

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE  
PROFESSOR DR. MED. ARMIN KURTZ  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**REGULATION DER RENINFREISETZUNG  
DURCH DEN BLUTDRUCK:**

**ROLLE VON ADENOSIN**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Florian Segerer

unter Anleitung von  
Professor Dr. med. Frank Schweda

2010



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE  
PROFESSOR DR. MED. ARMIN KURTZ  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**REGULATION DER RENINFREISETZUNG  
DURCH DEN BLUTDRUCK:**

**ROLLE VON ADENOSIN**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Florian Segerer

unter Anleitung von  
Professor Dr. med. Frank Schweda

2010

**Dekan:.....Prof. Dr. Bernhard Weber**  
**1. Berichterstatter ..... Prof. Dr. Frank Schweda**  
**2. Berichterstatter ..... Prof. Dr. Andreas Luchner**  
**Tag der mündlichen Prüfung..... 19. Oktober 2010**

<b>A. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>B. Physiologische Grundlagen.....</b>	<b>8</b>
B.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System.....	8
B.1.1 Funktionsweise .....	9
B.1.2 Physiologische Bedeutung.....	10
B.1.3 Regulation der Reninfreisetzung .....	12
B.2 Adenosin.....	15
B.2.1 Metabolismus und Rezeptoren .....	15
B.2.2 Adenosin in der Niere.....	17
<b>C. Fragestellung.....</b>	<b>17</b>
<b>D. Vorbefunde an der isoliert perfundierten Mausniere .....</b>	<b>19</b>
<b>E. Methoden .....</b>	<b>22</b>
E.1 Versuchstiere .....	22
E.1.1 Art Herkunft und Haltung.....	22
E.1.2 Genotypisierung.....	22
E.2 Blutdruckmessung .....	23
E.2.1 Nicht invasiv .....	23
E.2.2 Invasiv.....	24
E.3 Bestimmung der Plasmareninaktivität .....	24
E.3.1 Blutabnahme .....	24
E.3.2 Messung der Plasmareninaktivität .....	24
E.4 Quantitative RNA-Messung .....	25
E.4.1 RNA-Isolierung .....	25
E.4.2 Reverse Transkription.....	25
E.4.3 Quantitative Vermessung.....	26
E.5 Organentnahme .....	26
E.6 Experimentelle Blutdrucksteigerung .....	26
E.7 Statistische Methoden .....	28
<b>F. Versuchsdurchführung .....</b>	<b>28</b>
F.1 Experiment zum Kurzzeiteffekt .....	28
F.1.1 Blutdruckanstieg .....	28
F.1.2 Vorbereitung und Durchführung des Versuchs .....	30
F.2 Experimente zum Langzeiteffekt .....	31
F.2.1 Medikamentöse Blutdrucksteigerung .....	31
F.2.2 Experimentelle Nierenarterienstenose .....	31
<b>G. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
G.1 Blutdruckanstieg:.....	32
G.2 Kurzfristige Blutdruckstimulierung: .....	34
G.3 Längerfristige Blutdruckstimulierung: .....	36
G.3.1 Medikamentöse Blutdrucksteigerung.....	36
G.3.2 Experimentelle Nierenarterienstenose.....	38
<b>H. Diskussion .....</b>	<b>40</b>
<b>Anhang:.....</b>	<b>45</b>
Verwendete Medikamente und Hilfsmittel .....	45
Standardmethoden .....	47
Isolation von DNA aus Gewebe.....	47
DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion .....	48
Bestimmung der Plasmareninkonzentration mittels RIA .....	48
RNA-Isolation aus Nieren .....	49
Reverse Transkription.....	50
Quantitative Vermessung von cDNA mittels Light-Cycler .....	51

<b>Literaturnachweis:</b> .....	<b>52</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>59</b>
<b>Danksagung:</b> .....	<b>60</b>

## A. Einleitung

Der Blutdruck ist für Aufrechterhaltung der Organfunktion von entscheidender Bedeutung. Entsprechend reguliert der Organismus den Blutdruck in engen Grenzen. Kommt es zu einer Störung dieser Regulation, sei es nach oben oder nach unten, so kann das zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Ein zu starkes Abfallen des Blutdrucks, beispielsweise durch massiven Flüssigkeitsverlust, führt zu Unwohlsein, Schwindel bis hin zum hypovolämischen Schock mit Gewebischämien, Organversagen und schließlich zum Tod. Ein zu starkes Ansteigen des Blutdrucks kann zu Überlastungserscheinungen des Herz- Kreislaufsystems mit vielfältigen Folgeschäden führen. Die American Heart Association fasst die Risiken erhöhten Blutdrucks folgendermaßen zusammen: „Unkontrollierter hoher Blutdruck kann zu Schlaganfall, Herzinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz führen. Deshalb wird hoher Blutdruck oft „silent killer“ genannt.“

Im Organismus erfolgt die Regulation des Blutdrucks kurz- und langfristig auf mehreren Ebenen. Zentrale Bedeutung kommen dabei dem intravasalen Flüssigkeitsvolumen, gesteuert durch Flüssigkeitsaufnahme und –ausscheidung, der Herzleistung, sowie dem durch den Gefäßtonus regulierten Verteilungsvolumen des Blutes zu.

Im Februar 1933 veröffentlichte John Loesch im „Zentralblatt für innere Medizin“ den Artikel „Ein Beitrag zur experimentellen Nephritis und zum arteriellen Hochdruck“, in dem er die These vertrat, dass eine renale Ischämie zu einer persistierenden Hypertension führe<sup>39</sup>.

Ebendies veröffentlichte ein Jahr später Harry Goldblatt in seinem wesentlich bekannteren Artikel „The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure“ im „Journal of Experimental Medicine“<sup>33</sup>. Er hatte an Hunden gezeigt, dass durch eine Stenose der Nierenarterien ein dauerhafter Bluthochdruck induziert wird. Er war der Meinung, dass sich dieser Mechanismus auf den Menschen übertragen ließe, nämlich, dass entweder die Stenose einer Hauptnierenarterie, oder aber organische Veränderungen in den kleineren renalen Arterien bis hin zu glomerulären afferenten Arteriolen zu einem Hypertonus führe. Goldmann war sich bewusst, dass zwischen dem Trigger der renalen Ischämie und dem Effekt der Hypertonie ein Bindeglied fehlte, und forderte dafür einen humoralen Mechanismus. Tigersted und Bergmann hatten bereits 1898 publiziert, dass sie ein renales Hormon mit

blutdrucksteigernden Eigenschaften gefunden hatten, welches sie Renin nannten<sup>34</sup>. Inzwischen ist die Annahme gut belegt, dass renale Minderdurchblutung über das Bindeglied Renin zu einem systemischen Bluthochdruck führt, nämlich der renalen Hypertonie,.

Mittlerweile ist bekannt, dass nicht das Renin selbst eine Hypertonie induziert, sondern dass es eine enzymatische Kaskade in Gang setzt, an deren Ende das Peptid Angiotensin II steht. Angiotensin II hat eine ausgeprägte blutdrucksteigernde Wirkung. Die große Bedeutung dieser sogenannten Renin-Angiotensin-Kaskade für die Entwicklung anderer Hypertonieformen wird daran deutlich, dass Medikamente, die die Bildung von Angiotensin II hemmen (ACE-Hemmer) oder seine Rezeptoren blockieren (AT1-Antagonisten), zu den wirksamsten antihypertensiven Medikamenten gehören. Mittlerweile hat auch ein Reninantagonist, der die enzymatische Aktivität von Renin hemmt, Einzug in die Therapie der Hypertonie gefunden.

Obwohl das Renin-Angiotensin-System, entsprechend seiner großen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung, ausgiebig untersucht wurde und insbesondere auch die Regulation der Reninfreisetzung durch den renalen Blutdruck Gegenstand zahlreicher Studien war, sind die Signalwege zwischen der Freisetzung von Renin und der Steuerung des Blutdrucks bis heute nicht hinreichend verstanden.

In der vorliegenden Arbeit soll, basierend auf zahlreichen Vorbefunden, die Frage geklärt werden, ob Adenosin und der A1 Adenosin Rezeptor an der blutdruckabhängigen Regulation des Reninsystems beteiligt sind.

## **B. Physiologische Grundlagen**

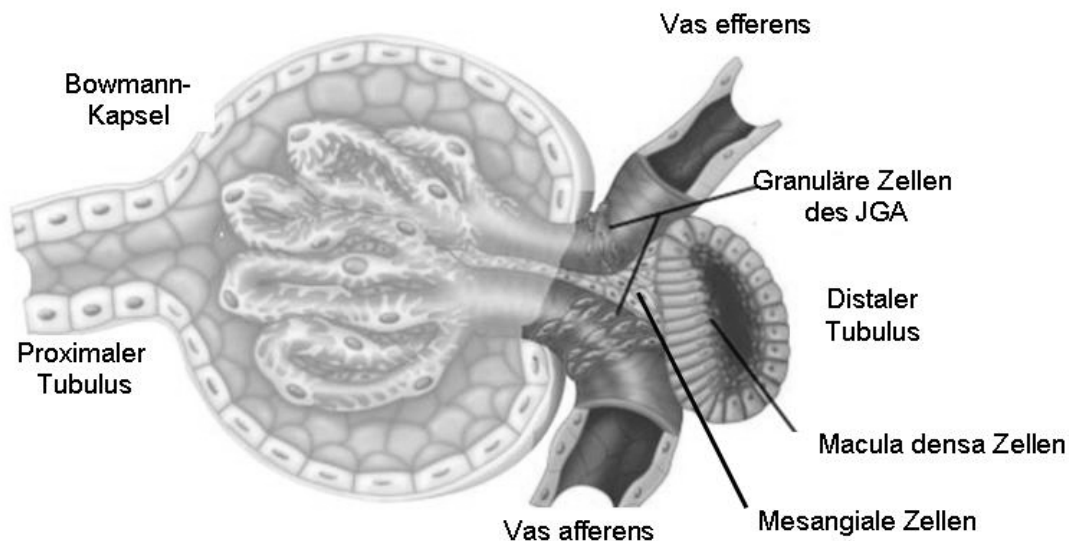
### **B.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle des arteriellen Blutdrucks. Eine Stimulation des RAAS führt zu einer Steigerung, eine Hemmung zu einer Senkung des Blutdrucks.

Renin wird in den reninbildenden juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) der Niere gebildet. Diese sind in der Wand des blutzuführenden Vas afferents des Glomerulus



lokalisiert. Die JG-Zellen treten in engen Kontakt zu Zellen des distalen Tubulus, den Macula densa-Zellen.

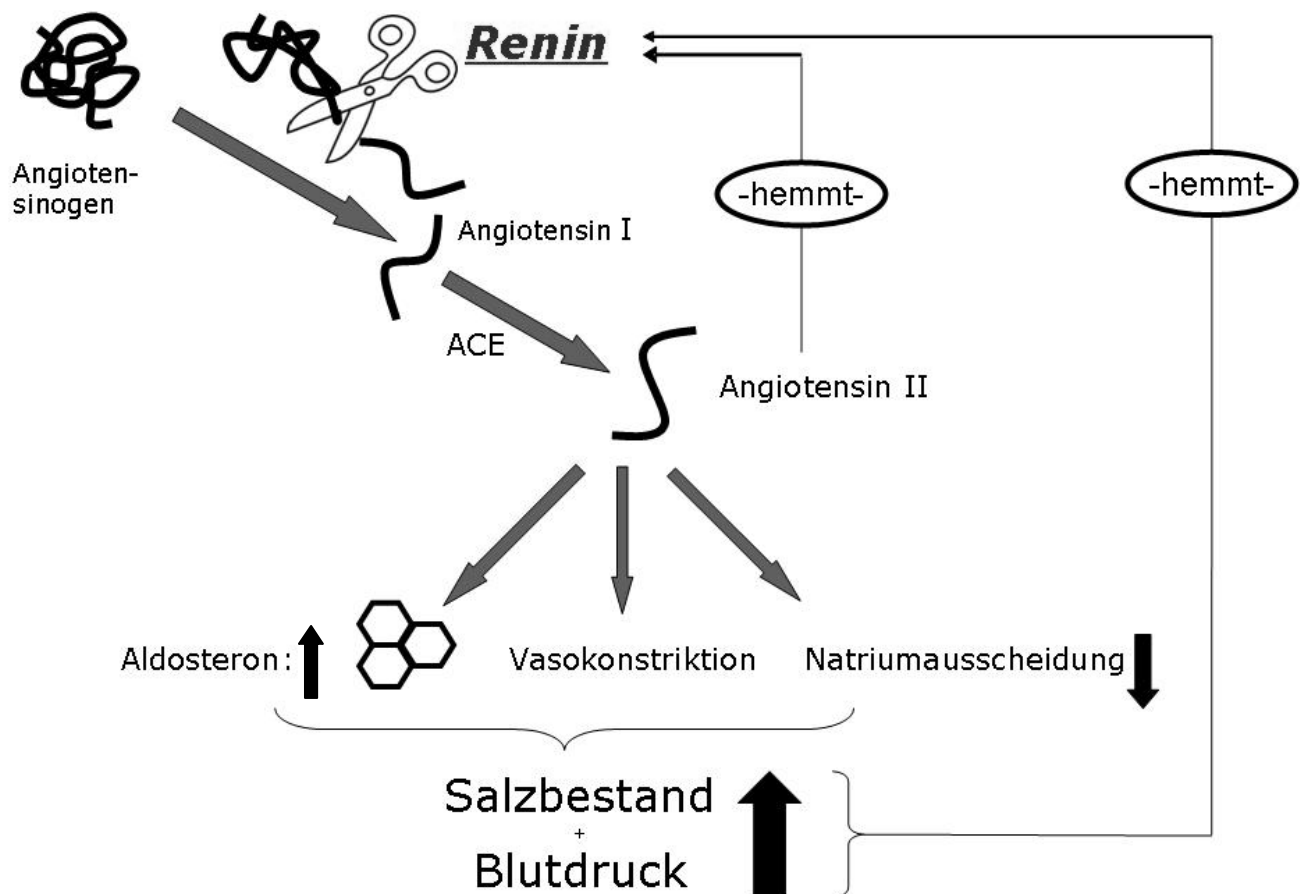


Graphik B.1 juxtaglomerulärer Apparat

### **B.1.1 Funktionsweise**

Das RAAS umfasst eine Reihe von Proenzymen, Enzymen und Hormonen, nämlich Renin, das Angiotensin-converting-enzyme (ACE), Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II und Aldosteron.

Renin ist eine Aspartylprotease mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten. Es wird in der Niere im juxtaglomerulären Apparat gebildet und von den Zellen des Vas afferents in die Blutbahn sezerniert. Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten Precursor-Peptid Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab; dieses wird wiederum von der Dipeptidyl-Carboxypeptidase „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Der größte Teil des ACE befindet sich in Endothelzellen der Lunge, so dass besonders während der Passage durch die Lunge, jedoch auch durch viele andere Gewebe, die Umwandlung von im Blut zirkulierenden Angiotensin I in Angiotensin II stattfindet. Angiotensin II besitzt eine Halbwertszeit von 1-2 Minuten.



Graphik B.1.1 Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems, (Funktionen von Angiotensin II und Aldosteron s. Tabelle B.1.2)

### **B.1.2 Physiologische Bedeutung**

Wie oben gezeigt steht am Ende der Renin-Angiotensin-Kaskade das Angiotensin II, der eigentliche biologische Effektor des Systems. Angiotensin II besitzt eine Vielzahl physiologisch und pathophysiologisch bedeutsamer Funktionen. Von zentraler Bedeutung ist seine blutdrucksteigernden Wirkung. Diese hypertensive Wirkung vermittelt Angiotensin II sowohl über direkte als auch indirekte Effekte. Zum einen ist Angiotensin II ein potenter Vasokonstriktor, erhöht daher direkt den vaskulären Gefäßwiderstand und damit den Blutdruck<sup>1</sup>. Darüber hinaus stimuliert Angiotensin II die Kochsalzrückresorption in der Niere. Hierbei spielen wiederum direkte und indirekte Mechanismen eine Rolle. Direkt erhöht Angiotensin II rezeptorvermittelt unter anderem die Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers  $\text{NHE}_3$  des proximalen Tubulus und damit die Natrium-Rückresorption<sup>1</sup>. Außerdem steigert Angiotensin II die Aldosteronsekretion aus dem Nebennierenkortex<sup>1</sup>. Dieses

Mineralokortikoid stimuliert im Nierentubulus die Reabsorption von Natrium aus dem Primärharn (sowie aus Speichel, Schweiß und Magensaft), wobei im Austausch Kalium und Protonen in erhöhtem Maße ausgeschieden werden. In Folge des veränderten osmotischen Verhältnisses zwischen Harn und Interstitium folgt der gesteigerten Salzresorption eine erhöhte Wasserretention im Sammelrohr der Nierentubuli. Dies resultiert in einer Zunahme des intravasalen Volumens und damit in einer Blutdrucksteigerung.

Schließlich bewirkt Angiotensin II eine erleichterte Noradrenalinsekretion durch direkte Beeinflussung der postganglionären sympathischen Neuronen<sup>1</sup> und eine Kontraktion mesangialer Zellen mit der Folge einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR)<sup>1</sup>. Im Gehirn wirkt es auf die circumventrikulären Organe und löst eine Erhöhung des Blutdrucks<sup>1</sup>, ein gesteigertes Durstgefühl<sup>1</sup>, sowie eine vermehrte ADH/Vasopressin- und ACTH-Ausschüttung aus<sup>1</sup>.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, mit der Reninaktivität als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt, den Blutdruck erhöht.

Funktionen von Angiotensin II	Funktionen von Aldosteron
<p><b>Peripher</b> Vasokonstriktion</p> <p><b>Gehirn</b> Blutdruckstimulation Durstgefühl ACTH-Freisetzung ADH-Freisetzung</p> <p><b>Sympathikus</b> erleichterte Noradrenalinfreisetzung</p> <p><b>Niere</b> verminderte glomeruläre Filtration</p> <p><b>Nebenniere</b> Aldosteronfreisetzung</p>	<p><b>Niere</b> erhöhte Natrium-Retention Kalium- und Protonendiurese</p> <p><b>Schweiß, Speichel, Magensäure</b> verminderte Natriumausscheidung</p> <p><b>Muskeln, Gehirn</b> Kalium-Einstrom</p>

Tabelle B.1.2 Funktionen von Angiotensin II und Aldosteron, nach William F. Ganong<sup>1</sup>

Neben Angiotensin II, welches sicher den bedeutsamsten biologischen Effektor des RAAS darstellt, gibt es weitere aktive Peptide, die als Degradationsprodukte von Angiotensin I oder Angiotensin II entstehen. Ein Degradationsprodukt von Angiotensin II ist Angiotensin III, das noch die volle Aldosteron-stimulierende

Wirkung, jedoch verminderte zentrale Effekte zeigt<sup>1</sup>. Renin kann über die Bindung an den Renin/Proreninrezeptor auch unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität biologische Effekte ausüben<sup>40, 41</sup>. Neben dem oben skizzierten Renin-Angiotensin-System existieren auch lokale Gewebs-Renin-Angiotensin-Systeme, die Angiotensin II produzieren und in der Niere, in Blutgefäßen, Uterus, Plazenta, den Augen, dem Herz und anderen Organen vorkommen und bei verschiedenen physiologischen und vor allem pathophysiologischen Prozessen wirksam werden können<sup>42, 43</sup>. Der Beitrag dieser lokalen Systeme zur Plasmapreninaktivität ist jedoch sehr gering, so dass sie nach bilateraler Nephrektomie auf nicht messbare Werte abfällt<sup>1</sup>.

### **B.1.3 Regulation der Reninfreisetzung**

Die Regulation der Reninkonzentration im Blut findet auf der Ebene der Reninausschüttung in der Niere statt; die Elimination erfolgt durch unspezifische Proteasen. Die Einflussgrößen auf die Sekretion von Renin sind in der Tabelle B.1.3 aufgelistet.

a) Faktoren mit Einfluss auf die Reninsekretion	b) Konditionen mit erhöhter Reninsekretion
<p><b><i>stimulierend</i></b></p> <p>erhöhter Sympathikotonus über renale Nerven</p> <p>erhöhter Katecholaminspiegel</p> <p>Prostaglandine</p> <p><b><i>hemmend</i></b></p> <p>erhöhte Na- und Cl-Reabsorption über die Macula densa</p> <p>erhöhter Druck in der afferenten Arteriole</p> <p>Angiotensin II</p> <p>Vasopressin/ADH</p>	<p>Hyponatriämie</p> <p>Diuretika</p> <p>Hypotension</p> <p>Hämorrhagie</p> <p>Orthostase</p> <p>Dehydration</p> <p>Herzinsuffizienz</p> <p>Cirrhose</p> <p>Stenose der Nierenarterie oder Aorta abdominalis</p> <p>verschiedene psychologische Stimuli</p>

Tabelle B.1.3 Einflussfaktoren auf die Reninsekretion, nach William F.Ganong<sup>1</sup>

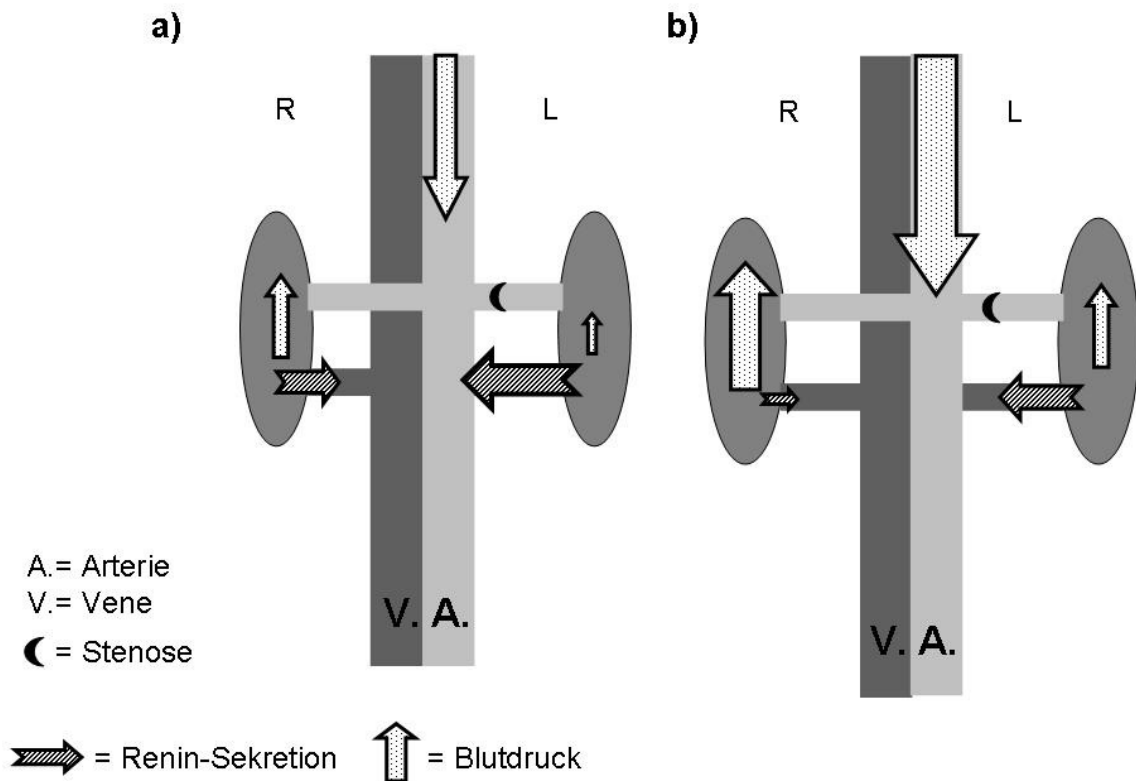
Die Rate der Reninsekretion wird also ständig durch die Summe der verschiedenen Einflussfaktoren bestimmt.

Entsprechend seiner biologischen Potenz wird die Reninfreisetzung durch mehrere negative Feedbackschleifen kontrolliert. So hemmt Angiotensin II, als biologisches Endprodukt der Renin-Angiotensin-Kaskade, die Reninfreisetzung. Auch ein Anstieg des Kochsalzbestandes des Körpers, beispielsweise durch eine vermehrte

Kochsalzaufnahme, hemmt die Bildung und Freisetzung von Renin. Schließlich hemmt, wie schon erwähnt, ein Anstieg des Blutdrucks die Reninfreisetzung. Hierbei wird ein intrarenaler Barorezeptormechanismus postuliert, der bei erhöhtem Druck in der afferenten Arteriole des juxtaglomerulären Apparates (JGA) eine hemmende Wirkung, bei vermindertem Druck eine Stimulation der Reninausschüttung bewirkt<sup>61</sup>.

Für die Kontrolle des Reninsystems durch den Kochsalzbestand des Körpers spielt nach aktuellem Wissensstand die Macula densa im Bereich des distalen Tubulus eine entscheidende Rolle. Die Reninsekretion ist umgekehrt proportional zum NaCl-Gehalt des Harnes in diesem Abschnitt des Tubulus. Eine niedrige NaCl-Konzentration im distalen Tubulus stimuliert also die Reninsekretion, während eine hohe Kochsalzkonzentration die Reninfreisetzung hemmt<sup>1,60</sup>.

Schon 1960 wurde die Hypothese aufgestellt, dass neben dem salzabhängigen Macula densa-Signal ein zweiter, vasculärer Mechanismus existiere, der direkt auf Druckänderungen in der A. renalis reagiere und das Reninsystem blutdruckabhängig reguliere<sup>19, 28</sup>. Inzwischen ist das Phänomen der druckabhängigen Reninsekretion in der Niere funktionell phänomenologisch gut charakterisiert; ein Anstieg des Drucks in den afferenten Arteriolen führt zu einer Verminderung der Reninfreisetzung und umgekehrt. Die Wirkung dieses Mechanismus wird in der Pathophysiologie des Bluthochdrucks bei einseitiger Nierenarterienstenose deutlich (vgl. Graphik 1.2). Durch die Stenose einer Nierenarterie sinkt der Blutdruck in der betroffenen Niere. Dies registriert der Barosensor und stimuliert die Reninfreisetzung, was über die Aktivierung der Renin-Angiotensin-Kaskade zu einer Steigerung des systemischen Blutdrucks führt. Hierdurch steigt auch der Druck in der stenosierten Niere etwas, wodurch die Reninsekretion wieder leicht sinkt. Die kontralaterale Niere dagegen ist einem zu hohen Blutdruck ausgesetzt und reguliert ihre Reninsekretion herunter. So stellt sich ein neues Gleichgewicht ein, bei dem der systemische Blutdruck erhöht bleibt.



Graphik B.1.3 renale oder Goldblatt-Hypertension

a) frische Stenose der linken Nierenarterie, normaler Perfusionsdruck in der Aorta und der rechten Niere, normale Reninsekretion rechts. Der verminderte Perfusionsdruck in der linken Niere führt zu erhöhter Reninsekretion links.

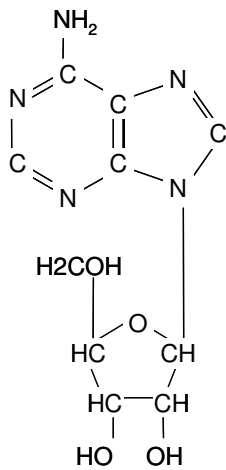
b) neue Gleichgewichtssituation: Erhöhter Druck in der Aorta, nur leicht verminderter Druck distal der Stenose in der linken Niere, leicht erhöhte Reninsekretion links, erhöhter Perfusionsdruck in der rechten Niere, verminderte Reninsekretion rechts

Obwohl dieser renale Barorezeptor-Mechanismus in vielen Untersuchungen und verschiedenen Spezies nachgewiesen wurde, ist bis heute unklar, über welche Signalkaskaden der Blutdruck dabei mit dem Reninsystem verbunden ist.

Zunächst wurde vermutet, dass die Hemmung des Renins bei erhöhtem Blutdruck über eine erhöhte Salzbelastung des Tubulus zustande käme, da in Folge des erhöhten Drucks mehr Primärharn entsteht, und dadurch eine tubuläre Salzüberladung erfolgen könnte. Somit würde die druckabhängige Reninregulation in der Niere auf dem gleichen morphologischen Mechanismus beruhen wie die salzabhängige. Da jedoch die druckabhängige Reninsekretion auch in nominell nicht mehr filtrierenden Hundenieren erhalten blieb, wurde vermutet, dass es tatsächlich einen unabhängigen vaskulären Barorezeptormechanismus zur Kontrolle der

Reninfreisetzung gibt<sup>31, 32</sup>. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass auch bei Blockade des salzabhängigen Macula densa-gesteuerten Mechanismus eine Steuerung der Reninfreisetzung durch den renalen Perfusionsdruck möglich war. Insbesondere bei hohem Perfusionsdruck von 140 mmHg war diese druckabhängige Inhibition einer Stimulation über den Macula densa-Mechanismus überlegen<sup>18</sup>. Noch immer jedoch bleiben sowohl die zelluläre Lokalisation dieses geforderten Barorezeptors, als auch die genauen Signalübertragungswege für die druckabhängige Regulation der Reninfreisetzung unvollständig geklärt.

## **B.2 Adenosin**



Graphik B.2: Strukturformel von Adenosin

### **B.2.1 Metabolismus und Rezeptoren**

Unter normalen Bedingungen wird Adenosin kontinuierlich sowohl intra-, als auch extrazellulär gebildet.

Die intrazelluläre Bildung geschieht entweder mit Hilfe einer intrazellulären 5'-Nukleotidase, die Adenosin-Monophosphat (AMP) dephosphoryliert<sup>51,50</sup>, oder durch Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein<sup>52</sup>.

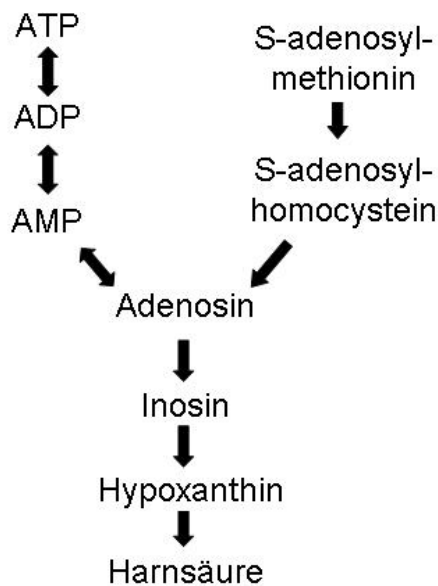
Extrazellulär kann Adenosin durch Dephosphorylierung von Adenosin-Triphosphat (ATP) durch Ecto-ATPasen zu AMP und dessen Spaltung durch das Enzym Ecto-5'-Nucleotidase entstehen<sup>49</sup>.

Die dazu notwendigen Enzyme werden auch im juxtaglomerulären Apparat exprimiert<sup>43</sup>. Dieser Weg der Adenosinbildung wird besonders bei einem Energiedefizit

aktiviert, bei dem ein vermehrter Abbau des energiereichen ATPs stattfindet. In den Macula densa-Zellen wird die ATP-Freisetzung vermutlich durch erhöhte NaCl-Konzentration<sup>45</sup> und Schwellung der Zellen 46-48 stimuliert.

Außerdem kann Adenosin de novo aus der Nukleinbase Adenin und dem Zucker  $\beta$ -D-Ribose synthetisiert werden, wie es in der Zelle zur Bildung von RNA und DNA geschieht.

Die Halbwertszeit von Adenosin im Blut oder Interstitium beträgt nur wenige Sekunden. Der Metabolismus ist in Graphik B.2.1 dargestellt.



Graphik B.2.1 Beziehung zwischen ATP und Adenosin und Metabolismus von Adenosin zu Harnsäure, nach William F. Ganong<sup>1</sup>

Je nach Wirkort und Rezeptorausstattung wirkt Adenosin als Neurotransmitter (Gehirn), Vasodilatator (z.B. Herz) oder hormoneller Faktor, wie beispielsweise in der Niere, wo Adenosin eine parakrine Funktion im tubuloglomerulären Feedback einnimmt<sup>44</sup>. Adenosin wirkt dabei über die vier Rezeptoren A1, A2A, A2B und A3. Alle vier Adenosinrezeptoren sind transmembranäre, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylatcyclaseaktivität und somit die intrazelluläre Bildung von cAMP steuern. Dabei wirken die Rezeptoren A1 und A3 inhibitorisch, die Rezeptoren A2a und A2b stimulatorisch auf die cAMP-Bildung<sup>53</sup>. Das „second messenger“ cAMP ist ein intrazelluläres Signalmolekül, das z.B. den zentralen Stimulator der Reninfreisetzung aus den JG-Zellen darstellt.



## **B.2.2 Adenosin in der Niere**

In der Niere hat Adenosin vielfältige Effekte.

Es ist ein potenter Inhibitor des Reninsystems, ein Effekt, der durch direkte Stimulation der A1-Adenosin-Rezeptor (A1AR) auf den reninproduzierenden Zellen des JGA vermittelt wird<sup>16, 17, 56, 57, 58, 59</sup>. In Experimenten mit Ratten und Hunden konnte ein inhibitorischer Effekt von Adenosin auf die Plasmanreninkonzentration festgestellt werden, der nahe legt, dass Adenosin eine Rolle in der blutdruckabhängigen Reninregulation spielt<sup>16, 22, 23, 36, 37, 54, 55</sup>.

## **C. Fragestellung**

Obwohl die inverse Beziehung zwischen renalem Perfusionsdruck und Reninfreisetzung in vielen Untersuchungen zweifelsfrei nachgewiesen wurde, konnte bis jetzt nicht hinreichend geklärt werden, über welche Steuerungsmechanismen beide Parameter miteinander verbunden sind.

Vorangegangene Studien lassen vermuten, dass entweder die reninproduzierenden Zellen selbst, oder die Macula densa in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck ein Signal auszusenden, das die Renin-Produktion und -Ausschüttung steuert<sup>2-5</sup>. Darüber hinaus legen einige Studien nahe, dass die Cyclooxygenaseprodukte Prostaglandin E2 sowie Prostacyclin eine Rolle bei der Stimulation der Reninsynthese und -freisetzung durch eine Verminderung des renalen Perfusionsdrucks spielen<sup>6-10</sup>. Da jedoch die Blockade der Prostaglandinbildung in anderen Studien keine Auswirkungen auf die blutdruckabhängige Reninregulation zeigte<sup>11-14</sup>, bleibt die Rolle dieser Arachidonsäurederivate im renalen Barorezeptormechanismus unklar.

Neben der Kontrolle der Reninfreisetzung setzen Blutdruckveränderungen weitere Regulationsmechanismen in der Niere in Gang. So wird über einen weiten Druckbereich die Durchblutung und die Filtrationsrate der Niere (glomeruläre Filtrationsrate, GFR) konstant gehalten. Dieser sogenannten renalen Autoregulation liegen mindestens zwei Mechanismen zu Grunde. Zum einen löst ein Druckanstieg direkt an den afferenten Arteriolen eine Vasokonstriktion aus (myogene Komponente), zum anderen führt die initial vermehrte tubuläre Salzbelastung indirekt zur Induktion einer afferenten Vasokonstriktion (tubuläre Komponente)<sup>60, 61</sup>. Grundlage dieser indirekten Komponente ist der sogenannte tubuloglomeruläre Feedback (TGF). Der TGF ist ein spezifischer intrarenaler Kontrollmechanismus für die NaCl-Ausscheidung, der sich im juxtaglomerulären Apparat jedes Nephrons abspielt.

Dabei werden Veränderungen in der Salzkonzentration des tubulären Harnes an der Macula densa registriert und davon abhängig der Gefäßtonus in der afferenten Arteriole verändert. Eine Erhöhung der tubulären Salzkonzentration führt dabei zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriole und damit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und tubulären Salzbelastung. Eine Abnahme der NaCl-Konzentration über der Macula densa bewirkt einen umgekehrten Effekt<sup>61</sup>. Über diesen TGF kann also sehr schnell auf Veränderungen in der tubulären Salzkonzentration, wie sie z.B. bei Veränderungen des Blutdrucks auftreten, reagiert werden<sup>60</sup>. TGF vermittelt also eine sehr effektive kurzfristige salzabhängige Regulation der GFR. Dieser TGF-Mechanismus wird durch genetische Deletion des A1-Adenosinrezeptor (A1AR) oder dessen pharmakologische Blockade komplett aufgehoben. Er ist Adenosin-abhängig<sup>20, 24</sup>.

Wie bereits erwähnt, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Adenosin über den A1AR die Reninsekretion hemmt<sup>16, 22, 23, 36, 37,54,55</sup>. Da die reninbildenden Zellen zudem in unmittelbarer Nachbarschaft zu den glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriole liegen, die den Angriffspunkt von Adenosin im TGF-Mechanismus darstellen, kann man vermuten, dass Adenosin auch bei der blutdruckabhängigen Reninregulation, also einer verminderten Reninsekretion in Folge erhöhten Blutdrucks und umgekehrt, eine wichtige Rolle spielt.

Bei in vitro-Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die im folgenden Absatz detaillierter vorgestellt werden, stellte sich heraus, dass durch pharmakologische Blockade oder genetische Deletion des A1AR der inhibitorische Effekt eines Blutdruckanstiegs auf die Reninsekretion völlig aufgehoben wird.

Nun war Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Rolle Adenosin und der A1-Adenosinrezeptor bei der blutdruckabhängigen Reninregulation in vivo spielt.

## **D. Vorbefunde an der isoliert perfundierten Mausniere**

Der erste Teil der Studie wurde am Modell der isoliert perfundierten Mausniere durchgeführt.

Die Organe wurden homozygoten A1AR-knockout-Mäusen (A1AR<sup>-/-</sup>) und deren Wildtyp-Geschwistern (A1AR<sup>+/+</sup>) beider Geschlechter, oder männlichen C57B1/6 Mäusen (Charles River, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 23 und 30 g entnommen.

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Gabe von 12 mg/kg Xylazin und 80 mg/kg Ketamin-HCl anästhesiert. Die Aorta abdominalis wurde katheterisiert und proximal abgebunden, ebenso die linke Nierenarterie. Die rechte Niere war somit über den Katheter in der Bauchorta perfundiert, wurde entnommen und in eine Kammer mit 37 °C und 100% Luftfeuchtigkeit überführt. Schließlich wurde die Nierenvene kanüliert, um das venöse Blut aufzufangen, aus dem die Reninaktivität und der renale Blutfluss bestimmt wurden.

Über eine Pumpe mit elektronischer Feedback-Kontrolle konnte der Perfusionsdruck stufenweise zwischen 40 und 140 mmHg variiert werden.

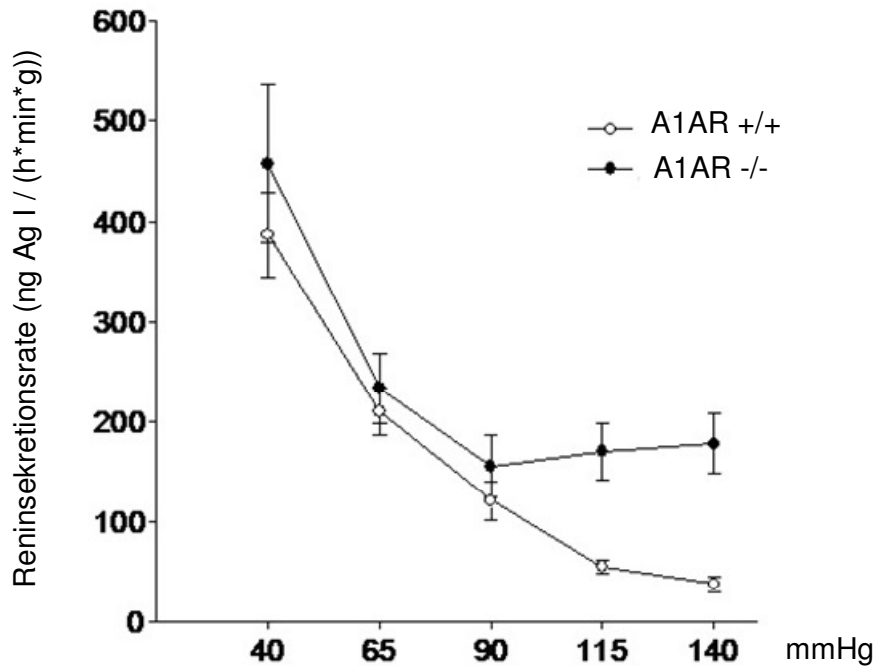
Die Reninaktivität im gesammelten venösen Blut wurde mit einem Radioimmunoassay gemessen (siehe unten). Die Reninsekretionsrate wurde aus dem Produkt der Reninkonzentration und des renalen Blutflusses berechnet [ml/min\*g Nierenmasse].

Die in vitro-Experimente lieferten, kurz zusammengefasst, folgende Ergebnisse:

In den Nieren von C57BL/6 Mäusen oder A1AR Wildtypmäusen führte eine Verminderung des renalen Perfusionsdrucks von 90 auf 40 mmHg zu einer sofortigen deutlichen Steigerung der Reninsekretionsrate (RSR). Die schrittweise Erhöhung des renalen Perfusionsdrucks bis auf den Ausgangswert führte auch die RSR schrittweise auf den Ursprungswert zurück. Eine weitere Steigerung des renalen Perfusionsdrucks auf bis zu 140 mmHg verminderte die RSR auf bis zu 40% ihres Ausgangswerts.

Um die Rolle des A1AR in dieser Regulation zu untersuchen, wurde der Rezeptor entweder pharmakologisch blockiert (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), 1 µmol/L), oder es wurden Nieren von A1AR-Knockout-Mäusen untersucht. Wie aus Graphik D.1. ersichtlich ist, veränderte die Deletion des A1AR nicht die

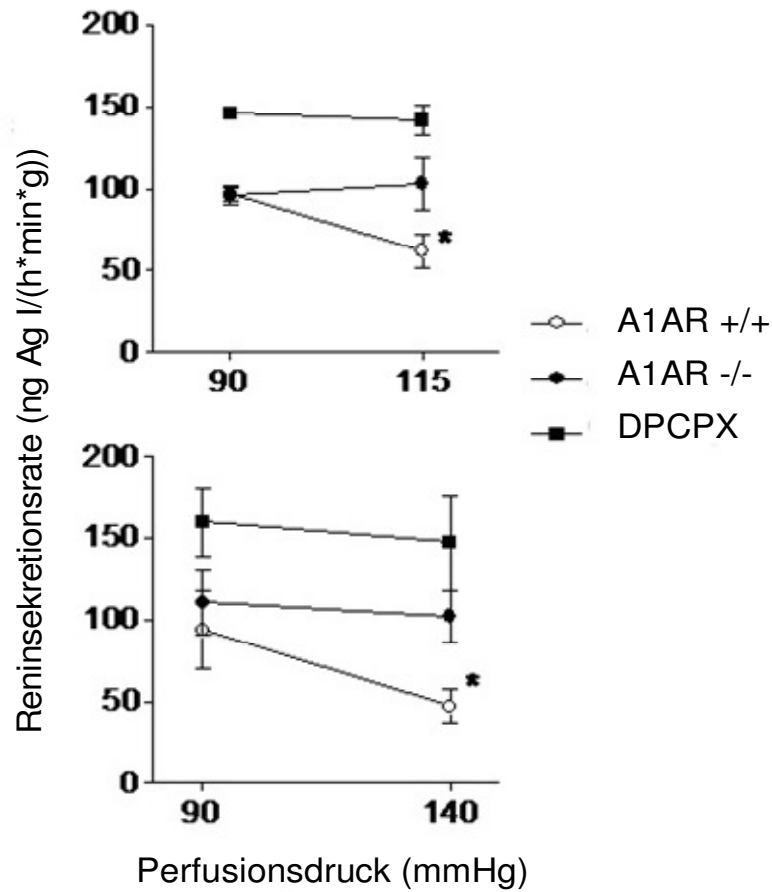
Reninstimulation bei niedrigem renalen Perfusionsdruck. Ein niedriger Perfusionsdruck von 40 oder 65 mmHg stimulierte also die RSR in A1AR  $-/-$  Mäusen in gleichem Maße wie in der Wildtyp-Gruppe. Im Gegensatz dazu war die Verminderung der Reninsekretionsrate bei hohem renalen Perfusionsdruck bei den A1AR $-/-$  Tieren völlig aufgehoben.



Graphik D.1: Reninsekretion in isoliert perfundierten Nieren von A1AR Knockout-Mäusen (A1AR  $-/-$ , n=7) und ihren Wildtypgeschwistern (A1AR  $+/+$ , n=7). Schrittweise Änderung des Perfusionsdrucks zwischen 40 mmHg und 140 mmHg.

Um die Notwendigkeit des A1AR bei der druckabhängigen Renininhibition zu untermauern, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, bei denen ohne vorherige Senkung des renalen Perfusionsdrucks vom Basisdruck 90 mmHg direkt auf 115 mmHg oder 140 mmHg gesteigert wurde.

Die direkte Steigerung des renalen Perfusionsdrucks von 90 auf 115 oder auf 140 mmHg führte zu einer deutlichen Verminderung die Reninsekretionsraten in Wildtypnieren (Graphik D.2). Diese Inhibition wurde sowohl durch die pharmakologische Blockade als auch durch die genetische Deletion (Graphik D.2) des A1AR völlig aufgehoben.



Graphik D.2: Reninsekretion in isoliert perfundierten Nieren von A1AR Knockoutmäusen (A1AR -/-, n=4) und ihren Wildtypgeschwistern (A1AR +/+, n=4), sowie Wildtypnieren unter pharmakologischer Blockade der A1AR mit DPCPX. Der Perfusionsdruck wurde in den isolierten Nieren direkt vom Basisdruck (90 mmHg) auf 115 mmHg (oberes Diagramm), bzw. 140 mmHg (unteres Diagramm) angehoben.

\*  $p < 0,05$  gegenüber 90 mmHg

## **E. Methoden**

### **E.1 Versuchstiere**

#### **E.1.1 Art Herkunft und Haltung**

Es kamen A1AR -/- und A1AR +/- Mäuse beiden Geschlechts (Körpergewicht 25 – 30g) und männliche Ratten (230 - 260 g) zum Einsatz.

Der in dieser Studie verwendete A1AR-knockout-Mäusestamm wurde an den National Institutes of Health (Prof .J. Schnermann) Bethesda, USA generiert<sup>20</sup> und uns als heterozygote Zuchtpaare zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden die homozygoten A1AR-knockout- (A1AR -/-) oder Wildtyp-Nachkommen (A1AR +/-) der heterozygoten Zuchtpaare verwendet.

Bei den Rattenexperimenten wurden Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Deutschland) verwendet.

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien für Haltung und Gebrauch von Labortieren durchgeführt, die von „US National Institutes of Health“ veröffentlicht wurden.

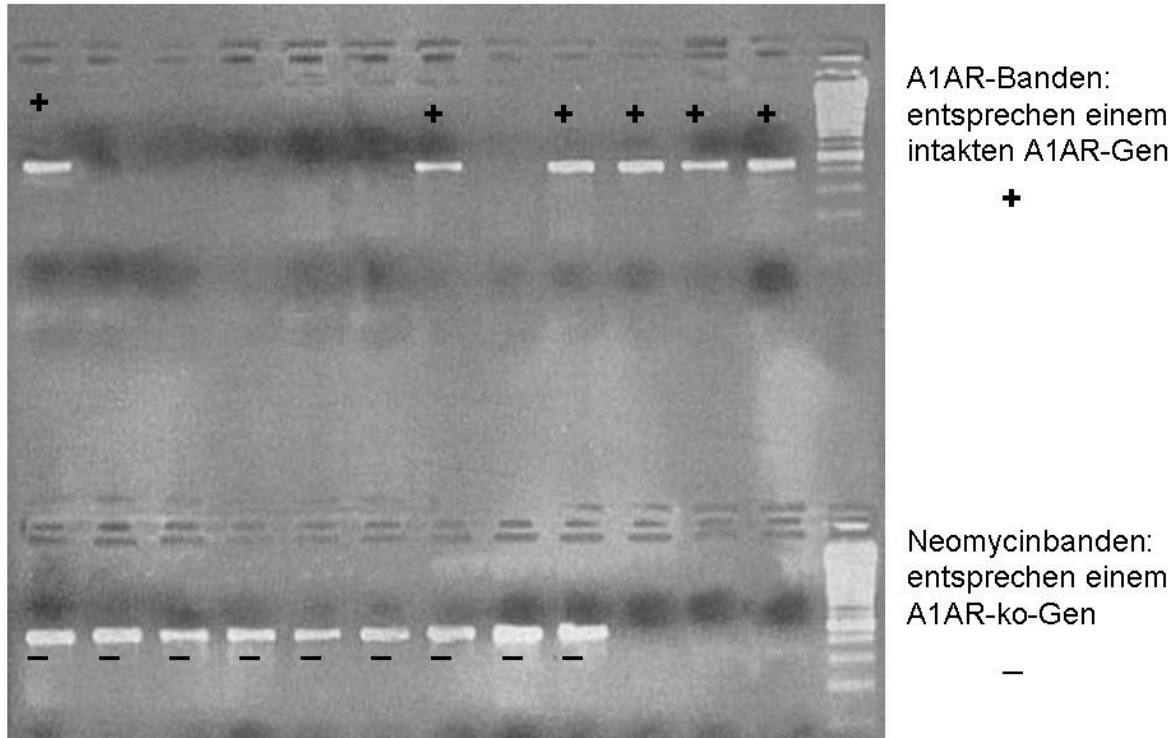
#### **E.1.2 Genotypisierung**

Zur Genotypisierung der Nachkommen der heterozygoten A1AR Zuchtpaare wurden 2 Wochen alten Mäusen die Schwanzspitze abgeschnitten und aus diesem Gewebe die DNA gewonnen.

Von jeder Probe wurde ein Ansatz mit Primern des A1AR-Gens und ein Ansatz mit Primern für das Neomycinresistenz-Gen mittels Polymerase-Chain-Reaktion amplifiziert. Das Neomycinresistenz-Gen wurde bei der genetischen Veränderung in das A1AR-Gen eingebaut, so dass dieses nicht mehr funktionsfähig ist, und damit zum A1AR-ko-Gen wurde. Deshalb dient der Nachweis des Neomycinresistenz-Gen der Identifikation eines A1AR-ko-Gensatzes. Da das diploide Genom der Maus jedoch auch heterozygot sein, also einen intakten A1AR-Gensatz und einen A1AR-ko-Gensatz enthalten kann, testeten wir das Genom auf das Vorhandensein beider Gene (s. Graphik E.1.3).

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2% Agaroselaufgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die DNA wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

Die genaue Beschreibung der DNA-Isolation und der Amplifikation ist im Anhang zu finden.



Graphik E.1.2: Bild eines Laufgels: In jeder Probe wurde in einem Ansatz das A1AR-Gen und in einem weiteren Ansatz das Neomycingen, durch das das A1AR-Gen zerstört wurde, amplifiziert. Beide Ansätze (oben A1AR, unten Neomycin) wurden nach der Amplifikation übereinander in einem 2%-Agarosegel aufgetragen und bei 120V über 30 Minuten getrennt. War das jeweilige Gen in der Probe vorhanden, wurde es amplifiziert und erschien als helle Bande.

Die Ergebnisse von links nach rechts:

A1AR +/- (Kontrolle), 5x A1AR -/-; A1AR +/-; A1AR -/-; A1AR +/-; 3x A1AR +/-

## **E.2 Blutdruckmessung**

### **E.2.1 Nicht invasiv**

Zur nicht-invasiven Blutdruckmessung an den Versuchsmäusen wurde den Tieren am Schwanz proximal eine hydraulische Druckmanschette angelegt und distal der Manschette durch einen Druckfühler die Pulsamplitude registriert.

Die Manschette war mit einem Manometer und einer Aufpumpvorrichtung verbunden. Der Druckfühler übertrug das Signal auf einen Computerbildschirm. Das sinusähnliche Pulssignal am Bildschirm konnte eingefroren werden, so dass sich

über der Zeitachse die Herzfrequenz ablesen ließ. Wurde bei laufender Übertragung des Signals die Druckmanschette aufgepumpt, so verschwand das wellenförmig oszillierende Signal beim Erreichen des systolischen Blutdrucks.

### **E.2.2 Invasiv**

Die Versuchsmäuse wurden durch intraperitoneale Injektion narkotisiert (0,18 ml/100g, gemischt aus 10 ml Ketamin (100mg/ml), 1,6 ml Xylazine (20mg/ml) und 1,6 ml H<sub>2</sub>O; Wiederholungsgabe 1/3 nach 40 Minuten) und auf eine Wärmeplatte (37 °C) gelegt.

Nun wurde in die linke A. carotis communis ein PE-Katheter gelegt, über den der mittlere arterielle Blutdruck gemessen wurde. Um eine Thrombosierung des Katheters zu vermeiden, war dieser mit einer NaCl-Heparinlösung gefüllt.

An dem Katheter war ein Drucktransducer angeschlossen, der den mittleren arteriellen Druck anzeigte und an einen Schreiber weiterleitete, so dass der Blutdruck konstant aufgezeichnet wurde.

## **E.3 Bestimmung der Plasmareninaktivität**

### **E.3.1 Blutabnahme**

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vene des Mäuseschwanzes direkt in 75µl-Hämatokritröhrchen, die innen mit 1µl 125 mM EDTA benetzt waren.

Bis zur Zentrifugation wurden die blutgefüllten Röhrchen auf Eis gelagert; der Plasma-Überstand wurde anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20° aufbewahrt.

### **E.3.2 Messung der Plasmareninaktivität**

Zur Messung der Reninkonzentration in den Plasmaproben wurden diese zusammen mit Reninsubstrat (= Angiotensinogen im Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten) 90 Minuten inkubiert. Das dabei vom Renin gebildete Angiotensin I (aus dem in hoher Konzentration vorhandenem Angiotensinogen) wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays quantifiziert. Durch Vergleich mit der Aktivität von Standardproben konnten wir daraus die Reninkonzentration bestimmen.



Für diese Messung kam ein Standard-Kit (Fa. Byk & DiaSorin Diagnostics) zum Einsatz. Der genaue Ablauf ist im Anhang beschrieben.

#### **E.4 Quantitative RNA-Messung**

Durch Messung der Renin-mRNA-Konzentration in der Niere (relativ zur Aktin-mRNA-Konzentration) verglichen wir die Transkription des Reningens in Rattennieren verschiedener Versuchsgruppen.

Bei der Verarbeitung von RNA wurden RNase-freie Utensilien (Pipettenspitzen, Eppendorfcups) verwendet.

##### **E.4.1 RNA-Isolierung**

Die Isolierung der Renin-RNA erfolgte aus in flüssigem Stickstoff gefrorenen Nieren. Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht darauf, dass das homogenisierte Gewebe in eine Lösung gebracht wird, die aus zwei Phasen besteht. In der einen Phase lösen sich Proteine und DNA, in der anderen die RNA. In den nachfolgenden Schritten werden die Phasen getrennt und die RNA isoliert. TRIZOL ist so eine Lösung, die chaotrope Salze enthält, welche Proteine denaturieren, so dass DNA und RNA frei werden. Außerdem enthält TRIZOL eine wässrige Phase, in der sich die RNA löst und eine Phenolphase, in der Proteine und DNA verbleiben. Zur Trennung der Phasen wird Chloroform verwendet, das sich kaum in Wasser, jedoch sehr gut in Phenol löst, so dass die beiden Phasen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Zentrifugation voneinander geschieden werden können.

Der genaue Ablauf ist im Anhang beschrieben.

##### **E.4.2 Reverse Transkription**

Bei der reversen Transkription wird RNA durch das Enzym reverse Transkriptase in c-DNA umgeschrieben. Dieser Prozess wird sowohl für die Renin-m-RNA, als auch für die Aktin-m-RNA durchgeführt, da diese im Ergebnis in Relation zueinander gesetzt werden.

Zur reversen Transkription wurde ein Standard-Kit verwendet. Der genaue Ablauf ist im Anhang beschrieben.

### **E.4.3 Quantitative Vermessung**

Die Quantitative Vermessung der cDNA-Menge erfolgte im Light-Cycler durch mehrfache abwechselnde Reduplikation der DNA durch PCR und fluorometrische Messung der cDNA-Menge. Pro PCR-Zyklus wird die DNA-Konzentration annähernd verdoppelt. Um keinen Fehler durch Schwankungen der gesamten m-RNA-Menge der Proben in Kauf nehmen zu müssen, werden bei jedem Zyklus die Konzentrationen der Renin- und der Aktin-cDNA gemessen und am Ende die Renin-cDNA-Konzentration in Relation zur Aktin-cDNA-Konzentration angegeben. Da Aktin in allen Nierenzellen in sehr gleichmäßiger Konzentration vorhanden ist, werden die auf diese Weise gewonnenen Ergebnisse gut miteinander vergleichbar. Bei jeder Messung wurde eine Leerprobe mitgeführt, die den gleichen Ansatz wie die zu vermessenden Proben enthielt, jedoch keine DNA. Um eine zuverlässige Messung zu erhalten, darf die Leerprobe über mindestens 35 Zyklen keine messbare DNA-Konzentration enthalten, da sonst von einer Verunreinigung des Ansatzes ausgegangen werden muss.

Die quantitative Vermessung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Standard-Kits sowie eines Light-Cyclers (Fa. Roche). Der genaue Ablauf ist im Anhang beschrieben.

### **E.5 Organentnahme**

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit Sevofluran betäubt und decapitiert. Nieren und Herz wurden entnommen, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verarbeitung gelagert.

### **E.6 Experimentelle Blutdrucksteigerung**

Zur gezielten Steigerung des Blutdruckes der Versuchstiere wurden mehrere Methoden in Erwägung gezogen.

Durch eine Injektion einer NaCl-Lösung in den Peritonealraum ließe sich durch die daraus folgende Steigerung des Intravasalvolumens der Blutdruck steigern. Jedoch nimmt dieses Manöver großen Einfluss auf den Salzgehalt des Körpers, der ja selbst einen wesentlichen Kontrollfaktor der Reninfreisetzung darstellt. Bei Auswirkungen der Kochsalzinjektion auf die Reninfreisetzung kann daher schlecht zwischen salz- und druckabhängigen Mechanismen unterschieden werden.

Eine weitere Möglichkeit, den Blutdruck gezielt zu steigern, ist die Applikation von Vasokonstriktoren. Idealerweise erreicht man damit einen isolierten Anstieg des Blutdrucks.

Verschiedene Vasokonstriktoren standen hierfür prinzipiell zur Verfügung, die jeweils verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen:

N-omega-Nitro-L-arginine-methylester-hydrochloride (L-NAME) ist ein Inhibitor der endothelialen NO-Synthetase. Da unter normalen Bedingungen ständig NO in Endothelien gebildet wird, dessen Funktion eine Vasodilatation ist, führt eine Hemmung dieser Bildung zu einer Vasokonstriktion.

Der Vorteil von L-NAME ist die orale Bioverfügbarkeit. Es reicht, den Tieren die Substanz in das Trinkwasser zu mischen, um den Blutdruck zu steigern. So werden die Tiere weniger unter Stress gesetzt, wodurch Störfaktoren, wie erhöhte Katecholaminausschüttung, die direkt die Reninausschüttung beeinflussen, vermieden werden.

Die Nachteile sind erstens, dass der Blutdruckanstieg relativ schwach ist. Außerdem aktiviert NO direkt das Reninsystem, so dass L-NAME mit der Hemmung der NO-Synthese das Reninsystem auch blutdruckunabhängig inhibiert.

Angiotensin II ist ein Peptidhormon, das als starker endogener Vasokonstriktor wirkt. Es lässt sich nicht oral verabreichen; es hemmt direkt die Reninausschüttung.

Phenylephrin ist ein selektiver alpha-Agonist. Es hat starke vasokonstriktorische Wirkung. Es kann nicht oral verabreicht werden. Da Phenylephrin keinen direkten Einfluss auf das Reninsystem nimmt, ist es für die Untersuchung der druckabhängigen Regulation des Reninsystems geeignet.

Um herauszufinden, wie stark der Blutdruckanstieg nach der einer subcutanen Injektion von Phenylephrin ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt (siehe G.2, Kurzfristige Blutdruckstimulierung)

Durch eine künstliche Nierenarterienstenose lässt sich der Blutdruck in Versuchstieren ebenfalls steigern. (zum Mechanismus s. Kapitel „Reninregulation“)

Der Versuch, den Blutdruckanstieg durch nicht-invasive Messung am Schwanz der wachen Maus zu messen, scheiterte nach Injektion von Phenylephrin an der induzierten peripheren Vasokonstriktion. Ca. 15 Minuten nach der Injektion wurde

das Drucksignal am Schwanz zu schwach, um noch eine zuverlässige Messung zuzulassen. Deshalb wichen wir auf die intravasale Blutdruckmessung aus.

## **E.7 Statistische Methoden**

Die Aufteilung der Tiere auf die Gruppen erfolgte durch Randomisierung, wobei nach Geschlecht (m, w) und genetischem Status für den A1A-Rezeptor (ko, wt) eingeteilt wurde.

Verglichen wurden Gruppenmittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts.

Bei den Experimenten mit isoliert perfundierten Nieren wurden die letzten zwei in einer Experimentengruppe erhobenen Werte gemittelt und für die statistische Analyse verwertet.

Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 5 \%$  im Student's paired t-test festgesetzt.

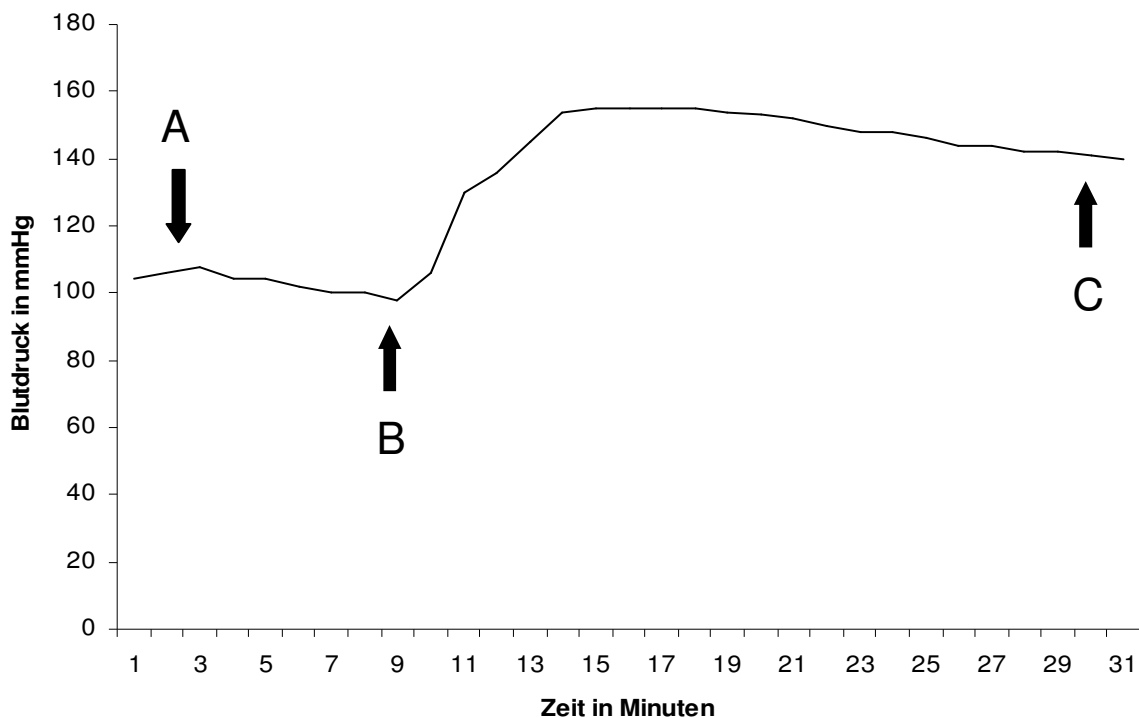
## **F. Versuchsdurchführung**

### **F.1 Experiment zum Kurzzeiteffekt**

#### **F.1.1 Blutdruckanstieg**

Um Blutdruckänderungen möglichst genau registrieren und damit möglichst präzise ihren Einfluss auf die Plasmaninaktivität beschreiben zu können, führten wir zunächst an anästhesierten Mäusen Vorversuche zur intravasalen Blutdruckmessung durch.

Nach Präparation der Versuchstiere und Stabilisierung des Blutdrucks wurden 1,6 mg/kg KG Phenylephrin (1 mg/ml in NaCl) subcutan injiziert. Graphik F.1 zeigt ein Beispiel einer raschen und ausgeprägten Steigerung des arteriellen Mitteldrucks nach Phenylephrininjektion.



Graphik F.1: Blutdruckverlauf an der anästhesierten Maus nach Injektion von 1,6 mg/kg KG Phenylephrin s.c.;

Zeitpunkt A: Ende der Präparationsphase, Injektion der Erhaltungsnarkose; B: Blutentnahme und Injektion von Phenylephrin; C: Blutabnahme

Obwohl sich mit diesem experimentellen Protokoll gut reproduzierbar und stabil der Blutdruck erhöhen ließ, wiesen die Plasmareninkonzentrationen sehr starke Schwankungen auf, sowohl basal, als auch nach Phenylephrinapplikation (230 bis 2100 ng Ag l/(h\*ml)), so dass letztlich keine verwertbaren Ergebnisse erhalten wurden. Eine Ursache für die starke Streuung der Plasmareninaktivitäten könnte in der unterschiedlichen Narkosetiefe und einer möglichen Atemdepression der Tiere liegen. Nachdem auch eine Tracheotomie mit kontrollierter Beatmung keine wesentliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit erbrachte, wechselten wir zu einem Protokoll zur Blutdrucksteigerung an wachen Mäusen.

Der wachen Versuchsmäusen wurden im Bereich des Nackens 1,6 mg/kg Phenylephrin 1 mg/ml, bzw. in der Kontrollgruppe das gleiche Volumen 0,9% NaCl subcutan gespritzt. 30 Minuten später wurde dem Tier eine Blutprobe entnommen. Aus den Versuchen an betäubten Mäusen wussten wir, wie schnell und stark der Blutdruck nach diesem Manöver anstieg.

### **F.1.2 Vorbereitung und Durchführung des Versuchs**

Für die Blutabnahme wurden die Tiere in einer Haltevorrichtung fixiert, die einen ungehinderten Zugang zum Schwanz der Maus ermöglichte.

Zehn Minuten vor der Blutabnahme wurde das Versuchstier in die vorgewärmte Haltevorrichtung gesetzt und in eine Kammer mit einer Innentemperatur von 39°C gestellt. Durch den vasokonstriktorisches Effekt von Phenylephrin war diese Maßnahme zur peripheren Vasodilatation, die die Blutabnahme aus dem Schwanz ermöglichte, notwendig.

Zur Verminderung des Stressfaktors für die Tiere im Experiment wurden die Mäuse auf die Prozedur des Experiments trainiert. Dazu wurden sie an den vier dem Versuch vorausgehenden Tagen je einmal aus dem Käfig gehoben, wie zum Spritzen notwendig, und anschließend zehn Minuten in der Haltevorrichtung in die Wärmekammer gesetzt.

Am Versuchstag wurden die Mäuse am Nackenfell angehoben und in die entstehende Hautfalte subcutan entweder 1,6 mg/kg Phenylephrinlösung 1mg/ml in 0,9% NaCl oder nur 40µl NaCl gespritzt. 25 Minuten später wurden sie in die Haltevorrichtung und in die Wärmekammer gesetzt und nach 30 Minuten Blut abgenommen.

Am dritten, vierten und fünften Tag nach dem Versuch wurden die Mäuse wieder trainiert und am sechsten Tag derselbe Versuch durchgeführt, diesmal jedoch mit getauschten Gruppen, d.h. der Phenylephringruppe wurde nun NaCl injiziert und umgekehrt.

Beide Plasmaproben wurden im selben Ansatz vermessen.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Manöver	Tr	Tr	Tr	Tr	Versuch			Tr	Tr	Tr	Kontrollversuch

Tr = Training

## **F.2 Experimente zum Langzeiteffekt**

### **F.2.1 Medikamentöse Blutdrucksteigerung**

Um die Abhängigkeit der langfristigen Reninbildung und -sekretion nach einem Blutdruckanstieg vom A1AR zu untersuchen, wurde den Versuchstieren im Bereich des Nackens subcutan eine osmotische Minipumpe implantiert, die über einen Zeitraum von 72 Stunden Phenylephrin (40 µg/kg Körpergewicht pro Stunde) freisetzt. Der Blutdruck wurde vor und nach Einsetzen der Pumpen nicht-invasiv gemessen.

Die Mäuse wurden unter Inhalationsanästhesie (Sevofluran) operiert. Nach Entfernung der Haare im Bereich des Nackens und Hautdesinfektion wurde ein ca. 5mm langer Hautschnitt gesetzt. Anschließend wurde die Haut stumpf von der Muskulatur gelöst, so dass eine subcutane Tasche entstand. In diese wurde die Pumpe eingesetzt, die Wunde einschichtig genäht und zusätzlich verklammert.

Bei keinem der Versuchstiere traten im Versuchszeitraum Zeichen einer Entzündung auf.

Nach 72 Stunden wurden erst Schwanzblutproben und dann die Organe entnommen.

### **F.2.2 Experimentelle Nierenarterienstenose**

Um die physiologische Relevanz des A1-Adenosinrezeptors in der blutdruckabhängigen Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems weiter zu untersuchen, führten wir schließlich noch Experimente mit künstlicher einseitiger Nierenarterienstenose bei Ratten durch. Der Mechanismus der entstehenden Hypertonie ist unter B.1.3 erläutert.

In diesem Versuch wurden vier Gruppen miteinander verglichen; zwei Kontrollgruppen und zwei Versuchsgruppen von Ratten, deren A1-Adenosinrezeptor mit 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) 1 mg/kg KG intraperitoneal blockiert wurde. Jede Gruppe wurde wiederum in je eine Untergruppe mit bzw. ohne einseitiger Nierenarterienstenose unterteilt. Im ersten Schritt des Versuchs wurden diese vier Gruppen durch Randomisierung aus männlichen Ratten gebildet.

Nun wurden die Tiere zunächst vier Mal an den Vorgang der unter E.2.1 beschriebenen nicht-invasiven Blutdruckmessung gewöhnt. Nach dieser Periode wurde den dafür vorgesehenen Tieren eine einseitige Nierenarterienstenose gesetzt. Dazu wurden die Versuchstiere mit Ketamin + Xylazin intraperitoneal betäubt (0,18 ml/100g, gemischt aus 10 ml Ketamine (100mg/ml), 1,6 ml Xylazine (20mg/ml) und 1,6 ml H<sub>2</sub>O). Der Zugang zur linken Nierenarterie erfolgte unter sterilen Bedingungen über einen Schnitt unterhalb des Rippenbogens an der dorsolateralen Flanke links. Die Niere wurde freigelegt, deren Arterie von der Nierenvene und anliegendem Bindegewebe getrennt und mit einem Clip versehen. Dieser Clip bestand aus einem U-förmig gebogenen Silberblechstreifen (Länge 4 mm, Breite 1 mm) mit einem freien Lumen vom 0,2 mm. Dieser Clip wurde so weit wie möglich über das Gefäß geschoben und in dieser Position, vom Perfusionsdruck der Arterie festgehalten, ohne weitere Fixierung belassen. Nach Reposition des Organs wurde der Schnitt zweischichtig mit je zwei Einzelknopfnähten und Metallklammern verschlossen. Bis zum Ende des Versuches zeigte keine Ratte Entzündungszeichen oder andere Beeinträchtigungen.

Nach zehn Tagen wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich Blutdruck gemessen. Am 14. Tag nach dem Einsetzen der Nierenarterienstenose wurden die Ratten durch Dekapitation getötet, das austretende Blut aufgefangen, beide Nieren entnommen und diese sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Auswertung wurde aus der Blutprobe die Plasmareninkonzentration und aus den Nieren die Renin-mRNA-Konzentration gemessen.

## **G. Ergebnisse**

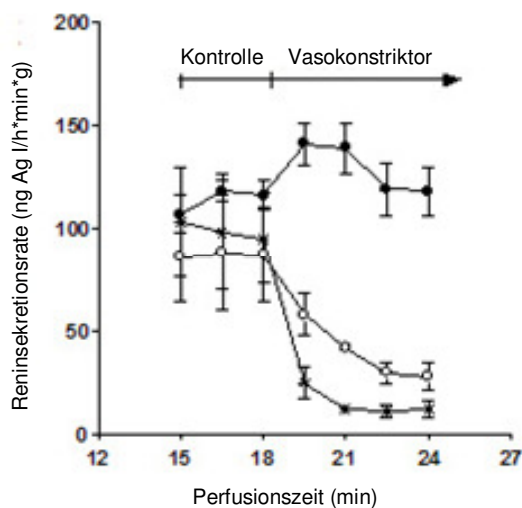
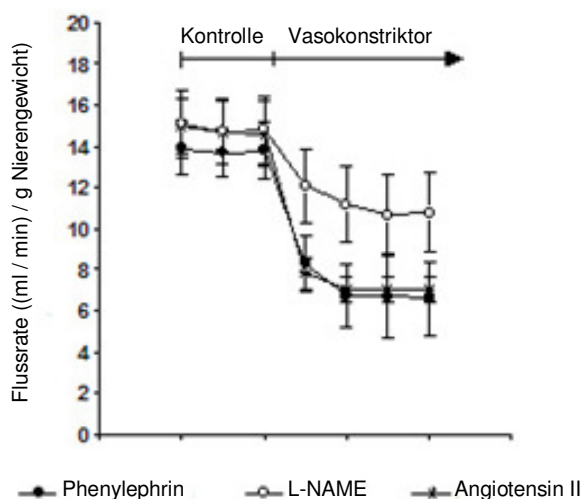
### **G.1 Blutdruckanstieg:**

Wie bereits erwähnt ist die Untersuchung des Effektes einer pharmakologischen Blutdrucksteigerung auf die Reninsekretion dadurch erschwert, dass die meisten Vasokonstriktoren einen direkt hemmenden Einfluss auf die Reninfreisetzung ausüben. Damit wird es unmöglich zu unterscheiden, ob der Effekt eines solchen Vasokonstriktors auf die Plasmareninkonzentration in vivo auf seinen blutdrucksteigerenden Effekt oder auf einen direkten Effekt an den reninbildenden Zellen zurückzuführen ist. Daher war es zunächst erforderlich, einen Vasokonstriktor zu identifizieren, der keinen blutdruckunabhängigen Effekt auf die Reninfreisetzung



ausübt. Hierzu wurden Versuche an der isoliert perfundierten Niere durchgeführt. Dieses Modell bietet durch eine elektronische Pumpensteuerung die Möglichkeit, Nieren mit einem konstanten Perfusionsdruck zu perfundieren. Ein Vasokonstriktor vermindert hier also den Blutfluss durch die Niere, ohne den Perfusionsdruck zu verändern.

Wie die Graphik G.1 zeigt, induzieren die Blockade der NO-Synthethasen mittels L-NAME, der Alpha-Adrenorezeptoragonist Phenylephrin und Angiotensin II deutliche Vasokonstriktionen, erkennbar an der Abnahme des Perfusatflusses. Während L-NAME und Angiotensin II zudem die Reninsekretionsrate vermindern, weist Phenylephrin keinen hemmenden Effekt auf die Reninsekretion auf. Phenylephrin scheint also keinen blutdruckunabhängigen Effekt auf die Reninfreisetzung zu besitzen. Deshalb kam bei dieser Studie Phenylephrin zur pharmakologischen Blutdrucksteigerung zum Einsatz.



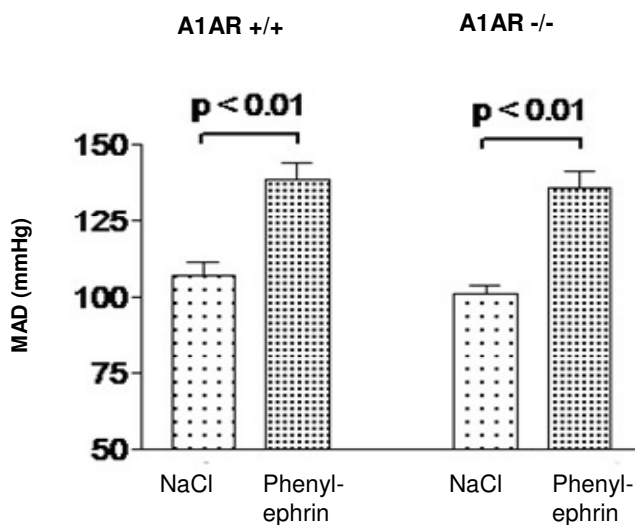
Graphik G.1 oben: Blutflussrate durch die isoliert perfundierte Niere. Der Abfall der Flussrate nach Applikation des Vasokonstriktors spiegelt umgekehrt den Anstieg der Vasokonstriktion wieder. Alle drei Substanzen führen zu einer deutlichen Vasokonstriktion.

unten: Reninsekretionsrate über der Zeitachse ohne und unter Einfluss der Vasokonstriktoren bei konstantem Perfusionsdruck von 100 mmHg. Sowohl L-NAME, als auch Ag II führen zu einer direkten Inhibition der Reninsekretionsrate, Phenylephrin nicht.

## **G.2 Kurzfristige Blutdruckstimulierung:**

Unter Kontrollbedingungen fanden sich keine Unterschiede im Blutdruck von A1AR  $+/+$  und A1AR  $-/-$  Mäusen (A1AR  $+/+$  118  $\pm$  13 mmHg , A1AR  $-/-$  121  $\pm$  14 mmHg,  $p \sim 0,14$ ,  $n=33$  jeder Genotyp).

Die subcutane Injektion von Phenylephrin (1,6 mg/kg KG) erhöhte den Blutdruck von A1AR  $+/+$  Mäusen signifikant von 106.9 $\pm$ 4.6 auf 138.4 $\pm$ 5.6 mmHg ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) und bei A1AR  $-/-$  Mäusen von 101.0 $\pm$ 2.6 auf 135.6 $\pm$ 5.8 mmHg ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ; vgl. Graphik G.2.1). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen fanden sich nicht.



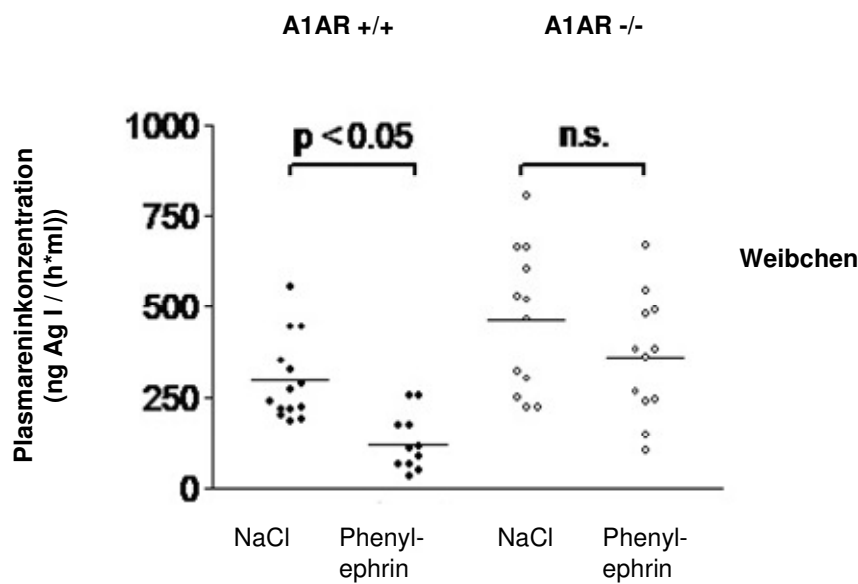
Graphik G.2.1: Auswirkungen einer einzelnen subcutanen Phenylephrininjektion auf den Blutdruck.

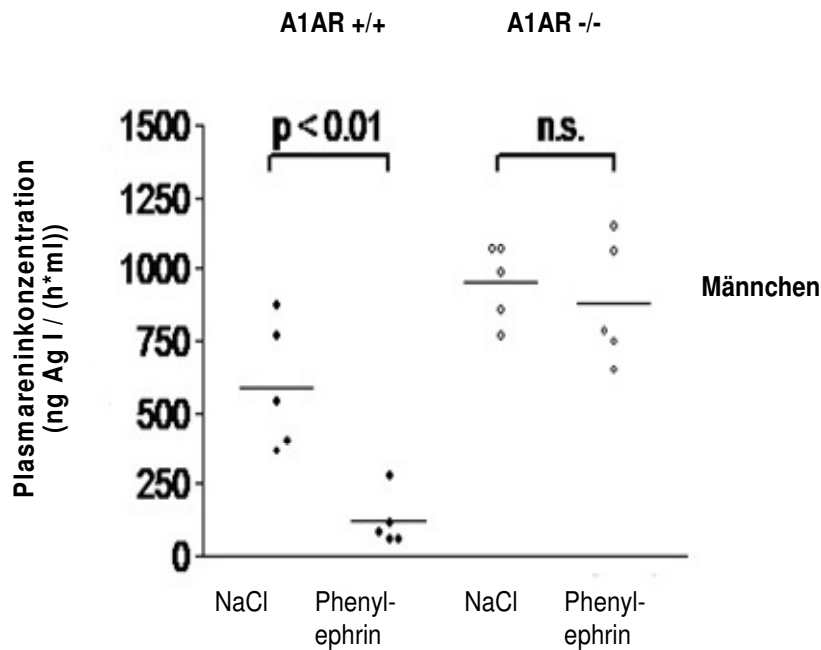
A1AR  $-/-$  und A1AR  $+/+$  Mäusen wurden 1,6 mg/kg Körpergewicht subcutan injiziert, wobei zur Kontrolle NaCl verwendet wurde.

Die Injektion von Phenylephrin führte bei Wildtypmäusen zu einem deutlichen Abfall der Plasmareninkonzentration (Weibchen 121  $\pm$  22,  $n=12$  gegenüber 297  $\pm$  30 ng angl/h\*ml in der NaCl- Kontrollgruppe,  $p < 0.05$ , Männchen 119  $\pm$  41,  $n=5$  gegenüber

590 +/- 100 ng angl/h\*ml,  $p < 0.01$ ). Im Gegensatz fiel bei A1AR-knockout-Mäusen die Plasmareninkonzentration nicht signifikant ab (Weibchen 359 +/- 48,  $n=12$  gegenüber 464 +/- 57 ng angl/h\*ml; nicht signifikant; Männchen 878 +/- 96,  $n=5$  gegenüber 950 +/- 60 ng angl/h\*ml; nicht signifikant). Vgl. Graphik G.2.2.

Dieses Ergebnis ist daher mit der Schlussfolgerung der in vitro-Vorbefunde vereinbar, dass Adenosin und der A1-Adenosinrezeptor für die Hemmung der Reninfreisetzung durch einen Blutdruckanstieg erforderlich sind.





Graphik G.2.2: Auswirkungen einer einzelnen subcutanen Phenylephrininjektion auf die Plasmareninkonzentration in A1AR-knockout-Mäusen

A1AR -/- und A1AR +/+ Mäusen wurden 1,6 mg/kg Körpergewicht subcutan injiziert, wobei zur Kontrolle NaCl verwendet wurde.

Die obere Graphik zeigt die Plasmareninkonzentration wacher weiblicher Versuchstiere 30 Minuten nach der Injektion von Phenylephrin (A1AR+/+ n=12; A1AR-/-, n = 12) oder NaCl (A1AR+/+, n = 14; A1AR-/-, n = 12).

Dasselbe ist in der unteren Graphik für männliche Versuchstiere gezeigt (A1AR+/+ n = 6 je Gruppe, A1AR-/- n = 5 je Gruppe).

### **G.3 Längerfristige Blutdruckstimulierung:**

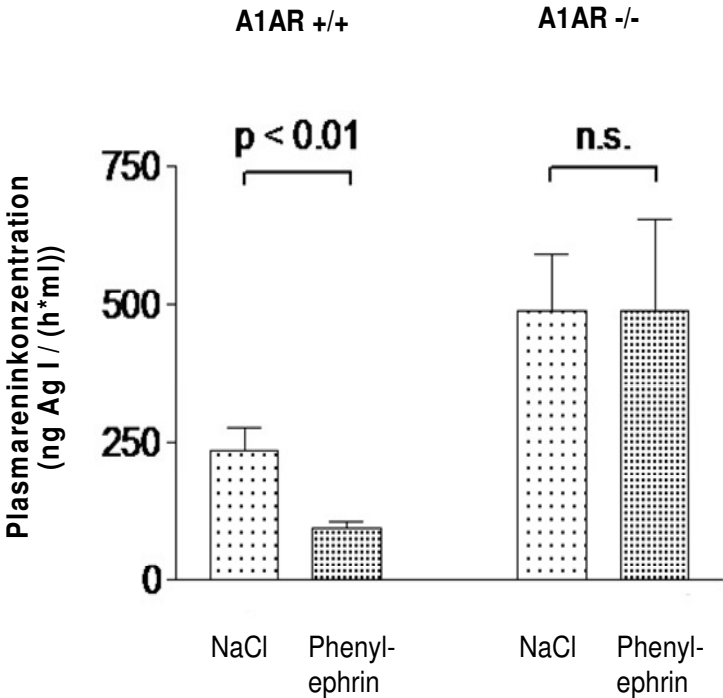
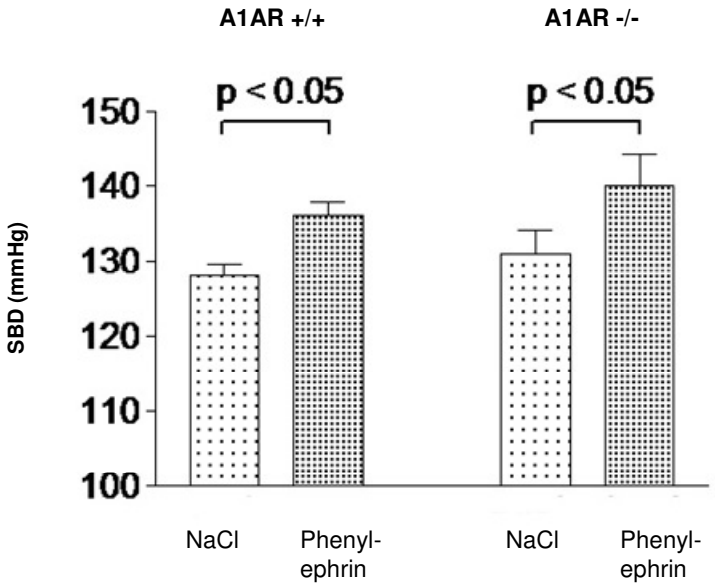
#### **G.3.1 Medikamentöse Blutdrucksteigerung**

Durch die konstante Phenylephrininfusion (1,6 mg/kg/h) über osmotischen Minipumpen wurde der Blutdruck weiblicher Mäuse über einen Zeitraum von 72 Stunden gesteigert. Den Kontrolltieren wurden mit 0,9% NaCl gefüllte Pumpen implantiert.

Der signifikante Blutdruckanstieg fiel in der A1AR -/- Gruppe (von 130,5 +/- 3,2 mmHg auf 139,5 +/- 4,3 mmHg,  $p < 0,05$ , n = 5) gleich aus, wie in der A1AR +/+ Gruppe (von 127,7 +/- 1,7 mmHg auf 135,9 +/- 1,8 mmHg,  $p < 0,05$ , n = 5). In der Wildtypgruppe fiel daraufhin die Plasmareninkonzentration auf 40% des Wertes der

Wildtypkontrollgruppe. In der A1AR-knockout-Gruppe hingegen fiel die Plasmareninkonzentration wiederum nicht signifikant ab (vgl. Graphik G.3.1).

Dieses Ergebnis unterstreicht weiter die Notwendigkeit des A1AR für die Inhibition der Reninfreisetzung durch einen arteriellen Hypertonus.



Graphik G.3.1: Auswirkungen einer langfristigen Phenylephrinperfusion auf Blutdruck und Plasmareninaktivität bei A1AR -/- Mäusen

Über osmotische Minipumpen wurden entweder 1,6 mg/kg/h oder 0,9% NaCl über einen Zeitraum von 72 h in weibliche A1AR -/- (n = 5 je Gruppe) oder A1AR +/+(n = 5 je Gruppe) Mäuse infundiert.

Am letzten Tag der Infusion wurden systolischer Blutdruck (SBD, oben) und Plasmareninkonzentration (unten) bestimmt.

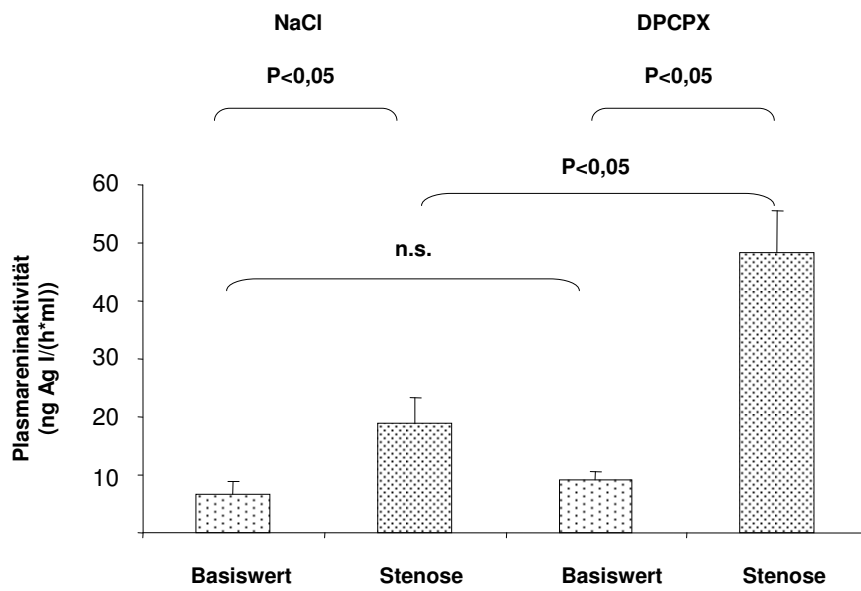
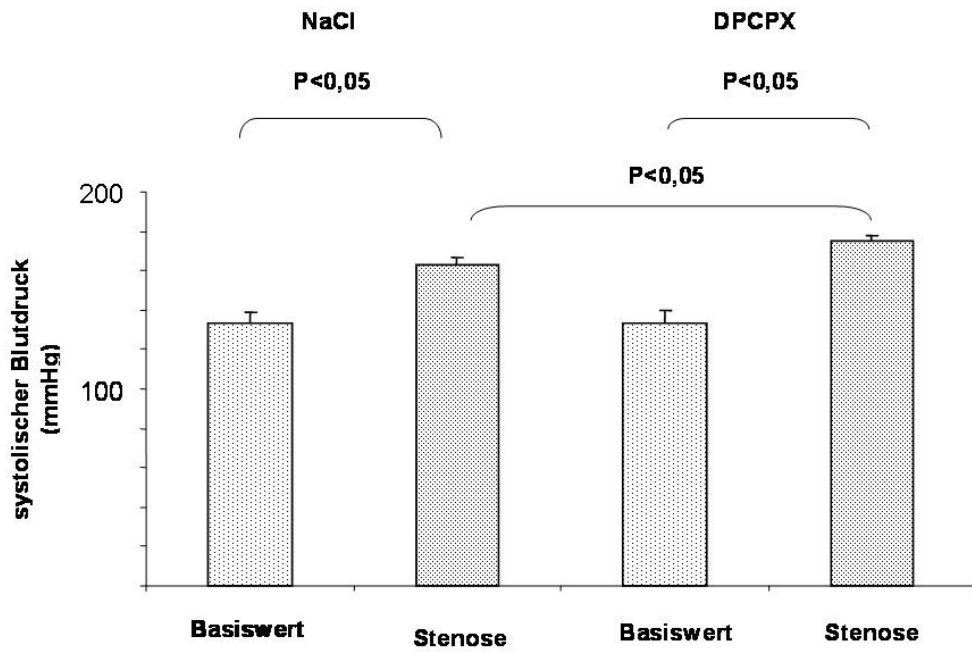
### **G.3.2 Experimentelle Nierenarterienstenose**

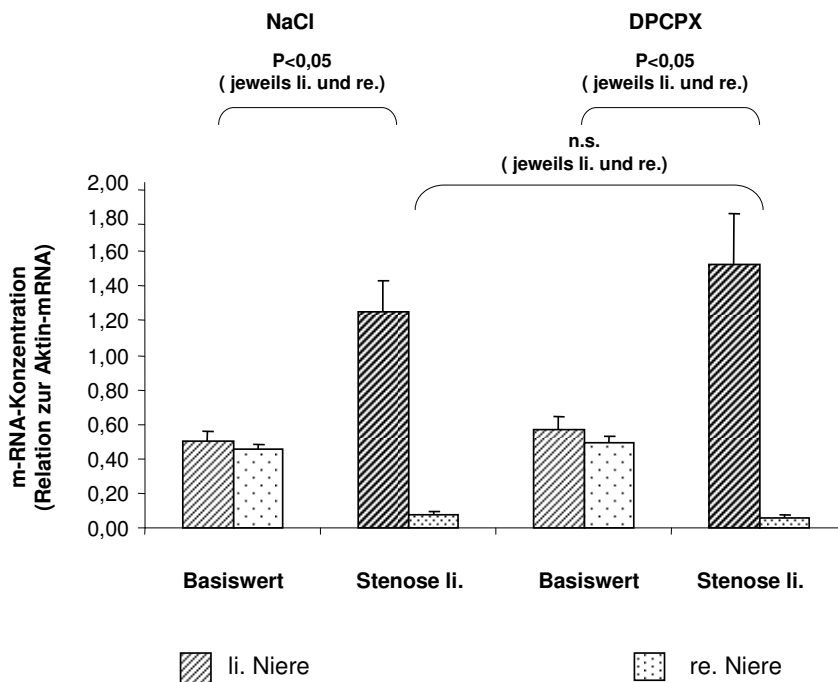
Die pharmakologische Blockade der A1-Adenosinrezeptoren hatte bei Kontrolltieren ohne Nierenarterienstenose keinen Einfluss auf den Blutdruck (DPCPX: 133,4 +/- 6 mmHg, Kontrolle mit NaCl: 133,3 +/- 6,1 mmHg, n = 4 vs. 4), die Plasmareninaktivität (DPCPX: 9,1 +/- 1,4, Kontrolle: 6,6 +/- 2,3, p = 0,4, n.s.) und die Renin-mRNA-Expression.

Die Anlage einer Nierenarterienstenose führte zu einem deutlichen Anstieg des Blutdrucks bei unbehandelten Ratten von 133,3 +/- 6,1 mmHg auf 163,0 +/- 3,3 mmHg (n= 5, p<0,05). Dieser Blutdruckanstieg wurde durch die Blockade der A1-Adenosinrezeptoren noch verstärkt. So betrug der Blutdruck bei DPCPX-behandelten Ratten mit Nierenarterienstenose 175,0 +/- 2,5 mmHg (n = 6) (Kontrolle ohne Stenose 133,4 +/- 6,0 mmHg, p< 0,05 ) und war damit signifikant höher als in der Gruppe ohne A1AR-Blockade (p<0,05) (vgl. Graphik G.3.2 a).

Auch die Plasmareninaktivität wurde durch die Nierenarterienstenose erhöht, wobei der Anstieg in der mit DPCPX behandelten Gruppe signifikant größer war als in der Gruppe ohne A1AR-Blockade ([ng Ag I/(h\*ml)]) DPCPX: Stenose 48,4 +/- 7,3, n=6 vs. ohne Stenose 9,1 +/- 1,4, n=4, p<0,05; Kontrolle: Stenose 19,9 +/- 4,4, n=5 vs. ohne Stenose 6,6 +/- 2,3, n=4, p<0,05) (vgl. Graphik G.3.2 b).

Wie erwartet führte die Anlage einer Nierenarterienstenose zu einer Stimulation der Renin-Genexpression in der betroffenen linken Niere und einer Hemmung der Renin-Genexpression in der kontralateralen rechten Niere. Signifikante Unterschiede zwischen DPCPX-behandelten und -unbehandelten Tieren fanden sich dabei nicht ([% Aktin-m-RNA] DPCPX: Stenose li. 1,53 +/- 0,29 / re. 0,06 +/- 0,01, n=6, - vs. ohne Stenose li 0,57 +/- 0,08 / re. vs. 0,49 +/- 0,04, n=4, p<sub>li</sub><0,05, p<sub>re</sub><0,05; Kontrolle: Stenose li. 1,25 +/- 0,19 / re 0,08 +/- 0,01 n=5, - vs. ohne Stenose li. 0,51 +/- 0,05, re. 0,45 +/- 0,04, n=4, p<sub>li</sub><0,05, p<sub>re</sub><0,05).





Graphik G.3.2: Auswirkungen einer einseitigen Nierenarterienstenose auf Blutdruck, Plasmareninaktivität und relativer Renin-m-RNA-Konzentration bei Ratten.

Der Versuchsgruppe wurde täglich DPCPX (1 mg/kg KG i.p.) gespritzt, der Kontrollgruppe wurde NaCl gespritzt. In der Versuchsgruppe erhielten sechs Tiere eine einseitige Nierenarterienstenose (n=6), vier Tiere dienten der Ermittlung der Basiswerte (n=4). In der Kontrollgruppe gab es fünf Tiere mit Nierenarterienstenose (n=5) und vier Tiere ohne (n=4).

Die Stenose blieb 14 Tage bestehen. In den letzten vier Tagen dieser Zeit wurde den Ratten je einmal am Tag Blutdruck gemessen (pro Messung und Tier wurden dazu 10 Einzelwerte erhoben) und daraus der Mittelwert errechnet (obere Graphik). Am Tag 14 wurde den Tieren Blut und die beiden Nieren entnommen, um die Plasmareninaktivität (mittlere Graphik), sowie die Renin-m-RNA-Konzentration relativ zur Aktin-m-RNA-Konzentration (untere Graphik) zu bestimmen.

## H. Diskussion

Die Blutdruckabhängigkeit der Reninsekretion ist phänomenologisch gut charakterisiert. Bis heute bleibt jedoch der zu Grunde liegende intrarenale Mechanismus, der Änderungen des renalen Perfusionsdrucks mit der Freisetzung von Renin verbindet, unklar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen erstmalig, dass die blutdruckabhängige Kontrolle der Reninsekretion in vitro und in vivo auf die Anwesenheit von Adenosin und den A1-Adenosinrezeptor angewiesen ist.

In vitro konnte am Modell der isoliert perfundierten Niere die völlige Aufhebung des inhibitorischen Effektes einer Blutdrucksteigerung auf die Reninsekretion gezeigt werden.



Auch in vivo senkte die Blutdrucksteigerung in Folge einer kurzfristigen oder langfristigen Phenylephringabe die Plasmareninkonzentration bei Wildtypmäusen signifikant. Bei A1AR-knockout-Mäusen blieb die Plasmareninkonzentration sowohl nach kurz- als auch nach langfristiger Stimulation des Blutdruckes auf gleichem Niveau. Damit konnten wir zeigen, dass auch in vivo Adenosin eine wichtige Rolle in der blutdruckabhängigen Reninsekretion inne hat.

Ein signifikanter Unterschied in der Plasmareninaktivität lässt sich auch bei den Ratten mit einseitiger Nierenarterienstenose zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren mit pharmakologischer Blockade des A1AR beobachten. Obwohl der arterielle Blutdruck, der normalerweise die Reninausschüttung hemmt, in der DPCPX-Gruppe durch einseitige Nierenarterienstenose stärker ansteigt als in der Kontrollgruppe, fiel die Plasmareninkonzentration deutlich höher aus. Hier lässt sich allerdings nicht sagen, ob dieser stärkere Plasmareninkonzentrations-Anstieg auf eine fehlende Hemmung in der nicht-stenosierten Niere, oder auf eine Disinhibition der Reninausschüttung in der stenosierten Niere zurückzuführen ist. Die Annahme der Disinhibition beruht auf der Vorstellung, dass die Reninsekretion immer gleichzeitig einerseits stimuliert, andererseits durch andere Faktoren inhibiert wird, so dass sich ein Gleichgewicht einstellt, das durch Veränderung der stimulierenden oder inhibierenden Faktoren verschoben werden kann. Eine verstärkte Disinhibition bedeutet also, dass inhibierende Faktoren weniger stark wirken.

Dass es sich bei den DPCPX-behandelten Ratten mit Nierenarterienstenose jedoch ausschließlich um eine Hemmung der Reninausschüttung in der nicht-stenosierten Niere handelt, erscheint aus folgender Überlegung heraus unwahrscheinlich: Unter Basalbedingungen produzieren beide Nieren zusammen in der DPCPX-Gruppe eine Reninmenge, die eine Plasmareninaktivität von  $9,1 \text{ mg Ag I / (h*ml)}$  besitzt, also pro Niere eine Aktivität von  $4,6 \text{ mg Ag I / (h*ml)}$ . Mit Stenose steigert sich diese Aktivität auf insgesamt  $48,4 \text{ mg Ag I / (h*ml)}$ . In der Kontrollgruppe liegt die Plasmareninaktivität mit Stenose bei  $18,9 \text{ mg Ag I / (h*ml)}$ . Unter der Annahme, dass diese Aktivität ausschließlich von Renin aus der stenosierten Niere produziert wird und die kontralaterale Niere ihre Reninsekretion auf Null verringert hat, dürfte in der DPCPX-Gruppe bei gleicher Stimulation der stenosierten Niere und fehlender Inhibition der Reninsekretion der kontralateralen Niere die gesamte Plasmareninaktivität nicht wesentlich über  $(18,9 + 4,6 =) 23,5 \text{ mg Ag I / (h*ml)}$  hinausgehen. Da die tatsächlich gemessene Plasmareninaktivität jedoch über das

Doppelte dieses Wertes beträgt, ließe sich vermuten, dass in diesem Versuch nach Blockade des A1AR die Disinhibition der Reninsekretion in der stenosierten Niere deutlich stärker ausfällt, als in der Kontrollgruppe.

Dieser Schluss steht in Widerspruch zu den aus isoliert perfundierten Nieren gewonnenen Ergebnissen. Dort fiel unter genetischer oder pharmakologischer Blockade des A1AR der Plasmareninaktivität-Anstieg in Folge eines niedrigen renalen Perfusionsdrucks nicht anders aus, als in den Kontrollen mit intaktem A1AR (vgl. Kap D). Bei einer einseitigen Nierenarterienstenose wird die Steigerung der Reninsekretion in der stenosierten Niere durch einen verminderten Perfusionsdruck distal der Stenose ausgelöst, so dass man gemäß den Ergebnissen aus der isoliert perfundierten Niere erwarten sollte, dass die Steigerung dieser Reninsekretion unabhängig vom A1AR in beiden Gruppen gleich ausfallen sollte. Allerdings ist hier noch zu berücksichtigen, dass die Hemmung der Reninsekretion aus den Nieren nicht nur durch einen erhöhten Blutdruck ausgelöst wird, sondern auch durch erhöhte Angiotensin II-Spiegel im Blut in Folge der erhöhten Plasmareninaktivität (vgl. Tab. B.1.3). Diese Hemmung wirkt der Stimulation durch verminderten Perfusionsdruck in der stenosierten Niere entgegen. Es wäre also denkbar, dass diese Hemmung bei Blockade des A1AR schwächer ausfällt als sonst. Aber auch andere unspezifische Effekte, die in vitro nicht auftreten, können für diese vermutete stärkere Disinhibition der Reninsekretion verantwortlich sein. Einer dieser Effekte könnte der Sympathikotonus sein, der nur in vivo besteht und eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Reninsystems spielt, da eine Aktivierung des Sympathikus eine direkte Stimulation der Reninfreisetzung bewirkt.

Im Gegenzug bieten die höheren Plasmareninaktivität-Werte in der DPCPX-Gruppe bei einseitiger Nierenarterienstenose eine mögliche Erklärung für die signifikant höheren Blutdruckwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Werte der relativen Renin-m-RNA-Konzentration in den Nieren der Versuchstiere ändern sich in beiden Gruppen durch eine einseitige Nierenarterienstenose signifikant. In der stenosierten Niere steigt die Renin-m-RNA-Konzentration stark an, während sie in der kontralateralen Niere abfällt. Jedoch wurde dies durch eine pharmakologische Blockade des A1AR weder unter Basalbedingungen, noch bei einseitiger Nierenarterienstenose beeinflusst. In keiner Situation gab es, weder in der stenosierten noch in der kontralateralen Niere, zwischen der DPCPX- und der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass

Adenosin über den A1AR zwar die Sekretion von Renin aus der Niere, jedoch nicht deren Renin-m-RNA-Expression beeinflusst. Hier könnten verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, beispielsweise der direkt hemmende Einfluss von AT II, welches ja in Tieren mit einseitiger Nierenarterienstenose durch die hohe Reninsekretion aus der stenosierten Niere hoch ist, auf die Reninsynthese.

Ein Haupteffekt von Adenosin in der druckabhängigen Regulation ist also die kurzfristige Inhibition der Reninsekretion durch Aktivierung der A<sub>1</sub>-Adenosin-Rezeptoren bei plötzlich erhöhtem Blutdruck, während die Rolle in der langfristigen Reninregulation sich durch diese Studie nicht eindeutig zuordnen lässt.

In anderen in vivo- und in vitro-Experimenten führte die direkte Stimulation der A1AR durch selektive A1AR-Agonisten zu einer verminderten Reninsekretion<sup>16, 21, 22</sup>, während deren Blockade die Reninfreisetzung erhöhte<sup>17, 23</sup>, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

Während der A<sub>1</sub>-Adenosin-Rezeptor für die kurzfristige Hemmung des Reninsystems durch einen hohen Blutdruck essentiell zu sein scheint, wird die Reninstimulation infolge erniedrigten Blutdrucks hingegen offenbar durch einen anderen Mechanismus gesteuert. Der Anstieg der Reninsekretion durch niedrigen renalen Perfusionsdruck war in vitro durch eine Blockade (medikamentös oder pharmakologisch) des A1AR nicht beeinflusst, was einen A1AR-unabhängigen Mechanismus vermuten lässt. Frühere Studien legen nahe, dass Prostaglandine bei niedrigem renalen Perfusionsdruck eine Renin-stimulierende Rolle einnehmen<sup>6-10</sup>. Die Hemmung der Prostaglandinbildung durch Indomethazin bremste die Reninfreisetzung infolge niedrigen renalen Perfusionsdrucks, ohne diese Reaktion jedoch vollständig zu unterdrücken. Dies könnte entweder an einer unvollständigen Blockade der COX-Aktivität liegen, oder darauf hindeuten, dass noch andere Transmitter, wie NO<sup>6, 26, 27</sup> in diesen Mechanismus eingebunden sind.

Aus diesem Ergebnis ergeben sich nun andere Fragen:

Ist Adenosin tatsächlich das einzige Bindeglied zwischen einer messbaren Blutdrucksteigerung und einer verminderten Reninsekretion, oder ist es nur Teil einer längeren Signalkaskade?

Wo wird das Adenosin, das die Reninsekretion steuert, gebildet? Findet in den reninbildenden Zellen der Tunica media der afferenten Arteriole eine autokrine

Regulation statt, oder werden diese Zellen durch andere spezialisierte Sensorzellen gesteuert?

Wir fanden außerdem einen erhöhten Plasmareninspiegel unter Basalbedingungen bei A1AR-knockout-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern, was die Ergebnisse vorangegangener Studien, die an A1AR  $-/-$  Mäusen anderen genetischen Hintergrunds durchgeführt wurden, bestätigt<sup>24</sup>. Für diesen Befund erscheinen mehrere Erklärungsversuche plausibel:

Einerseits ließe er sich gut mit der Annahme vereinen, dass bereits unter Basalbedingungen über eine tonische Aktivierung des A1AR die Reninausschüttung gebremst wird, was bei den knockout-Mäusen nicht mehr der Fall ist. Der erhöhte Reninspiegel wäre dann Folge einer Disinhibition der Reninsekretion.

Zudem wurde beschrieben, dass A1AR  $-/-$  Mäuse bei Fütterung mit Normal- und Niedrigsalzkost eine höhere Salzausscheidung über den Urin haben als Wildtypmäuse<sup>38</sup>. Dies könnte auch eine Erklärung für die höheren basalen Plasmareninspiegel sein, da ja eine Veränderung des Salzbestandes des Körpers die Reninfreisetzung steuert, also ein erhöhter Salzverlust über den Urin zu einem erhöhten Plasmareninspiegel führt. Bei diesem Erklärungsansatz wäre der erhöhte Reninspiegel also eine Antwort auf den erhöhten Salzverlust.

Dem gegenüber muss betont werden, dass sich im Modell der isoliert perfundierten Niere bei einem renalen Perfusionsdruck von 90 mmHg die Reninsekretionsrate zwischen A1AR  $+/+$  und A1AR  $-/-$  Nieren nicht signifikant unterschied. Dieser Befund lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass eine fehlende basale Inhibition der Reninsekretion Grund für die unterschiedlich hohen Plasmareninspiegel ist.

Es gab jedoch auch eine andere Studie, die keinen Unterschied in der systemischen Plasmareninkonzentration zwischen A1AR  $+/+$  und A1AR  $-/-$  Mäusen finden konnte<sup>25</sup>.

Insgesamt scheint es daher wahrscheinlich, dass unter basalen Bedingungen die Reninsekretion durch noch nicht bestimmte Faktoren reguliert wird und die Adenosin-vermittelte Hemmung der Reninfreisetzung erst bei deutlichen Blutdruckerhöhungen über den Normaldruck hinaus zum Tragen kommt.

Interessant ist auch die Feststellung, dass sich der basale Blutdruck der knockout-Tiere nicht von dem der Wildtypen unterschied. Eigentlich könnte man erwarten, dass infolge erhöhter Reninausschüttung in den A1AR  $-/-$  Mäusen auch der basale Blutdruck höher liegt. Dies ist nicht der Fall, was darauf schließen lässt, dass bei den

knockout-Mäusen eine Gegenregulation durch andere Mechanismen stattfindet, die ausreichend potent sind, die Einstellung des Blutdrucks entgegen den Abweichungen in der Reninsekretion beim Sollwert zu erhalten.

In einer vorangegangenen Studie wurde bei knockout -Tieren eine gegenüber Wildtypen erhöhte Salzausscheidung gefunden<sup>38</sup>. Würde dieser Salzausscheidung nicht entgegengesteuert werden, fände nach und nach ein intravasaler Volumenverlust statt, der auf Dauer zu einem Absinken des Blutdrucks führen müsste. Dies könnte erklären, dass bei den knockout -Tieren eine erhöhte Reninsekretion nicht im Widerspruch zu einem unveränderten Blutdruck stünde, sondern für diesen gerade notwendig sei. Eine endgültige Antwort auf diese Frage wird durch die vorliegende Studie nicht gegeben. Konsequenz dieser Feststellung muss jedoch sein, dass Absolutwerte der Plasmareninkonzentration zwischen den verschiedenen Genotypen nur mit größter Vorsicht direkt miteinander verglichen werden dürfen.

In der vorliegenden Studie wurden zur Untersuchung der Hypothese zwischen verschiedenen Genotypen relative Veränderungen der gemessenen Werte miteinander verglichen. Außerdem konnten die an A1AR -/- Mausnieren gewonnenen Ergebnisse durch Versuche an Nieren von Wildtypmäusen nach pharmakologischer Blockade des A1AR bestätigt werden. Die unterschiedlichen Absolutwerte der Plasmareninkonzentration zwischen Wildtyp- und knockout -Gruppen stellt also die Schlussfolgerung unserer Studie nicht in Frage, nämlich dass der A1-Adenosinrezeptor eine unverzichtbare Rolle in der druckabhängigen Verminderung der Reninfreisetzung spielt.

## **Anhang:**

### **Verwendete Medikamente und Hilfsmittel**

Nicht-invasive Blutdruckmessung: Blood-pressure Monitor, Fa. TSE Gemany

Invasive Blutdruckmessung: Harvard Apparatus, Fa. Hugo-Sachs-Elektronik

Photometer: GeneQuant II, Fa. Pharmacia Biotec

DNA-Isolierung und Amplifikation:

Proteinase K: QIAGEN, Cat. No. 19133

Polymerase + MgCl<sub>2</sub>: GoTaq, Fa. PROMEGA

5xPuffer, dNTP, Primer: Fa. Roche

TNES-Puffer:

5ml Tris (1M, pH 7,5), Fa. Merck KGaA

66,7ml NaCl, 3M, Fa. Merck KGaA

100ml EDTA, 0,5M, Fa. Merck KGaA

15ml SDS, 20%, Fa. Merck KGaA

mit ddH<sub>2</sub>O auf 500ml auffüllen

TBE-Puffer:

Tris 216g, Fa. Merck KGaA

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 110g, Fa. Merck KGaA

EDTA 18,9g, Fa. Merck KGaA

mit ddH<sub>2</sub>O auf 2 Liter auffüllen

Maleatpuffer:

4,06g Tris, Fa. Merck KGaA

5,8g Maleinsäure, Fa. Merck KGaA

2,96g EDTA, Fa. Merck KGaA

mit NaOH 1M auf pH 6 einstellen

RNA-Messung:

Mixer: Ultra-Tarrex T 25, Fa. Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik

RNA-Isolierung: Quiagen-Kit

Reverse Transkription: Roche-Kit

Amplifikation: Roche-Kit

Lightcycler: RealTime PCR, Fa. Roche

Bestimmung der Plasmareninaktivität:

Reninsubstrat: Plasma aus bilateral nephrectomierten Ratten.

Radioimmunoassay: Kit RIAP2721, Byk & DiaSorin Diagnostics, Deutschland

Alktivitätsmessung (Counter): 1282 Compugamma CS, Fa. LKB-WALLAC

L-NAME: N-omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, minimum 98% TLC, Fa. Sigma, N5751-10G, Aufbewahrung bei -20 °C, M 269,7

Phenylephrin: L-Phenylephrin Hydrochloride, Fa. SIGMA, P-6126, M 203,7

DPCPX: 8- Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, Fa. SIGMA, C-101, M 304,4

Heparin: Liquemin, Fa. Roche

Xylazine: RompunR, Bayer, Deutschland

Ketamin-HCl: Curamed, Deutschland)

EDTA disodium 125mM, Fa. SERVA

Sevofluran: Sevorane, Abbott

Osmotische Pumpen: Fa. DURECT Corporation, alzet reg., MICRO-OSMOTIC PUMP MODEL 1003D, Bezug via Charles River

## **Standardmethoden**

### **Isolation von DNA aus Gewebe**

Die Gewebeprobe wurde zur Verdauung und Freisetzung der DNA bei 55 °C unter Schütteln mindestens 4h in 600µl TNES-Puffer + 10µl Proteinase K inkubiert.

Zur Ausfällung der Proteine wurden der Probe 167µl NaCl 6M hinzugefügt, geschüttelt, und der Überstand abzentrifugiert (6000 rpm, 15 min, RT). Vom Überstand wurden 500µl in ein neues Gefäß überführt.

Durch Hinzufügen von 500µl Ethanol 100% (-20 °C) und vorsichtiges Schütteln wurde die DNA ausgefällt, 3min bei 10000 rpm abzentrifugiert, und der Überstand verworfen.

Zur Reinigung wurde das Pellet mit 500µl Ethanol, 80% (-20 °C) gewaschen, 15min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach dem Trocknen des Pellets (Raumtemperatur 10 min) wurde es ca. 1h bei 55 °C unter Schütteln in 150µl H<sub>2</sub>O gelöst, davon 5µl abgenommen, mit 95µl H<sub>2</sub>O verdünnt und photometrisch die DNA-Konzentration vermessen.

## **DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion**

Zur DNA-Amplifikation wurde folgender Ansatz hergestellt:

100ng DNA

Je 3 µl Sense und Antisense-Primer 10µM

3µl dNTP 2,5µM

5µl 5xPuffer

3µl MgCl<sub>2</sub>

0,25µl Taq

Mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl verdünnen.

Im Cyclyer wurde die DNA bei folgendem Programm vervielfältigt:

5 min 94 °C

Dann 34 Cyclen mit

1 min 94 °C

1 min 58 °C

1 min 72 °C

## **Bestimmung der Plasmenreninkonzentration mittels RIA**

Das zu vermessende Plasma wurde 1:20, das Reninsubstrat (= Rattenplasma) 1:5 mit Maleatpuffer verdünnt.

Nun wurden 50µl verdünnte Probe, 50µl Mix aus 4 Teilen verdünntem Reninsubstrat und 5 Teilen RIA-Reaktionspuffer (Kit), sowie 2µl Enzyminhibitor (PMSF, Kit) vermengt.

Von diesen 102µl Mix wurden jeweils 51µl bei 37 °C und bei 4 °C 90 Minuten lang inkubiert.

Anschließend wurden davon je 45µl mit je 500µl Tracer (Kit) in RIA-Röhrchen (Kit) überführt. Diese Röhrchen wurden mit 5 Standardproben (Kit) 3-24 Stunden bei RT inkubiert.



Während dieser Inkubationsphase binden sich proportional zur Angiotensin I-Konzentration Angiotensin I-Moleküle an die anti-Angiotensin I-Antikörper, mit der die RIA-Röhrchen innen beschichtet sind.

An die übrigen Bindestellen im Röhrchen, die nicht von Angiotensin I-Molekülen besetzt sind, binden sich die radioaktiven Tracermoleküle.

Nach der Inkubationsphase wurde die Flüssigkeit aus Tracer und Probe abgesaugt, in einem Counter die Radioaktivität der Röhrchen gemessen, und anhand einer aus den Standardwerten berechneten Standardkurve die Angiotensin I-Konzentration berechnet.

Durch Subtraktion des Warm- und Kaltwertes einer Probe kamen wir schließlich auf die tatsächliche Angiotensin I-Konzentration der Plasmaproben.

### **RNA-Isolation aus Nieren**

In Sarstedt-Tubes mit rundem Boden werden 2,5 ml TRIZOL vorgelegt und auf Eis gestellt.

Je eine halbe Rattenniere wird direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführt und 30 s mit einem feinen Mixer homogenisiert.

Der Mix wird in Eppendorfcups überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Während dieser Zeit denaturieren die Proteine und lösen sich mit der DNA im Phenol.

Es wird 1/5 des TRIZOL-Volumens Chloroform hinzugefügt und von Hand geschüttelt. Hier sollte nicht mit einem automatischen Schüttler („Vortexer“) gearbeitet werden, da sonst die DNA zerstört wird und sich dann in der wässrigen Phase löst.

Nun wird über 20 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert, wobei sich die Phenol/Chloroform- von der Wasserphase trennt. Es entstehen drei Schichten: oben der wässrige Überstand, unten die rote Phenolphase und dazwischen eine weiße Interphase aus relativ hydrophilen Proteinen. Der wässrige Überstand wird abgenommen und in ein Eppendorfcup überführt.

Zur Ausfällung der RNA wird dem Überstand 100 Volumenprozent Isopropanol 100% mit Raumtemperatur hinzugefügt, kurz mit einem Vortex-Gerät geschüttelt, die

Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und schließlich 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Eppendorfcup mit dem glasigen Pellet 5 Minuten bei Raumtemperatur umgedreht auf saugfähiges Papier gestellt und verbleibende Tropfen mit einer Pipette abgesaugt.

Zur weiteren Reinigung wird das Pellet mit 2,5ml Äthanol 75% bei Raumtemperatur gewaschen. Der Alkohol verdrängt die Hydrathülle der RNA, so dass diese nicht in Lösung geht, während das Wasser die verbleibenden Salze löst. Nach 5 Minuten wird über 15 Minuten bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Eppendorfcup mit dem nun weißen Pellet 5 Minuten bei Raumtemperatur umgedreht auf saugfähiges Papier gestellt und verbleibende Tropfen mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet wird 10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Das Pellet wird abschließend durch Vortexen, anschließend maximal 2 Minuten Inkubation im Wärmeschüttler bei 65°C und nochmaligem Vortexen in 750µl Wasser gelöst und auf Eis gestellt.

Zur Konzentrationsbestimmung werden 2µl Probe mit 98µl Wasser verdünnt und bei 260 und 280nm Wellenlänge photometrisch vermessen. Die Ratio 260/280 sollte 1,8 bis 2,0 betragen. Da aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280nm haben, spricht eine Ratio unter 1,8 für einen hohen Proteinanteil, der die enzymatische Aktivität bei der folgenden reversen Transkription mindern kann.

### **Reverse Transkription**

Es wurden 2µg RNA mit 1µl polT (0,5µg/µl, Kit) und H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10µl vermischt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Dann wurde ein Mix aus 1µl reverser Transkriptase (Kit), 4µl dNTP (2,5mMol/l, Kit), 4µl Puffer (Kit) und 3µl H<sub>2</sub>O hergestellt. Nach dem Vermischen beider Ansätze wurden die Proben eine Stunde lang in einen auf 37°C vorgeheizten Block gestellt. Schließlich wurde der Prozess durch zweiminütiges Erhitzen auf 94°C beendet.

## **Quantitative Vermessung von cDNA mittels Light-Cycler**

Zunächst wurde der doppelte Reaktionsansatz für alle Proben, die Kontrolle und die Eicheinheiten hergestellt. Dieser bestand aus je 10 µl Mastermix (Kit), der die Polymerase, dNTP, sowie die für das richtige Reaktionsmilieu wichtigen Puffer und Elektrolyte enthält, und schließlich 6µl H<sub>2</sub>O. Der Hälfte dieses Reaktionsansatzes wurden je 1µl Primer und Antiprimer (je 10µM) des Reningens und der anderen Hälfte des Aktinens hinzugefügt.

Nun wurde die erforderliche Anzahl an Kapillaren mit je 18µl Reaktionsansatz beschickt, und je einer Kapillare mit dem Aktin- und einer mit dem Renin-Reaktionsansatz 2µl der zu quantifizierenden c-DNA-Lösung hinzugefügt.

Der Programmablauf des Lightcyclers sah folgendermaßen aus:

Im ersten Schritt wurde das System aktiviert. Dazu wurden die Proben 900 Sekunden bei 95 °C inkubiert, wodurch eventuell vorhandene unspezifische Bindungen zwischen DNA-Strängen oder zwischen DNA und Polymerasemolekülen aufgeschmolzen wurden. Nach dieser Phase wurde das System mit 20 °C/s abgekühlt. Diese Abkühlgeschwindigkeit ist notwendig, um die erneute Bildung unspezifischer Bindungen zu vermeiden.

Es folgte das zyklische Reduplikationsprogramm, bei dem nach jedem Zyklus eine photometrische Vermessung der DNA-Konzentration stattfand und welches 50 mal wiederholt wurde. Jeder Zyklus bestand aus einer Trennungsphase, bei der die Proben 15 s bei 95 °C gehalten wurden und die die Bindung von Polymerase an DNA, sowie Bindungen zwischen DNA-Strängen aufschmilzt. Nun erfolgte die Bindungsphase mit 20 s bei 58 °C, welche die gezielte Bindung von Primer und Antiprimer an den Anfang der DNA-Stränge und der Polymerasemoleküle an den Reduplikationsstart erlaubt. In der folgenden Phase mit 20 s bei 72 °C ist die Polymerase aktiv und verdoppelt diejenigen DNA-Stränge, an die Primer und Polymerase gebunden haben. Die Temperaturänderungen zwischen den Phasen verliefen mit einer Geschwindigkeit von 20 °C/s.

Für die Erstellung der Schmelzkurve wurden am Ende der Potenzierungsphase die Proben nochmals für 1 s auf 95 °C erhitzt, schnell auf 60 °C abgekühlt und nach 15 s mit 0,1 °C/s bis auf 95 °C erwärmt, wobei die Proben ständig photometrisch vermessen wurden. An dem Temperaturpunkt, an welchem doppelsträngige DNA in einzelsträngige aufgeschmolzen wird, findet ein deutlicher Abfall der Absorption statt.

Ist nur die gewollte DNA in größeren Mengen vorhanden, findet sich in der Schmelzkurve an einem einzigen Punkt eine deutliche Änderung der Absorption. Sind verschiedene DNA-Stücke amplifiziert worden, so haben diese unterschiedliche Längen und Basenzusammensetzung und damit unterschiedliche Schmelztemperaturen; die Schmelzkurve weist dann mehrere Änderungen in der Absorption auf.

### **Literaturnachweis:**

1. William F. Ganong. Review of Medical Physiology, eighteenth edition, LANGE 1997  
**A:** Page 425, Chap. 24  
**B:** Page 428, Chap. 24
2. Fray JC. Regulation of renin secretion by calcium and chemiosmotic forces: (patho) physiological considerations. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1097:243-262.
3. Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest*. 1997; 100:1566-1574.
4. Vander AJ, Miller R. Control Of Renin Secretion In The Anesthetized Dog. *Am J Physiol*. 1964; 207:537-546.
5. Schricker K, Hamann M, Kaissling B, Kurtz A. Role of the macula densa in the control of renal renin gene expression in two-kidney/one-clip rats. *Pflugers Arch*. 1994; 427:42-46.
6. Schricker K, Hamann M, Kaissling B, Kurtz A. Renal autacoids are involved in the stimulation of renin gene expression by low perfusion pressure. *Kidney Int*. 1994; 46:1330-1336.
7. Schricker K, Hamann M, Kurtz A. Prostaglandins are involved in the stimulation of renin gene expression in 2 kidney-1 clip rats. *Pflugers Arch*. 1995; 430:188-194.

8. Seymour AA, Zehr JE. Influence of renal prostaglandin synthesis on renin control mechanisms in the dog. *Circ Res.* 1979; 45:13-25.
9. Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1999; 34:96-101.
10. Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A, Yamada T, Takayama K, Kuriyama S, Hosoki Y, Takahata O, Taniguchi T, Fukuzawa J, Hasebe N, Kikuchi K, Narumiya S, Ushikubi F. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I2 receptor IP. *J Clin Invest.* 2004; 114:805-812.
11. Freeman RH, Davis JO, Dietz JR, Villarreal D, Seymour AA, Echtenkamp SF. Renal prostaglandins and the control of renin release. *Hypertension.* 1982; 4:106-112.
12. Villarreal D, Davis JO, Freeman RH, Sweet WD, Dietz JR. Effects of meclofenamate on the renin response to aortic constriction in the rat. *Am J Physiol.* 1984; 247:R546-551.
13. Mann B, Hartner A, Jensen BL, Hilgers KF, Hocherl K, Kramer BK, Kurtz A. Acute upregulation of COX-2 by renal artery stenosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280:F119-125.
14. Hartner A, Goppelt-Struebe M, Hilgers KF. Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension.* 1998; 31:201-205.
15. Navar LG. Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol.* 1998;274:F433-444.
16. Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B, Osswald H. Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am J Physiol.* 1998; 275:F991-997.
17. Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest.* 1990; 85:1622-1628.

18. Scholz, Vogel, Kurtz. Interrelation between baroreceptor and macula densa mechanisms in the control of renin secretion. *Journal of Physiology*; 1993, 511-524
19. Tobian, L. 1960. Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension; *Physiological reviews*, 40, 280-312
20. Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:9983-9988.
21. Schweda F, Wagner C, Kramer BK, Schnermann J, Kurtz A. Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 284:F770-777.
22. Churchill PC, Bidani A. Renal effects of selective adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am J Physiol*. 1987; 252:F299-303.
23. Churchill PC, Rossi NF, Churchill MC. Renin secretory effects of N-6-cyclohexyladenosine: effects of dietary sodium. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 252: F872-F876, 1987.
24. Pfeifer CA, Suzuki F, Jackson EK. Selective A1 adenosine receptor antagonism augments beta-adrenergic-induced renin release in vivo. *Am J Physiol*. 1995; 269:F469-479.
25. Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, Persson AE. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281:R1362-1367.
26. Hansen PB, Yang T, Huang Y, Mizel D, Briggs J, Schnermann J. Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiol Scand*. 2004; 181:431-437.
27. Scholz H, Kurtz A. Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney. *J Clin Invest*. 1993; 91:1088-1094.

28. Knoblich PR, Freeman RH, Villarreal D. Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. *Hypertension*. 1996; 28:738-742.
29. Skinner, S.L., McCubbin, J.W., Page, I.H. 1964. Control of rennin secretion. *Circulation Research* 15, 1618 – 1620.
30. Hackenthal, E., Paul, M., Ganten & Taugner, 1990. Morphology physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiological Reviews* 70, 1067-1116
31. Blaine, Davis & Witty, 1970. Renin release after hemorrhage and after suprarenal aortic constriction in dogs without sodium delivery to the macula densa. *Circulation Research* 27, 1081-1089
32. Blaine, Davis & Prewitt, 1971. Evidence for a renal vascular receptor in control of rennin secretion. *American Journal of Physiology* 220, 1593-1597
33. Glodny B., Glodny De., John Loesch, discoverer of renovascular hypertension, and Harry Goldblatt: two great pioneers in circulation research. *Ann Intern Med*. 2006 Feb 21;144(4):286-95.
34. Timio M., Goldblatt, kidney and hypertension: three steps in the history of nephrology. *Historical Archives of Italian Nephrology. G Ital Nefrol*. 2003 Sep-Oct;20(5):512-5.
35. Keeton, T.K., Campbell, W.B. 1981. The pharmacologic alteration of rennin release. *Pharmacological Reviews* 31, 81-a227
36. Itoh S, Carretero OA, Murray RD. Possible role of adenosine in the macula densa mechanism of rennin release in rabbits. *J Clin invest* 76: 1412-1417, 1985.
37. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 260: F486-F493, 1991.
38. Brown D, Thorén P, Steege A, Mrowka R, Sällström, Skott O, Fredholm B, Persson A. Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure

- regulation and rennin release. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 290:1324-1329, 2006
39. Loesch J, Ein Beitrag zur experimentellen Nephritis und zum arteiellen Hochdruck I. *Zentralblatt für Innere Medizin* 1933; 7: 144-69
  40. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 69: 1503-1506, 2006;
  41. Jan Danser AH, Batenburg WW, van Esch JH. Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol Dial Transplant* 22: 1288-1292, 2007
  42. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803, 2006;
  43. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-287, 2007.
  44. Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114: 634-642, 2004
  45. Bell, PD, et al. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. 100:4322-4327
  46. Sabirov, RZ, Dutta, AK, Okada, Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J. Gen. Physiol.* 2001. 118:251-266.
  47. Peti-Peterdi, J, Morishima, S, Bell, PD, Okada, Y. Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002. 283:F197-F201.
  48. Liu, R, Pittner, J, Persson, AE. Changes of cell volume and nitric oxide concentration in macula densa cells caused by changes in luminal NaCl concentration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. 13:2688-2696.



49. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 299-309
50. Zimmermann H, Braun N, Kegel B and Heine P (1998) New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 32: 421-425[Medline]
51. Schubert P, Komp W and Kreutzberg GW (1979) Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. *Brain Res* 168: 419-424[Medline].
52. Broch OJ and Ueland PM (1980) Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *J Neurochem* 35: 484-488[Medline].
53. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001 Dec;53(4):527-52. Review.
54. Osswald, H., H. J. Schmitz, & R. Kemper. Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 303: 95-99, 1978
55. Tagawa, H., & A. J. Vander. Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ. Res.* 26: 327-338, 1970
56. Kurtz, A., R. Della Bruna, J. Pfeilschifter, & C. Bauer. Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33: 798-803, 1988
57. Spielman, W. S. Antagonistic effect of theophylline on the adenosine-induced decrease in renin release. *Am. J. Physiol.* 247 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 16): F246-F251, 1984.
58. Spielman, W. S., L. J. Arend. Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension* 17: 117-130, 1991
59. Churchill, P. C., and M. C. Churchill. A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 589-594, 1985

- 60.** Pavlov AN, Sosnovtseva OV, Pavlova ON, Mosekilde E, Holstein-Rathlou NH. Characterizing multimode interaction in renal autoregulation. *Physiol Meas.* 2008 Aug;29(8):945-58. Epub 2008 Jul 4.
- 61.** Iliescu R, Cazan R, McLemore GR Jr, Venegas-Pont M, Ryan MJ. Renal blood flow and dynamic autoregulation in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Sep;295(3):F734-40. Epub 2008 Jun 25.

## **Lebenslauf**

Name: Florian Johannes Hugo Segerer

Geburtsdatum: 3. September 1981

Geburtsort: Fürth

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: August 1988 bis Juni 2001  
Grundschule und Gymnasium in Berlin und Regensburg

Studium: S 2002 – SS 2009 Studium der Medizin in Regensburg  
und Limoges (Frankreich)

Facharztausbildung: Seit Januar 2010 an der Kinderklinik der Universität  
Würzburg, Direktor: Prof. Dr. C. Speer

Stipendien: 2005 - 2009 Stipendiat des Cusanuswerks  
(Studienförderung der deutschen Bischofskonferenz)

### Danksagung:

Ich danke allen meinen wissenschaftlichen und medizinischen Lehrern und Vorbildern, insbesondere Professor Frank Schweda, Professor Peter Gruß, Professor Johannes Wolff, Professor Hugo Segerer und vielen anderen für ihre Lehre, Anleitung und die Begeisterung für Medizin und medizinische Forschung, die sie mir vermitteln konnten.

Ich danke meinen Eltern Angelika und Hugo Segerer, meinen Freunden und Geschwistern für ihre Unterstützung.