere in murinem Gewebe. In den durchgef hrten Experimenten konnte ACE2 in PDGFR β -positiven Zellen im gesamten Nebenniereninterstitium nachgewiesen werden.

In humanen immunhistochemisch gefärbten Präparaten hingegen wurden die hormonproduzierenden Zellen selbst als adrenaler Expressionsort des ACE2 identifiziert⁽¹⁴⁰⁾. An dieser Stelle sei allerdings nochmals die Schwierigkeit der Gewinnung spezifischer Antikörper erwähnt. Aufgrund der Homologie des ACE2 zu anderen Proteinen wie ACE oder Collectrin, sollte diese Problematik bei der Interpretation der Ergebnisse nicht ignoriert werden.

Mas-1 trat lediglich in der Zona glomerulosa in Erscheinung. Inwiefern dieser die Aktivität der Aldosteron produzierenden Zellen beeinflussen und so eventuell seine antihypertensiven Effekte vermitteln könnte, ist durch weitere Studien zu untersuchen. Der andere untersuchte Ang(1-7)-Rezeptor AT2 zeigte sich in den neuroendokrinen Zellen des Nebennierenmarks sehr ausgeprägt exprimiert. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass er dort die Katecholaminsekretion stimuliert⁽¹⁴¹⁾. Er wies ebenso wie Mas keine Kolokalisation mit ACE2 auf. Dennoch könnte in der Rinde entstandenes Ang(1-7)/(1-9) dem kortikomedull ren Blutfluss folgen und im Markbereich an AT2 binden. Inwiefern eine solche Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor tatsächlich stattfindet, bleibt allerdings zu klären.

Auffällig ist die insgesamt hohe Abundanz des ACE2 im adrenalnen Gewebe, die sich auf Proteinebene auf ca. 77% des renalen Niveaus bewegt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Nebenniere maßgeblich an der Pathogenese insbesondere schwerer Covid-19-Verläufe beteiligt ist. Dabei sind histopathologisch inflammatorische Infiltrate sowie funktionell eine ausgeprägte Nebenniereninsuffizienz zu beobachten, die sich in einer überschießenden Immunreaktion sowie oft katecholaminpflichtiger Hypotonie manifestieren kann^(140, 142).

4.2.5 Niere

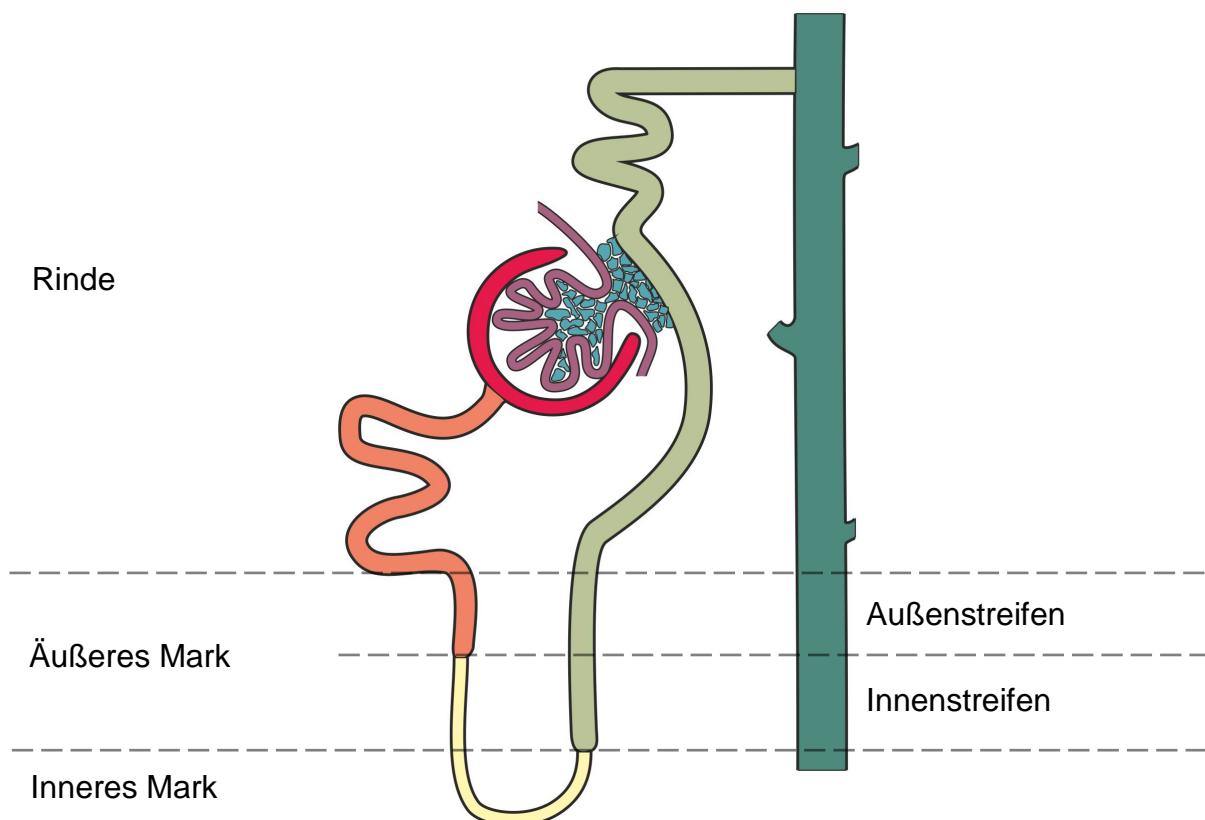


Abbildung 37: Schematische Darstellung eines Nephrons

Glomeruläre Kapillare (violett), Bowmankapsel (rot), pT (orange), Intermediärtubulus (gelb), dT (hellgrün), Sammelrohr (dunkelgrün), Mesangium (blau).

Zur Lokalisation des ACE2 in der Niere existieren bereits zahlreiche Studien, die allerdings sehr heterogene Befunde aufweisen. Wie bereits aus den meisten Untersuchungen an verschiedenen Spezies hervorgeht, konnte in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Experimenten eine ausgeprägte luminaire Expression im proximalen Tubulus, insbesondere im Pars recta, sowie dem parietalen Blatt der Bowmankapsel bestätigt werden (2, 21, 22, 53, 57, 124, 143). In den Übersichtsaufnahmen imponierten kortikale Areale hoher Abundanz als radiär verlaufende Streifung, von der bisher nicht berichtet worden war.

Nicht reproduzierbar waren hingegen Beobachtungen, die ACE2 in murinen Mesangialzellen, Podozyten oder renalen Gefäßen beschreiben (2, 124). Weiterhin konnte das Enzym in Ratten- und humanen Nieren mittels immunhistochemischer Färbung im distalen Tubulus und dem Sammelrohr detektiert werden (2, 22, 144). Bei diesen Befunden darf allerdings eine eventuelle Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Collectrin im dT oder gegen ACE im vaskulären Endothel nicht außer Acht gelassen

werden⁽⁵⁷⁾. Eine enzymatische Aktivität in distalen Nephronabschnitten ist durch das konstitutive Ectodomain Shedding dennoch denkbar.

Mas-1-mRNA war in erster Linie im proximalen Tubulus nachzuweisen, was sich kongruent mit Befunden aus anderen Nagetieren zeigt. Ein Auftreten im distalen Tubulus, wie es bereits in Rattenieren beobachtet wurde, konnte hingegen nicht bestätigt werden⁽¹³⁾. Besonders auffällig war das heterogene Expressionsmuster des Rezeptors innerhalb des pT mit Bereichen unterschiedlich ausgeprägter Abundanz. Nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht beschrieben waren die Mas-reichen Cluster im Bereich der arcuaten Gefäße. Welche Funktion diese gerade in den juxtaglomerulären Tubuluszellen erfüllen könnten, ist in künftigen Untersuchungen zu eruieren.

In den Zellen des Mesangiums könnte der Mas-Rezeptor seine antifibrotischen Effekte vermitteln, was Studien an Mas-defizienten Mäusen nahelegen. Dabei war histologisch eine Expansion der mensangialen extrazellulären Matrix zu beobachten, die sich auf molekularer Ebene durch die verstärkte Expression profibrotischer Proteine, wie Kollagenen, α -Sma und Fibronectin, widerspiegelt^(61, 145).

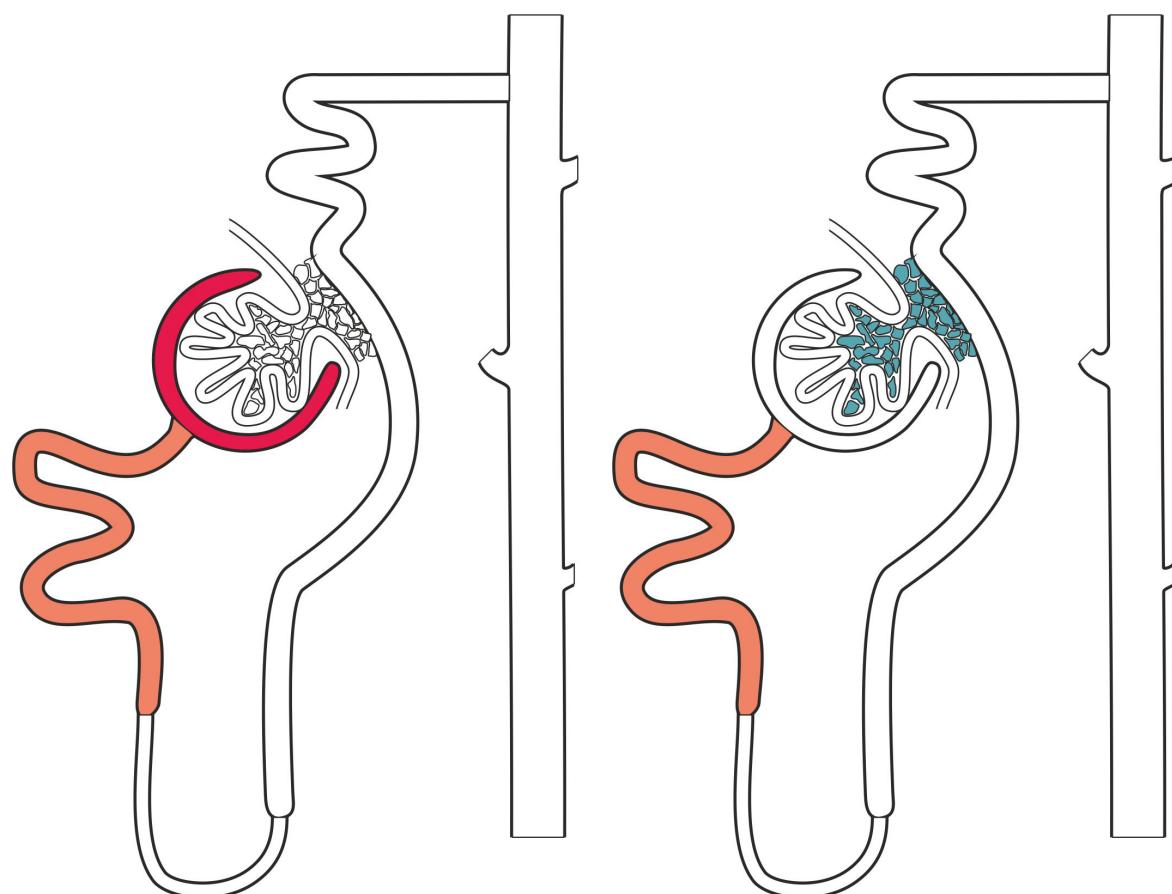


Abbildung 38: Schematische Darstellung der ACE2- (links) und Mas-1-Expression (rechts) entlang des murinen Nephrons.
Farbig markierte Bereiche kennzeichnen die Expression von ACE2 bzw. Mas-1.

Als ein weiterer Transkriptionslocus von Mas erwies sich die glatte Muskulatur renaler Gefäße. Dort könnte der Rezeptor durch verschiedene Prozesse zur antihypertensiven Wirkung des nicht-kanonischen RAAS beitragen: Zum einen durch eine direkte Verminderung des Vasotonus, zum anderen steigt durch die Vasodilatation die renale Durchblutung, was der Reninsekretion entgegenwirkt und so einen weiteren antagonistischen Mechanismus zur kanonischen Systemachse darstellen könnte. Damit im Einklang stehen die Ergebnisse aus Untersuchungen an Mas-Knockoutmodellen, die eine Reduktion im renalen Blutfluss und des Harnzeitvolumens konstatierten. Der Mas-Rezeptor scheint auf diesem Wege also auch an der Regulierung der Diurese beteiligt zu sein^(61, 146).

Bemerkenswert war weiterhin die Kolokalisation von ACE2 und ACE im Bürstensaum des proximalen Tubulus, stellen sie doch die beiden Schlüsselenzyme der beiden antagonistischen RAAS-Achsen dar. Auffällig waren dabei die Bereiche, in denen zwar ACE2, nicht aber ACE, exprimiert wird. In der Übersicht wird dies in Form einer ausgeprägten radiär verlaufenden Streifung deutlich, wobei Areale mit und ohne kanonischem Enzym alternieren. Inwiefern sich diese Tubulusabschnitte eventuell noch unterscheiden und welche funktionelle Bedeutung diesen inhärent sein könnte, ist künftig genauer zu eruieren.

In den Geweben der beiden renalen Schädigungsmodelle war sowohl für die Komponenten des kanonischen als auch nicht-kanonischen RAAS eine Abnahme der Abundanz zu erkennen. Ob daraus in netto dennoch erhöhte Ang II-Konzentrationen resultieren, die als Mediator der fibrotischen Veränderungen fungieren, bleibt fraglich. Auch wenn die Übersichtsaufnahmen der histologischen Schnitte eine relativ stärkere Reduktion der ACE-Expression gegenüber dem ACE2 vermuten ließ, konnte in den quantitativen mRNA-Analysen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Da dieser Rückgang des ACE in der FISH allerdings vor allem kortikal zu beobachten war, wäre im Rahmen der Präparation der Organe für die qPCR eventuell eine zonale Differenzierung sinnvoll.

Die Befunde aus bisherigen Studien bezüglich der ACE/ACE2-Expression bei renaler Schädigung zeichnen ein äußerst heterogenes Bild, wobei der Großteil eher für eine Erniedrigung der ACE2- bei gleichzeitiger Erhöhung der ACE-Level spricht. Eine Zunahme der Abundanz des ACE2 oder eine Neoexpression in anderen Strukturen gegenüber gesundem Nierengewebe, konnte in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Experimenten nicht bestätigt werden^(10, 12, 54, 56, 147, 148).

Allerdings scheint dabei der Grad der Läsion eine entscheidende Rolle zu spielen. So beschreiben einige Untersuchungen vor allem im Frühstadium der Erkrankung einen Anstieg der ACE2-Expression, was einen initialen protektiven Kompensationsmechanismus darstellen könnte^(10, 12). In den verwendeten Modellen wäre daher eine Betrachtung nach kürzerer Ureterligations- bzw. Adeninperiode interessant.

5 Zusammenfassung

Seit seiner Identifikation als Entry-Rezeptor der SARS-Co-Viren gerät das Angiotensin Converting Enzyme 2 zunehmend in das Blickfeld biomedizinischer Forschung. Mit seiner Entdeckung im Jahr 2000 wurde das konventionelle RAAS um eine nicht-kanonische Systemachse erweitert. Es spaltet Ang II und produziert weitere Angiotensinderivate, wie Ang(1-7) und Ang (1-9), welche als Liganden für seine beiden korrespondierenden Rezeptoren Mas-1 und AT2 fungieren. Es stellt dadurch einen essentiellen Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems dar, dessen beiden Achsen in einem empfindlichen Gleichgewicht zueinander stehen, welches maßgeblich an der Aufrechterhaltung vieler physiologischer Funktionen im Organismus beteiligt ist.

Im Rahmen der Genese und Progression etlicher Erkrankungen kommt es zu einer Überaktivität des kanonischen Systemarms, welcher sowohl systemisch als auch lokal im Gewebe nachteilige Effekte vermittelt. In diesen pathologischen Zuständen agiert das nicht-kanonische RAAS als zentraler Mediator protektiver antagonistischer Effekte. Diese sind in erster Linie vasodilatativer, antioxidativer, antithrombotischer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Art.

Die Datenlage hinsichtlich der Lokalisation des ACE2 erweist sich als sehr ambivalent. Da der Expressionsort und die Funktionalität eines Proteins eng miteinander verknüpft sind, ist es von großem Interesse, mehr über seine genaue Organ- und Zellverteilung zu erfahren. Ziel dieser Dissertation war es deshalb das Schlüsselenzym des nicht-kanonischen RAAS sowie seine wichtigsten Rezeptoren in ausgewählten murinen Geweben genauer zu lokalisieren.

Dazu wurden zunächst quantitative mRNA- und Proteinanalysen mittels Real-Time qPCR bzw. Western Blot durchgeführt, um einen Eindruck über die interorganische Distribution der untersuchten Enzyme und Rezeptoren zu gewinnen. Haupttranskriptions- und Expressionsort des ACE2 war dabei die Niere, weshalb auf diese in den nachfolgenden Versuchen besonderes Augenmerk gelegt wurde. Bemerkenswert war außerdem, dass die Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in manchen Geweben teilweise in ähnlicher oder sogar höherer Ausprägung präsent waren als die des kanonischen RAAS, was angesichts der Prädominanz der kanonischen Systemachse im pathophysiologischen Verständnis vieler Erkrankungen besonders relevant erscheint.

Im nächsten Schritt wurde durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung versucht, den Komponenten des nicht-kanonischen RAAS wiederum auf mRNA- und Proteinebene zelluläre Strukturen zuzuordnen.

In Herz, Leber und Nebenniere konnte ACE2 am ehesten in Fibroblasten bzw. fibroblastoiden Zellen des Interstitiums nachgewiesen werden. Insbesondere in kardialem und hepatischem Gewebe legen diese Beobachtungen in Kombination mit Befunden aus vorherigen Studien nahe, dass es dort durch die Degradation von Ang II fibrotisch-degenerativen Prozessen entgegenwirken kann. In der murinen Lunge ist ACE2 am apikalen Pol des respiratorischen Epithels der Bronchien lokalisiert.

Die ACE2-Level in der Niere waren die höchsten unter den untersuchten Organen. Dort tritt das nicht-kanonische Schlüsselenzym vorwiegend im Bürstensaum des proximalen Tubulus in Erscheinung, wo es eine Kolokalisation mit Mas-1 und seinem kanonischen Analogon ACE aufweist. Mas ist weiterhin in Mesangialzellen und der Muscularis der renalen Gefäße exprimiert. Dort könnte es EZM-Expansion im Rahmen einiger Nierenerkrankungen hemmen und die renale Durchblutung positiv beeinflussen.

Die erhobenen Befunde bezüglich der Lokalisation der Enzyme und Rezeptoren des nicht-kanonischen RAAS unterstützen seine postulierten protektiven Effekte auf unterschiedliche Organsysteme. Künftig könnten seine Komponenten deshalb eine wichtige Rolle in klinischen Therapieverfahren einnehmen, etwa bei arterieller Hypertonie, Herzinsuffizienz, thrombotisch-ischämischen Ereignissen, fibrotisch-degenerativen und neoplastischen Organveränderungen und nicht zuletzt Infektionskrankheiten wie Covid-19. Gerade vor dem Hintergrund der erst kürzlich überwundenen Pandemie und nun endemischen SARS-CoV-2-Situation ist es von immenser Bedeutung, weitere Lokalisationsstudien zum Thema ACE2 durchzuführen und genauer zu eruieren, welche Bedeutung dem Enzym im Rahmen dieser Multisystemerkrankung zukommt.

6 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv* 2020;2020.01.31.929042. Verfügbar unter:
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.31.929042v1>.
2. Hamming I, Cooper ME, Haagmans BL, Hooper NM, Korstanje R, Osterhaus ADME et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *The Journal of pathology* 2007; 212(1):1–11. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17464936/>.
3. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research* 2000; 87(5):E1-9. doi: 10.1161/01.RES.87.5.e1.
4. E. Hackenthal, M. Paul, D. Ganzen, and R. Taugner. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion [Stand: 02.09.2021]. Verfügbar unter:
<https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.1990.70.4.1067>.
5. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PML et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli corrected. *Pharmacol Rev* 2015; 67(4):754–819. doi: 10.1124/pr.114.010454.
6. Liu J, Li X, Lu Q, Di Ren, Sun X, Rousselle T et al. AMPK: a balancer of the renin-angiotensin system. *Biosci Rep* 2019; 39(9). doi: 10.1042/BSR20181994.
7. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(8 Suppl B):9–20 [Stand: 08.09.2021]. Verfügbar unter:
<https://www.jmcp.org/doi/pdf/10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9>.
8. Arai S, Stotts N, Puntillo K. Thirst in critically ill patients: from physiology to sensation. *Am J Crit Care* 2013; 22(4):328–35. doi: 10.4037/ajcc2013533.

9. Leung PS. The renin-angiotensin system: current research progress in the pancreas: The RAS in the pancreas. Dordrecht: Springer; 2010. (Advances in experimental medicine and biology; Bd. 690) [Stand: 08.09.2021]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120160/pdf/978-90-481-9060-7_Chapter_5.pdf.
10. Ortiz-Melo DI, Gurley SB. Angiotensin converting enzyme 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2016; 25(1):59–66. doi: 10.1097/MNH.0000000000000182.
11. Cohen JB, Hanff TC, Bress AP, South AM. Relationship Between ACE2 and Other Components of the Renin-Angiotensin System. *Curr Hypertens Rep* 2020; 22(7):44. doi: 10.1007/s11906-020-01048-y.
12. Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2015; 9(4):217–37. doi: 10.1177/1753944715597623.
13. Da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LRL, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O et al. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119(9):385–94. doi: 10.1042/CS20090554.
14. Bader M. ACE2 – das missbrauchte Multitalent. *Nephrologe* 2020; 15(6):1–4. doi: 10.1007/s11560-020-00448-0.
15. Verano-Braga T, Martins ALV, Motta-Santos D, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. ACE2 in the renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)* 2020; 134(23):3063–78. doi: 10.1042/CS20200478.
16. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological reviews* 2018; 98(1):505–53. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29351514/>.
17. Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes-E-Silva AC. The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis:

- Evidence from Basic and Clinical Research. Current drug targets 2017; 18(11):1301–13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27469342/>.
18. Bader M. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. Pflugers Arch 2013; 465(1):79–85. doi: 10.1007/s00424-012-1120-0.
 19. Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. ScientificWorldJournal 2009; 9:522–35. doi: 10.1100/tsw.2009.70.
 20. Schleifbaum J. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. Frontiers in medicine 2019; 6:107. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31245374/>.
 21. Hikmet F, Méar L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. Mol Syst Biol 2020; 16(7):e9610. doi: 10.15252/msb.20209610.
 22. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. The Journal of pathology 2004; 203(2):631–7. doi: 10.1002/path.1570.
 23. Song R, Preston G, Yosypiv IV. Ontogeny of angiotensin-converting enzyme 2. Pediatr Res 2012; 71(1):13–9. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/pr20117>.
 24. Burrell LM, Harrap SB, Velkoska E, Patel SK. The ACE2 gene: its potential as a functional candidate for cardiovascular disease. Clinical Science 2013; 124(2):65–76. doi: 10.1042/CS20120269.
 25. Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. Circ J 2010; 74(3):405–10 [Stand: 16.09.2021]. Verfügbar unter: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/74/3/74_CJ-10-0045/_pdf/-char/en.
 26. Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T et al. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. J Biol Chem 2004; 279(17):17996–8007 [Stand: 16.09.2021]. Verfügbar unter: <https://www.jbc.org/action/showPdf?pii=S0021-9258%2819%2975637-3>.

27. Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2004; 61(21):2704–13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15549171/>.
28. Singer D, Camargo SMR, Ramadan T, Schäfer M, Mariotta L, Herzog B et al. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2012; 303(6):G686-95. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22790597/>.
29. Iwata M, Silva Enciso JE, Greenberg BH. Selective and specific regulation of ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme. *American journal of physiology. Cell physiology* 2009; 297(5):C1318-29. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19759332/>.
30. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005; 280(34):30113–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15983030/>.
31. Xiao F, Zimpelmann J, Agaybi S, Gurley SB, Puente L, Burns KD. Characterization of angiotensin-converting enzyme 2 ectodomain shedding from mouse proximal tubular cells. *PLoS One* 2014; 9(1):e85958. doi: 10.1371/journal.pone.0085958.
32. Jia HP, Look DC, Tan P, Shi L, Hickey M, Gakhar L et al. Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2009; 297(1):L84-96. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19411314/>.
33. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I de et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(14):8258–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829792/>.

34. Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Experimental Physiology* 2008; 93(5):528–37. Verfügbar unter:
<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/expphysiol.2007.040345>.
35. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, Da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007; 49(1):185–92. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17116756/>.
36. Xiao X, Zhang C, Ma X, Miao H, Wang J, Liu L et al. Angiotensin-(1-7) counteracts angiotensin II-induced dysfunction in cerebral endothelial cells via modulating Nox2/ROS and PI3K/NO pathways. *Experimental cell research* 2015; 336(1):58–65. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26101159/>.
37. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; 111(14):1806–13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15809376/>.
38. Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganter D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS letters* 1995; 357(1):27–32. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8001672/>.
39. Erfinanda L, Ravindran K, Kohse F, Gallo K, Preissner R, Walther T et al. Oestrogen-mediated upregulation of the Mas receptor contributes to sex differences in acute lung injury and lung vascular barrier regulation. *European Respiratory Journal* 2021; 57(1). Verfügbar unter:
<https://erj.ersjournals.com/content/57/1/2000921.long>.
40. W. Qi, A.E. Vinturache, F.G. Smith. Cardiovascular and renal effects of angiotensin II type 2 receptors (AT2R) during ontogeny. *Current Topics in Pharmacology* 2011; 15(1):1–13. Verfügbar unter:
https://www.researchgate.net/publication/286148062_Cardiovascular_and_renal_effects_of_angiotensin_II_type_2_receptors_AT2R_during_ontogeny.

41. Faria-Costa G, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T. Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *Revista Portuguesa de Cardiologia* (English Edition) 2014; 33(7-8):439–49. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2174204914001664>.
42. Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* 2005; 45(5):960–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15767466/>.
43. Flores-Muñoz M, Smith NJ, Haggerty C, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *The Journal of physiology* 2011; 589(Pt 4):939–51. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173078/>.
44. Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17(2):116–29. doi: 10.1038/s41569-019-0244-8.
45. Iwata M, Cowling RT, Yeo SJ, Greenberg B. Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(4):542–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.12.003.
46. Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Experimental Physiology* 2005; 90(5):783–90. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049057/>.
47. Grobe JL, Der Sarkissian S, Stewart JM, Meszaros JG, Raizada MK, Katovich MJ. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clinical Science* 2007; 113(8):357–64. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17600530/>.
48. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 66:167–76 [Stand: 17.09.2021]. Verfügbar unter: <https://www.jmcc-online.com/action/showPdf?pii=S0022-2828%2813%2900350-7>.

49. Johnson JA, West J, Maynard KB, Hemnes AR. ACE2 improves right ventricular function in a pressure overload model. *PLoS One* 2011; 6(6):e20828. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21695173/>.
50. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417(6891):822–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12075344/>.
51. Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, Paula RD de et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47(5):996–1002. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567589/>.
52. Hay M, Polt R, Heien ML, Vanderah TW, Largent-Milnes TM, Rodgers K et al. A Novel Angiotensin-(1-7) Glycosylated Mas Receptor Agonist for Treating Vascular Cognitive Impairment and Inflammation-Related Memory Dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2019; 369(1):9–25. Verfügbar unter: <https://jpet.aspetjournals.org/content/369/1/9>.
53. Mitani S, Yabuki A, Sawa M, Chang H-S, Yamato O. Intrarenal distributions and changes of Angiotensin-converting enzyme and Angiotensin-converting enzyme 2 in feline and canine chronic kidney disease. *J Vet Med Sci* 2014; 76(1):45–50. doi: 10.1292/jvms.13-0314.
54. Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. *World J Nephrol* 2015; 4(1):74–82. doi: 10.5527/wjn.v4.i1.74.
55. Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney international* 2008; 74(12):1610–6. doi: 10.1038/ki.2008.497.
56. Soler MJ, Wysocki J, Batlle D. ACE2 alterations in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(11):2687–97. doi: 10.1093/ndt/gft320.
57. Koitka A, Cooper ME, Thomas MC, Tikellis C. Angiotensin converting enzyme 2 in the kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35(4):420–5. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.04889.x.

58. Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J et al. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2010; 59(2):529–38. doi: 10.2337/db09-1218.
59. Roca-Ho H, Palau V, Gimeno J, Pascual J, Soler MJ, Riera M. Angiotensin-converting enzyme 2 influences pancreatic and renal function in diabetic mice. *Lab Invest* 2020; 100(9):1169–83. doi: 10.1038/s41374-020-0440-5.
60. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *The American Journal of Pathology* 2007; 171(2):438–51. doi: 10.2353/ajpath.2007.060977.
61. Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, Da Silveira KD, da Silva DA, Santos SHS et al. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney international* 2009; 75(11):1184–93. doi: 10.1038/ki.2009.61.
62. Warner FJ, Rajapaksha H, Shackel N, Herath CB. ACE2: from protection of liver disease to propagation of COVID-19. *Clin Sci (Lond)* 2020; 134(23):3137–58. doi: 10.1042/CS20201268.
63. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI et al. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut* 2005; 54(12):1790–6. doi: 10.1136/gut.2004.062398.
64. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123(5):1667–76. doi: 10.1053/gast.2002.36561.
65. Herath CB, Warner FJ, Lubel JS, Dean RG, Jia Z, Lew RA et al. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *Journal of Hepatology* 2007; 47(3):387–95. doi: 10.1016/j.jhep.2007.03.008.
66. Grace JA, Herath CB, Mak KY, Burrell LM, Angus PW. Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. *Clinical Science* 2012; 123(4):225–39. Verfügbar unter:

- [https://portlandpress.com/clinsci/article/123/4/225/69083/Update-on-new-aspects-of-the-renin-angiotensin.](https://portlandpress.com/clinsci/article/123/4/225/69083/Update-on-new-aspects-of-the-renin-angiotensin)
67. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2003; 112(9):1383–94.
Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597764/>.
68. Bataller R, Gäbele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R et al. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2005; 41(5):1046–55. doi: 10.1002/hep.20665.
69. Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig M, Garcia–Ramallo E, Gasull X et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118(6):1149–56. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10833490/>.
70. Cai S-M, Yang R-Q, Li Y, Ning Z-W, Zhang L-L, Zhou G-S et al. Angiotensin-(1-7) Improves Liver Fibrosis by Regulating the NLRP3 Inflammasome via Redox Balance Modulation. *Antioxidants & redox signaling* 2016; 24(14):795–812.
Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26728324/>.
71. Mak KY, Chin R, Cunningham SC, Habib MR, Torresi J, Sharland AF et al. ACE2 Therapy Using Adeno-associated Viral Vector Inhibits Liver Fibrosis in Mice. *Molecular Therapy* 2015; 23(9):1434–43. Verfügbar unter:
[https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(16\)30271-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1525001616302714%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(16)30271-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1525001616302714%3Fshowall%3Dtrue).
72. Rajapaksha IG, Gunarathne LS, Asadi K, Cunningham SC, Sharland A, Alexander IE et al. Liver-Targeted Angiotensin Converting Enzyme 2 Therapy Inhibits Chronic Biliary Fibrosis in Multiple Drug-Resistant Gene 2-Knockout Mice. *Hepatol Commun* 2019; 3(12):1656–73. doi: 10.1002/hep4.1434.
73. Lubel JS, Herath CB, Tchongue J, Grace J, Jia Z, Spencer K et al. Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat.

- Clinical Science 2009; 117(11):375–86. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19371232/>.
74. Ye G, Qin Y, Lu X, Xu X, Xu S, Wu C et al. The association of renin-angiotensin system genes with the progression of hepatocellular carcinoma. Biochemical and Biophysical Research Communications 2015; 459(1):18–23. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1500248X>.
75. Zhang Q, Lu S, Li T, Yu L, Zhang Y, Zeng H et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway. Journal of experimental & clinical cancer research : CR 2019; 38(1):173. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31023337/>.
76. Qian Y-R, Guo Y, Wan H-Y, Fan L, Feng Y, Ni L et al. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates the metastasis of non-small cell lung cancer through inhibition of epithelial-mesenchymal transition. Oncology Reports 2013; 29(6):2408–14. Verfügbar unter: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2370>.
77. Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1. The Prostate 2013; 73(1):60–70. Verfügbar unter:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.22540>.
78. Chen R, Wang K, Yu J, Howard D, French L, Chen Z et al. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. Frontiers in neurology 2020; 11:573095. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33551947/>.
79. Jackson L, Eldahshan W, Fagan SC, Ergul A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. IJMS 2018; 19(3):876. doi: 10.3390/ijms19030876.
80. Qiao J, Li W, Bao J, Peng Q, Wen D, Wang J et al. The expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and CD147, and protease TMPRSS2 in human and mouse brain cells and mouse brain tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications 2020; 533(4):867–71. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.042.

81. Dong M, Zhang J, Ma X, Tan J, Chen L, Liu S et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother* 2020; 131:110678. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110678.
82. Hernández VS, Zetter MA, Guerra EC, Hernández-Araiza I, Karuzin N, Hernández-Pérez OR et al. ACE2 expression in rat brain: Implications for COVID-19 associated neurological manifestations. *Experimental Neurology* 2021; 345:113837. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113837.
83. Alenina N, Bader M. ACE2 in Brain Physiology and Pathophysiology: Evidence from Transgenic Animal Models. *Neurochem Res* 2019; 44(6):1323–9. doi: 10.1007/s11064-018-2679-4.
84. Zheng J-L, Li G-Z, Chen S-Z, Wang J-J, Olson JE, Xia H-J et al. Angiotensin converting enzyme 2/Ang-(1-7)/mas axis protects brain from ischemic injury with a tendency of age-dependence. *CNS Neurosci Ther* 2014; 20(5):452–9. doi: 10.1111/cns.12233.
85. Sriramula S, Xia H, Xu P, Lazartigues E. Brain-targeted angiotensin-converting enzyme 2 overexpression attenuates neurogenic hypertension by inhibiting cyclooxygenase-mediated inflammation. *Hypertension* 2015; 65(3):577–86. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04691.
86. Chen J, Zhao Y, Chen S, Wang J, Xiao X, Ma X et al. Neuronal over-expression of ACE2 protects brain from ischemia-induced damage. *Neuropharmacology* 2014; 79:550–8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.004.
87. Lazarini TLN, Raslan ACS, Fontes WRP, Oliveira ML de, Bader M, Alenina N et al. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory* 2012; 97(1):113–23. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22067210/>.
88. Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C et al. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(19):11867–73. doi: 10.1074/jbc.273.19.11867.

89. Walther T, Voigt J-P, Fink H, Bader M. Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behavioural Brain Research* 2000; 107(1-2):105–9. doi: 10.1016/S0166-4328(99)00115-1.
90. Wang X-L, Iwanami J, Min L-J, Tsukuda K, Nakaoka H, Bai H-Y et al. Deficiency of angiotensin-converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function. *NPJ aging and mechanisms of disease* 2016; 2:16024. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721275/>.
91. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579(7798):270–3. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
92. Sawa Y, Ibaragi S, Okui T, Yamashita J, Ikebe T, Harada H. Expression of SARS-CoV-2 entry factors in human oral tissue. *J Anat* 2021; 238(6):1341–54. doi: 10.1111/joa.13391.
93. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J* 2020; 39(10):e105114. doi: 10.15252/embj.20105114.
94. Jia H. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock* 2016; 46(3):239–48. Verfügbar unter: https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2016/09000/Pulmonary_Angiotensin_Converting_Enzyme_2__ACE2_.3.aspx.
95. Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, Howell DC, Bottoms SE, Unger T et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2004; 286(1):L156–64. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12754187/>.
96. Liu J, Zhang P-S, Yu Q, Liu L, Yang Y, Guo F-M et al. Losartan inhibits conventional dendritic cell maturation and Th1 and Th17 polarization responses: Novel mechanisms of preventive effects on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International journal of molecular medicine* 2012; 29(2):269–76. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22020765/>.

97. Gu H, Xie Z, Li T, Zhang S, Lai C, Zhu P et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits lung injury induced by respiratory syncytial virus. *Sci Rep* 2016; 6(1):19840. doi: 10.1038/srep19840.
98. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(8):1065–72. doi: 10.1164/rccm.200912-1840OC.
99. Rey-Parra GJ, Vadivel A, Coltan L, Hall A, Eaton F, Schuster M et al. Angiotensin converting enzyme 2 abrogates bleomycin-induced lung injury. *J Mol Med* 2012; 90(6):637–47. doi: 10.1007/s00109-012-0859-2.
100. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005; 436(7047):112–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16001071/>.
101. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003; 426(6965):450–4. doi: 10.1038/nature02145.
102. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2020; 117(21):11727–34. doi: 10.1073/pnas.2003138117.
103. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, van Lam van T, Pilgram O, Moulton H et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance* 2020; 3(9). doi: 10.26508/lsa.202000786.
104. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care* 2020; 24(1):422. doi: 10.1186/s13054-020-03120-0.
105. Li G, He X, Zhang L, Ran Q, Wang J, Xiong A et al. Assessing ACE2 expression patterns in lung tissues in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Autoimmunity* 2020; 112:102463. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102463.

106. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO et al. Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *Journal of virology* 2010; 84(2):1198–205. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864379/>.
107. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T et al. Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105(22):7809–14. doi: 10.1073/pnas.0711241105.
108. Ashraf UM, Abokor AA, Edwards JM, Waigi EW, Royfman RS, Hasan SA-M et al. SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiological Genomics* 2021; 53(2):51–60. doi: 10.1152/physiolgenomics.00087.2020.
109. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M et al. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* 2020; 198(6):867–77. doi: 10.1007/s00408-020-00408-4.
110. Zhang S, Liu Y, Wang X, Yang L, Li H, Wang Y et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol* 2020; 13(1):120. doi: 10.1186/s13045-020-00954-7.
111. Liu J, Li Y, Liu Q, Yao Q, Wang X, Zhang H et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discov* 2021; 7(1):17. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41421-021-00249-2>.
112. Hassler L, Reyes F, Sparks M, Welling P, Batlle D. Evidence For and Against Direct Kidney Infection by SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2021. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34127485/>.
113. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, Franz J, Thomas C, Mothes R et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 2021; 24(2):168–75. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41593-020-00758-5>.

114. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383(6):590–2. doi: 10.1056/NEJMc2011400.
115. Golden JW, Cline CR, Zeng X, Garrison AR, Carey BD, Mucker EM et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight* 2020; 5(19). doi: 10.1172/jci.insight.142032.
116. Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shan C, Zhou Y-W, Shen X-R et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell* 2020; 182(1):50-58.e8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32516571/>.
117. Song E, Zhang C, Israelow B, Lu-Culligan A, Prado AV, Skriabine S et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med* 2021; 218(3). doi: 10.1084/jem.20202135.
118. Jia T, Olauson H, Lindberg K, Amin R, Edvardsson K, Lindholm B et al. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol* 2013; 14(1):116. doi: 10.1186/1471-2369-14-116.
119. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international* 2009; 75(11):1145–52. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19340094/>.
120. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987; 162(1):156–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2440339/>.
121. Walker JM. Basic Protein and Peptide Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 1994. (Methods in Molecular Biology™; Bd. 32).
122. Bio-Rad Laboratories GmbH Deutschland. ECL western blotting substrates for horseradish peroxidase (HRP) detection. | Enhanced Luminol | Life Science Research | Bio-Rad; 2021 [Stand: 31.08.2021]. Verfügbar unter: <https://www.bio-rad.com/featured/en/ecl-western-blotting-substrates.html>.
123. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH et al. Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that

- regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* 2013; 19(12):1617–24. doi: 10.1038/nm.3282.
124. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batlle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(11):3067–75. doi: 10.1681/ASN.2006050423.
125. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss H-P et al. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* 2005; 26(7):1270–7. doi: 10.1016/j.peptides.2005.01.009.
126. Sun S-H, Chen Q, Gu H-J, Yang G, Wang Y-X, Huang X-Y et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host & Microbe* 2020; 28(1):124-133.e4. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312820303024>.
127. Suresh V, Parida D, Minz AP, Sethi M, Sahoo BS, Senapati S. Tissue Distribution of ACE2 Protein in Syrian Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) and Its Possible Implications in SARS-CoV-2 Related Studies. *Front. Pharmacol.* 2020; 11:579330. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.579330/full>.
128. Li M-Y, Li L, Zhang Y, Wang X-S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty* 2020; 9(1):45. doi: 10.1186/s40249-020-00662-x.
129. Gabarre P, Dumas G, Dupont T, Darmon M, Azoulay E, Zafrani L. Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive care medicine* 2020; 46(7):1339–48. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32533197/>.
130. Ronco C, Reis T, Husain-Syed F. Management of acute kidney injury in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med* 2020; 8(7):738–42. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30229-0.
131. Smyk W, Janik MK, Portincasa P, Milkiewicz P, Lammert F, Krawczyk M. COVID-19: Focus on the lungs but do not forget the gastrointestinal tract. *Eur J Clin Invest* 2020; 50(9):e13276. doi: 10.1111/eci.13276.

132. M. de Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, Th. Unger. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3):415–72. Verfügbar unter:
<https://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/3/415>.
133. Bártová E, Legartová S, Krejčí J, Arcidiacono OA. Cell differentiation and aging accompanied by depletion of the ACE2 protein. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(22):22495–508. doi: 10.18632/aging.202221.
134. Wang W, Lv S, Gan W, Zeng Z, Yang M. A bioinformatics analysis on the potential role of ACE2 in cardiac impairment of patients with coronavirus disease 2019. *Annals of Translational Medicine* 2020; 8(21):1403. Verfügbar unter:
<https://atm.amegroups.com/article/view/53760/html>.
135. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(6):H2373-9. doi: 10.1152/ajpheart.00426.2008.
136. Booeshaghi AS, Pachter L. Decrease in ACE2 mRNA expression in aged mouse lung; 2020 [Stand: 07.12.2021]. Verfügbar unter:
<https://authors.library.caltech.edu/102345/1/2020.04.02.021451v1.full.pdf>.
137. Soni S, Jiang Y, Tesfaigzi Y, Hornick JL, Çataltepe S. Comparative analysis of ACE2 protein expression in rodent, non-human primate, and human respiratory tract at baseline and after injury: A conundrum for COVID-19 pathogenesis. *PLoS One* 2021; 16(2):e0247510. doi: 10.1371/journal.pone.0247510.
138. Bao W, Zhang X, Jin Y, Hao H, Yang F, Yin D et al. Factors Associated with the Expression of ACE2 in Human Lung Tissue: Pathological Evidence from Patients with Normal FEV1 and FEV1/FVC. *JIR* 2021; 14:1677–87. Verfügbar unter: <https://www.dovepress.com/factors-associated-with-the-expression-of-ace2-in-human-lung-tissue-pa-peer-reviewed-fulltext-article-JIR>.
139. Osterreicher CH, Taura K, Minicis S de, Seki E, Penz-Osterreicher M, Kodama Y et al. Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2009; 50(3):929–38. Verfügbar unter:
<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23104>.

140. Mao Y, Xu B, Guan W, Xu D, Li F, Ren R et al. The Adrenal Cortex, an Underestimated Site of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Endocrinol.* 2020; 11:593179. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.593179/full>.
141. Belloni AS, Andreis PG, Macchi V, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Distribution and functional significance of angiotensin-II AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr Res* 1998; 24(1):1–15. doi: 10.3109/07435809809031865.
142. Zinslerling VA, Semenova NY, Markov AG, Rybalchenko OV, Wang J, Rodionov RN et al. Inflammatory Cell Infiltration of Adrenals in COVID-19. *Horm Metab Res* 2020; 52(9):639–41. doi: 10.1055/a-1191-8094.
143. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003; 41(3):392–7. doi: 10.1161/01.HYP.0000060689.38912.CB.
144. Kamilic J, Hamming I, Kreutz R, Bolbrinker J, Siems W-E, Nassar I et al. Renal ACE2 expression and activity is unaltered during established hypertension in adult SHRSP and TGR(mREN2)27. *Hypertens Res* 2010; 33(2):123–8. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/hr2009191>.
145. Ni J, Yang F, Huang X-R, Meng J, Chen J, Bader M et al. Dual deficiency of angiotensin-converting enzyme-2 and Mas receptor enhances angiotensin II-induced hypertension and hypertensive nephropathy. *J Cell Mol Med* 2020; 24(22):13093–103. doi: 10.1111/jcmm.15914.
146. Botelho-Santos GA, Bader M, Alenina N, Santos RAS. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2012; 6(5):201–11. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045193/>.
147. Tsukamoto S, Wakui H, Azushima K, Yamaji T, Urate S, Suzuki T et al. Tissue-specific expression of the SARS-CoV-2 receptor, angiotensin-converting enzyme 2, in mouse models of chronic kidney disease. *Sci Rep* 2021; 11(1):16843. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-96294-8>.

148. Le Y, Zheng Z, Xue J, Cheng M, Guan M, Xue Y. Effects of exendin-4 on the intrarenal renin-angiotensin system and interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction mice: Exendin-4 and unilateral ureteral obstruction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2016; 17(4). doi: 10.1177/1470320316677918.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über den kanonischen (links) und den nicht-kanonischen (rechts) RAAS-Pathway.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Angiotensin Converting Enzyme 2 und den teilhomologen Proteinen ACE und Collectrin.....	10
Abbildung 3: Darstellung verschiedener Signalwege der Rezeptoren des kanonischen und nicht-kanonischen RAAS.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der immunologischen Detektion eines Zielproteins im Western Blot.....	37
Abbildung 5: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in diversen Organen der Maus.....	41
Abbildung 6: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des kanonischen RAAS in diversen Organen der Maus.....	42
Abbildung 7: Proteinexpression der Enzyme ACE2 und ACE in diversen Organen der Maus.....	44
Abbildung 8: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit Cx43-mRNA (A) und Mas-1-mRNA (B) in murinem Herzgewebe.	46
Abbildung 9: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit Cx43-mRNA (A) und Mas-1-mRNA (B) in murinem Herzgewebe.	47
Abbildung 10: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2- mit ACE-mRNA in murinem Herzgewebe.	48
Abbildung 11: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit α sma (A), Mas-1 (B) und ACE (C) in murinem Lungengewebe.	49
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lungengewebe.....	50
Abbildung 13: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (A) von ACE2 mit PDGFR β (A) und ACE (B) in murinem Lebergewebe.	51
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 mit PDGFR β (A) und ACE (B) in murinem Lebergewebe.	52
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lebergewebe.....	52
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Lebergewebe.....	54

Abbildung 17: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 (A) mit Mas-1 (B), AT2 (C) und ACE (D) in murinem Nebennierengewebe.....	55
Abbildung 18: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit AT2 (A) und ACE (B) in murinem Nebennierengewebe.....	56
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und PDGFR β in murinem Nebennierengewebe.	56
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 und ACE in murinem Nebennierengewebe.	57
Abbildung 21: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2 mit Cx26 (A, B) in murinem Nierengewebe.....	58
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von ACE2 (A,B) mit asma (C) in murinem Nierengewebe.	59
Abbildung 23: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Mas-1-mRNA mit ACE2-mRNA in murinem Nierengewebe.....	61
Abbildung 24: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Mas-1-mRNA mit asma (A) und PDGFR β (B) in murinem Nierengewebe.	62
Abbildung 25: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE mit ACE2 (A), Nephrin (B) und asma (C) in murinem Nierengewebe.	63
Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von ACE und ACE2 in murinem Nierengewebe.	64
Abbildung 27: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des nicht-kanonischen RAAS in basalen, Adenin- und UUO-Nieren der Maus.....	65
Abbildung 28: mRNA-Abundanz wesentlicher Komponenten des kanonischen RAAS in basalen, Adenin- und UUO-Nieren der Maus.	66
Abbildung 29: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.	67
Abbildung 30: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit Mas-1-mRNA in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.....	68
Abbildung 31: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit ACE-mRNA in murinem Nierengewebe bei Adenin-induzierter Nephropathie.	68
Abbildung 32: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx-26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei UUO.....	69
Abbildung 33: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA mit Mas-1-mRNA in murinem Nierengewebe bei UUO.	70

Abbildung 34: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von AT2-mRNA in murinem Nierengewebe bei UUO.....	70
Abbildung 35: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von ACE2-mRNA (A) mit Cx-26-mRNA (B) in murinem Nierengewebe bei UUO.....	71
Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Lebersinusoids.....	77
Abbildung 37: Schematische Darstellung eines Nephrons	79
Abbildung 38: Schematische Darstellung der ACE2- (links) und Mas-1-Expression (rechts) entlang des murinen Nephrons.	80

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Die Kenntnis der Abkürzungen chemischer Elementsymbole und Verbindungen, der SI-Einheiten, sowie gängiger in den Naturwissenschaften und der Medizin gebrauchter Begriffsabkürzungen wird als bekannt vorausgesetzt.

asma	Alpha smooth muscle actin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
ADAM17	A Disintegrin and Metalloprotease 17
Ang	Angiotensin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Arg	Arginin
as	Antisense
Asp	Aspartat
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 2
B0AT1	Natriumabhängiger Aminosäuretransporter
BCA	Bicinchoninsäure
BK	Bradykinin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
Covid-19	Coronavirus Disease 2019
Cx26	Connexin 26
Cx43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEABK	des-Arg(9)-Bradykinin
dT	Distaler Tubulus
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ENaC	Epithelialer Natriumkanal

EZ	extrazellulär
EZM	Extrazelluläre Matrix
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
His	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
IF	Immunfluorszenzfärbung
Ile	Isoleucin
IZ	intrazellulär
kDa	Kilodalton
LDEABK	Lys-[des-Arg(9)]-Bradykinin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Mas/Mas-1	Mas-1-Rezeptor
MrgD/MRGD	Mas-related G-protein-coupled receptor
NO	Stickstoffmonoxid
Nox2	NADPH-Oxidase 2
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline - Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR β	Platelet derived growth factor receptor beta
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pro	Prolin
pT	Proximaler Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rpm	Rotations per minute
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Raumtemperatur
RT q-PCR/q-PCR	Real-Time quantitative PCR
s	Sense
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine Subtype 2
TRIS/Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
Val	Valin

Die vorliegende Dissertation wurde angeregt und überwacht von Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner.

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)

(Unterschrift)