

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. GÜNTER RIEGGER
DER FAKULTÄT DER MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EXPRESSION DER KOMPONENTEN DES RENIN-
ANGIOTENSIN-SYSTEMS ENTLANG DES
MAUSNEPHRONS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Flavius Zoicas

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. GÜNTER RIEGGER
DER FAKULTÄT DER MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EXPRESSION DER KOMPONENTEN DES RENIN-
ANGIOTENSIN-SYSTEMS ENTLANG DES
MAUSNEPHRONS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Flavius Zoicas

2012

Dekan : Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Banas

2. Berichterstatter: PD Dr. Karl-Peter Ittner

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS).....	1
1.2. Lokale Renin-Angiotensin-Systeme	2
1.3 Komponenten des RAS.....	3
1.3.1 Renin	3
1.3.2 Angiotensinogen	4
1.3.3 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	5
1.3.4 Synthese und Metabolismus der Angiotensinpeptide	6
1.4 Die Angiotensin-Rezeptoren	7
1.4.1 Der Angiotensin Typ-1 (AT ₁) Rezeptor	7
1.4.2 Der Angiotensin Typ-2 (AT ₂) Rezeptor	11
1.5 Kardiovaskuläre und pathologische Wirkungen von Angiotensin II.....	16
1.6 Inhibition des RAS.....	19
1.6.1 ACE-Inhibitoren	20
1.6.2 Angiotensin ₁ -Rezeptor-Blocker.....	21
1.6.3 Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten.....	22
1.6.4 Direkte Renin-Inhibition	23
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit	25
2. Materialien und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Mikrodissektion.....	28

2.2.3 Die segmentspezifischen Strukturen entlang des Nephrons	29
2.2.4 RNA – Isolierung	30
2.2.5 Reverse Transkription	31
2.2.6 PCR.....	32
2.2.7 Gelelektrophorese	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Aktin.....	37
3.2 Bestätigungen	38
3.3 Renin.....	42
3.4 Angiotensinogen (AGTN).....	42
3.5 AT _{1a} -Rezeptor	43
3.6 AT _{1b} -Rezeptor	44
3.7 AT ₂ -Rezeptor	45
3.8 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	46
3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	47
4. Diskussion	49
4.1 Renin.....	49
4.2 Angiotensinogen	52
4.3 AT ₁ -Rezeptoren	54
4.3.1 AT _{1a} -Rezeptor	56
4.3.2 AT _{1b} -Rezeptor	58
4.4 AT ₂ -Rezeptor	60
4.5 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	63

4.6. Zusammenfassende Beurteilung.....	67
5. Zusammenfassung	69
6. Quellenverzeichnis	70
7. Abkürzungsverzeichnis.....	82
8. Danksagung	86

1. Einleitung

1.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Phylogenetisch gesehen ist das Renin-Angiotensin-System (RAS) eines der ältesten Hormonsysteme und blieb während der gesamten Evolution erhalten [1]. Komparative Studien zeigten, dass renal produziertes Renin und juxtaglomeruläre Zellen bereits während der frühen Entwicklung von Knochenfischen auftraten. Die Macula densa hingegen taucht erst in der Phylogenese der Wirbeltiere auf. Exogen zugeführtes Renin oder Angiotensin erzeugt vasopressorische Effekte in spezifischen Vertretern aller Wirbeltierklassen und bewirkt eine Steigerung der Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde in Amphibien, Reptilien und möglicherweise auch Knochenfischen. Intrakranielle Gabe von Angiotensin konnte eine Steigerung des Trinkverhaltens bei Knochenfischen, Reptilien und Vögeln bewirken. Weiterhin sind Blutungen oder eine akute Hypotension starke Stimuli für die Reninausschüttung in Fischen und Vögeln. Berücksichtigt man diese Fakten in Zusammenschau mit der Tatsache, dass die Evolution der juxtaglomerulären Zellen der Entwicklung der Macula densa vorausgeht, entsteht der Eindruck, dass die Entwicklung des RAS in engem Zusammenhang mit Blutdruckregulation und Volumenhomöostase steht [1].

Die Geschichte des RAS in der modernen Medizin begann im 18. Jahrhundert mit der Entdeckung der Blutdruckmessung. Im weiteren Verlauf konnte das technische Know-how zur Blutdruckmessung rasch verbessert werden, was viele Wissenschaftler zur Forschung auf dem Gebiet der Blutdruckregulation inspirierte. Der erste Meilenstein wurde 1897 von TIGERSTEDT und BERGMANN gesetzt. Diese finnischen Wissenschaftler zerrieben Kaninchennieren und lösten das Pulver in physiologischer Kochsalzlösung, injizierten den Extrakt einem gesunden Kaninchen und konnten nachfolgend einen deutlichen Blutdruckanstieg beobachten. Diese neu entdeckte Substanz wurde auf Grund ihrer Herkunft „Renin“ genannt [2]. Seither hat sich das RAS immer mehr als wichtiger Modulator von Blutdruck und Volumenhaushalt herauskristallisiert und dadurch immer mehr an Bedeutung auch im klinischen Alltag erlangt. Aufgrund dieser Wirkungen wurde dem RAS schon frühzeitig eine pathophysiologische Rolle bei Hypertonie und anderen

kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben [3]. Es stellt eine Kaskade enzymatischer Reaktionen dar, an deren Ende der Haupteffektor Angiotensin II freigesetzt wird (Abb. 1).

Die Leistungsbreite des Kreislaufsystems hängt im Wesentlichen von der präzisen Regulation des Blutvolumens ab. Längerfristig wird dieses Blutvolumen über eine hormonelle Steuerung der Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz reguliert. Neben dem antidiuretischen Hormon (ADH) und dem Atriopeptin (ANP) spielt dabei das RAS die zentrale Rolle [4].

Das in den systemischen Kreislauf freigesetzte Renin spaltet dort von dem aus der Leber stammenden Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Das *Angiotensin converting enzyme* (ACE) spaltet davon, hauptsächlich bei der Passage durch den Lungenkreislauf, 2 Aminosäuren ab, sodass schließlich das aktive Octapeptid Angiotensin II vorliegt [4], [5]. Angiotensin II (Ang II) bindet dann an spezifische Rezeptoren in mehreren Organsystemen und entfaltet dort seine spezifische Wirkung, wobei hier zwei Subtypen (AT₁ und AT₂) von zentraler Bedeutung sind. Darüber hinaus, kann Ang II auch über Renin- und ACE-unabhängige Wege entstehen. Unter anderem baut ACE aktives Bradykinin ab, wodurch seine vasokonstriktorische Wirkung verstärkt wird (Abb.1).

1.2. Lokale Renin-Angiotensin-Systeme

Der Nachweis von Prorenin, Renin, Angiotensin I und Angiotensin II bei nephrektomierten Patienten ließ auf eine extrarenale Produktion dieser Moleküle rückschließen und deutete somit auf die Existenz lokaler RAS hin [6; 7]. Komponenten des RAS ließen sich in verschiedenen Organsystemen nachweisen, z.B. im Gehirn, Nebennieren, Herz, Arterien, Speicheldrüsen, Gonaden, Darm, Fettgewebe und Haut [8; 9; 10]. Hierbei kann das lokal synthetisierte Angiotensin II sowohl vor Ort (i. S. einer parakrinen Wirkung) als auch systemisch wirksam sein [8]. Die lokalen Effekte können dabei über die Volumen- und Elektrolytregulation hinausgehen. Beispielsweise spielt das RAS im Gehirn eine Rolle in der Regulierung des zerebralen Blutflusses, der Steuerung des Durstgefühls, beeinflusst die Ausschüttung von Vasopressin und hypophysären Hormonen und hat Einfluss auf Angiogenese, Neuronenwachstum und Lernprozesse [11].

Auf weitere lokale Wirkungen der einzelnen RAS-Komponenten soll im Folgenden noch eingegangen werden.

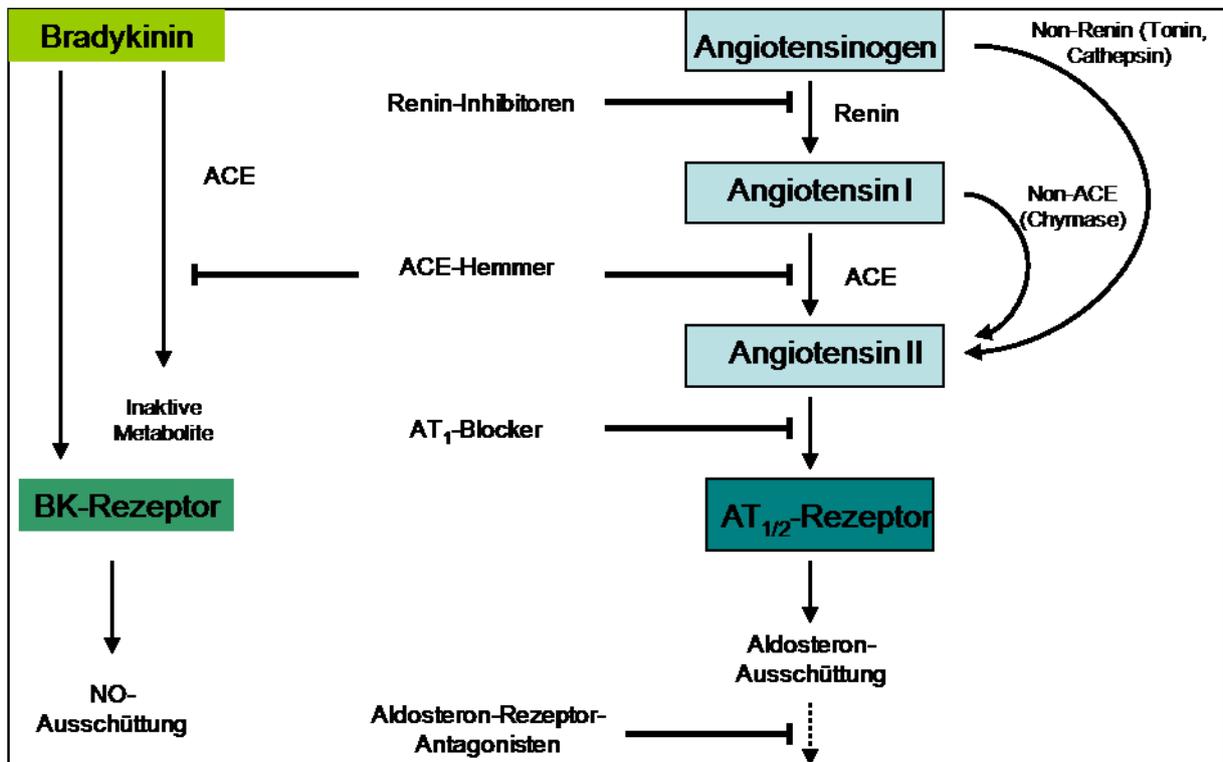


Abb. 1: Die Renin-Angiotensin-Kaskade (in Anlehnung an [12]):

Entstehung von Angiotensin II über ACE und ACE- und Renin-unabhängige Wege sowie Ziele der pharmakologischen Hemmung. Bradykinin ist ebenfalls ein Substrat von ACE und wird durch dessen Hilfe zu inaktiven Metaboliten hydrolysiert. Die Wirkungen von Angiotensin II über die Rezeptoren AT₁ und AT₂ sind vielfältig (s. Tab.1 u. 2). Hierzu gehört die Ausschüttung von Aldosteron, dessen Wirkung ebenfalls pharmakologisch antagonisiert werden kann.

1.3 Komponenten des RAS

1.3.1 Renin

Renin wird in den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet und gehört zu der Familie der Aspartylpeptidasen. Für Renin ist nur Angiotensinogen als endogenes Substrat bekannt. Zunächst liegt es als Form einer inaktiven Vorstufe, dem Präprorenin, vor, welches zu Prorenin katalysiert wird. Prorenin stellt 80 % des Gesamtrenins dar, ist aber enzymatisch inaktiv. Durch Abspaltung der Prosequenz

im Golgi-Apparat der Granulazellen wird das Prorenin in das proteolytisch wirksame Renin umgewandelt. Renin wird in geringen Konzentrationen in den Blutkreislauf ausgeschüttet, jedoch kann die Sekretion durch verschiedene Faktoren erheblich gesteigert werden. Diese Faktoren sind meist Ausdruck einer verminderten Flüssigkeitsmenge im Extrazellulärraum. Sinkt der Druck in der A. renalis um mehr als 10 – 15 mmHg ab, so kommt es zu einer drastischen Erhöhung der Reninaktivität im Plasma [2].

Eine Stimulation der β_1 – adrenergen Rezeptoren an den juxtaglomerulären Zellen, sowie eine verminderte Natriumkonzentration an der Macula Densa, führt ebenfalls zu einer erhöhten Reninausschüttung [4], [5]. Auch Prostaglandine, v. a. das Prostaglandin E₂, das eine wesentliche Rolle für die Durchblutung der Niere spielt, ist ein Aktivator des RAS [13].

Vor kurzem wurde ein funktioneller Rezeptor beschrieben, der Spezifität für Renin und Prorenin aufweist. Die mRNA dieses Rezeptors ist in Herz, Gehirn und Plazenta besonders hoch exprimiert, in Leber und Niere geringer. Dabei weist dieser Rezeptor eine duale Funktion auf. Zum Einen agiert er als Kofaktor für (Pro)Renin. Gebundenes Renin hydrolysiert Angiotensinogen 4-5fach effizienter als gelöstes Renin und auch das Prorenin, das im gelösten Zustand keine signifikante proteolytische Wirkung besitzt, kann nach Rezeptorbindung seine Enzymaktivität auf Niveau von gelöstem Renin steigern. Zum Anderen ist der (Pro)Reninrezeptor in der Lage, eine ligandenabhängige, intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang zu setzen. Dabei wird er an intrazellulären Serin- und Thyrosinresten phosphoryliert, was zu einer Aktivierung von Proteinkinasen führt [14].

1.3.2 Angiotensinogen

Angiotensinogen (AGTN) ist ein glykosyliertes α_2 -Plasmaglobulin und ist das einzige bekannte Substrat für Renin. Es wird hauptsächlich in der Leber hergestellt und stellt die direkte Vorstufe von Angiotensin I dar. AGTN gehört zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). In seiner Struktur ist es teilweise homolog zu α_1 -Antitrypsin. Glukokortikoide, Östrogene, Schilddrüsenhormone, Angiotensin II sowie eine bilaterale Nephrektomie stimulieren die Angiotensinogenproduktion und -freisetzung [15]. Mehrere Studien legen eine Korrelation zwischen den AGTN-

Konzentrationen im Plasma und dem arteriellen Blutdruck nahe und lassen auf einen Zusammenhang zwischen verschiedenen AGTN-Genotypen und der Prädisposition für eine essentielle Hypertonie schließen [16].

1.3.3 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

Angiotensin converting enzyme (ACE) ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase, die durch Abspaltung des Dipeptids Histidyl-Leucin, Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt. ACE ist ein unspezifisches Enzym, das auch das LH-Releasing Hormon, die β -Kette des Insulins, Substanz P, Enkephaline und Bradykinin abbauen kann. ACE-mRNA konnte vermehrt in Lunge und Hoden nachgewiesen werden. Der Ort an dem ACE hauptsächlich entsteht und wirkt, ist das Gefäßendothel, v.a. der Lunge. ACE ist ein Enzym mit zwei aktiven Zentren, einem N-terminalen und einem C-terminalen. Die wichtigsten Substrate, Angiotensin I und Bradykinin werden an beiden Zentren gleichermaßen metabolisiert. Bradykinin wird dabei zu inaktiven Metaboliten abgebaut [17]. Die Lokalisation des ACE ist besonders wichtig, wenn man die kurze Halbwertszeit des Angiotensin II bedenkt, die etwa eine Minute beträgt. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit ist es sinnvoll, dass die Umwandlung in das aktive Angiotensin II dort erfolgt, wo es schließlich auch seine Wirkung entfalten soll [5], [18].

Bei spontan hypertensiven Ratten, die als Modell für die Hypertonie beim Menschen dienen, wurde eine Korrelation zwischen der Hypertonie und einem Abschnitt auf Chromosom 10, der das ACE-Gen enthält, gezeigt. Im Gegensatz zu gesunden Tieren wurde dieser Abschnitt, der als BP1 (*blood pressure 1*) Gen bezeichnet wurde, nur in den hypertensiven Tieren nachgewiesen [2; 19]. Klinische Studien konnten jedoch noch nicht zweifelsfrei untermauern, dass dieser Sachverhalt auch auf den Bluthochdruck des Menschen zutrifft. Es konnte aber ein Zusammenhang zwischen spezifischen Mutationen des ACE-Gens und einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko belegt werden [20].

1.3.4 Synthese und Metabolismus der Angiotensinpeptide

Der Hauptweg der Angiotensin II-Bildung führt über die Spaltung von Angiotensin I durch ACE. Jedoch werden auch ACE-unabhängige Wege beschrieben (Abb. 1). Dabei gibt es Substanzen wie den Gewebe-Plasminogen-Aktivator („*tissue plasminogen activator*“, tPA), Cathepsin G und Tonin, die Angiotensin II direkt vom Angiotensinogen abspalten können. Chymase und Cathepsin G können Angiotensin I zu Angiotensin II hydrolysieren. Besonders die Chymase, die im menschlichen Herzen und im Gefäßendothel nachgewiesen wurde und die hochspezifisch Angiotensin II bildet, scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung der Hypertonie zu spielen [21]. Auch die Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen kann unabhängig von Renin, durch lysosomale Proteinasen erfolgen [22].

Der Abbau von Angiotensin I und II erfolgt durch Angiotensinasen, Peptidasen, die entweder am Amino- oder am Carboxyende der Moleküle Aminosäuren abspalten, oder aber im Sinne einer Endopeptidase Peptidbindungen im Inneren des Proteins spalten. Die daraus resultierenden Peptidfragmente bleiben im Kreislauf und scheinen ihrerseits bestimmte Funktionen auszuüben. Beispielsweise entsteht durch Abspaltung einer Aminosäure am N-terminalen Ende des Ang II das Angiotensin III. Dieses bindet an dieselben Rezeptoren und hat identische Funktionen wie das Angiotensin II. Hingegen scheint Angiotensin IV, welches durch eine weitere Abspaltung einer Aminosäure am N-terminalen Ende entsteht, an einen eigenen Rezeptorsubtypen (AT₄) zu binden und die Ausschüttung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI), einem starken anti-thrombolytischen Faktor, zu stimulieren. Inwiefern diese neu entdeckten Peptide und Rezeptorsubtypen von klinischer Relevanz sind werden zukünftige Studien zeigen [12].

1.4 Die Angiotensin-Rezeptoren

1.4.1 Der Angiotensin Typ-1 (AT₁) Rezeptor

Der humane AT₁-Rezeptor hat 359 Aminosäuren, genau wie bei Ratte und Maus. Im Gegensatz zum Menschen kommen bei Ratte und Maus jedoch zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors vor, AT_{1a} und AT_{1b}. Der AT₁-Rezeptor ist ein klassischer 7-transmembranärer, G-Protein gekoppelter Rezeptor. Er wird in Organen und Geweben exprimiert, die an der Regulation des Blutdruckes, des Volumen- und Elektrolythaushaltes beteiligt sind. Viele klinisch relevante Wirkungen von Angiotensin II werden dem AT₁-Rezeptor zugeschrieben [23]. Diese Wirkungen spielen seit je her eine lebenswichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer ausreichenden Organperfusion im Falle eines akuten Volumenverlustes. Heutzutage gewinnen die pathophysiologischen Folgen einer AT₁-Aktivierung und die dadurch hervorgerufenen Zivilisationskrankheiten immer mehr an Bedeutung [2].

1.4.1.1 Regulation der AT₁-Rezeptor Expression

Angiotensin II selbst vermindert die Expression seiner Rezeptoren in den glatten Muskelzellen, genau so wie Mineralokortikoide, Östrogen, Stickstoffmonoxid (NO) und all-trans-Retinsäure. Eine Stimulation der Expression erfolgt durch Glukokortikoide, „*insulin-like growth factor*“ (IGF-1), Progesteron und epidermale Wachstumsfaktoren. In den Gefäßen erfolgt durch Noradrealin eine Herunterregulierung der AT₁-Rezeptoren. Diese wird durch Aktivierung der α_1 -Adrenozeptoren vermittelt [23]. *Low-density-Lipoprotein* (LDL)-Cholesterin führt in Kulturen von glatten Muskelzellen, sowie bei hypercholesterinämischen Kaninchen zu einer vermehrten Expression des AT₁-Rezeptors. Ein hypercholesterinämischer Metabolismus führt beim Menschen ebenfalls zu einer Hochregulierung dieser Rezeptoren, eine Tatsache, die als Erklärung für die Assoziation von Hypercholesterinämie und Blutdruck dienen könnte [24]. Hingegen kommt es im Falle einer Sepsis wahrscheinlich durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und NO zu einer allgemeinen Herunterregulierung der AT₁-Rezeptor Expression. Dies erklärt das schlechte Ansprechen des Blutdrucks und der Aldosteronproduktion auf Gabe

von Angiotensin II bei Sepsis und könnte damit zum charakteristischen Bild des septischen Schocks beitragen [25].

1.4.1.2 AT₁-Rezeptor-gekoppelte Signaltransduktion

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der 7-transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist an mehreren Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die zu verschiedenen biologischen Wirkungen führen.

G-Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC), die ihrerseits Phosphatidylinositol zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert und deren Konzentration in der Zelle steigert. IP₃ bewirkt eine Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit eine Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen, sowie die Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Diese phosphoryliert und aktiviert somit Schlüsselproteine, die an Zellwachstum und Vasokonstriktion beteiligt sind [26]. Ang II induziert die vermehrte Expression von Protoonkogenen. Diese wirken als Transkriptionsfaktoren und bewirken die vermehrte Transkription von Wachstumsfaktoren [wie z.B. das „*platelet derived growth factor*“ (PDGF), „*epidermal growth factor*“ (EGF), „*insulin like growth factor 1*“ (IGF-1) oder „*transforming growth factor β*“ (TGF-β)], von Vasokonstriktoren wie z.B. Endothelin 1, von Adhäsionsmolekülen wie das „*intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM-1), von Integrinen und von „*Tumor necrose factor*“ (TNF) [23]. Auf diese Weise werden zelluläres Wachstum, Adhäsion, Zellmigration, interzelluläre Matrixablagerungen und adaptive Prozesse im Rahmen der Atherosklerose sowie bei Herzmuskel- und Gefäßremodelling von Ang II beeinflusst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ang II zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen in glatten Gefäßmuskelzellen führt. Diese beeinflussen die interzelluläre Interaktion und sind u.a. mit beteiligt an der Vermittlung von Vasokonstriktion, zellulärer Hypertrophie und Proliferation [27].

1.4.1.3 Funktionelle Bedeutung des AT₁-Rezeptors

Um die Funktion der AT_{1a}- und AT_{1b}-Rezeptoren zu eruieren wurden Knock-out Mäuse generiert, bei denen entweder AT_{1a} oder AT_{1b} oder beide Rezeptoren komplett ausgeschaltet wurden. Alle Gruppen zeigten eine normale intrauterine Entwicklung, postnatal gefolgt von geringer Gewichtszunahme, deutlich erniedrigtem Blutdruck und gestörter Nierenmorphologie sowie einem verkürzten postnatalen Überleben. Diese Symptome waren am ausgeprägtesten bei den Mäusen die weder AT_{1a} noch AT_{1b} exprimierten. Man schlussfolgerte, dass beide Subtypen sowohl für die Blutdruckregulation als auch für die somatische Entwicklung verantwortlich sind. Weiterhin zeigte sich, dass die Abwesenheit eines Rezeptorsubtypen von dem anderen teilweise kompensiert werden kann [28].

Zu den Haupteffekten des AT₁-Rezeptors gehört die generalisierte Vasokonstriktion, linksventrikuläres und vasales Zellwachstum, Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde, gesteigerte Natriumabsorption im proximalen Tubulus sowie die Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Nervenendigungen und die daraus folgende positive Chronotropie und Inotropie (Tab. 1) [2; 29]. Einige dieser Effekte sollen im Folgenden nun näher beleuchtet werden.

Die Vasokonstriktion wird über AT₁-Rezeptoren vermittelt die auf der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert werden. Hierbei ist die Vasokonstriktion in den Gefäßen der Niere am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Gehirn, Lunge und Skelettmuskulatur. Für dieses Phänomen kann sowohl lokal produziertes als auch zirkulierendes Ang II als Erklärung dienen [30].

Des Weiteren hat Ang II auf glatte Gefäßmuskelzellen eine mitogene Wirkung. Über die Produktion von bestimmten Wachstumsfaktoren wird die Herstellung von extrazellulärer Matrix, wie Proteoglykane, Fibronectin, Kollagen Typ I, Glykosaminoglykane und Chondroitin- und Dermatansulphate. Diese Stoffe sind u.a. auch am kardialen und renalen Remodeling beteiligt [31; 32]. Somit wird angenommen, dass der AT₁-Rezeptor bei der kardialen Hypertrophie beteiligt ist. Im Tiermodell konnte mittels AT₁-Antagonisten der Beginn einer Herzhypertrophie verhindert werden [33], oder eine bereits bestehende Hypertrophie teilweise sogar rückgängig gemacht werden [34].

Auch bei der Entstehung der Atherosklerose spielt Ang II eine zentrale Rolle. Über AT_1 wird die Produktion von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) bewirkt. Dadurch kommt es zur Adhäsion von Monozyten und Makrophagen, die an der Bildung von Schaumzellen beteiligt sind. Eine weitere Wirkung, die zur Atherosklerose beiträgt, ist die verminderte Freisetzung von NO, welches vasoprotektive Eigenschaften hat. Weiterhin erfolgt eine beschleunigte Oxidation von LDL. Tierversuche mit Affen konnten zeigen, dass im Rahmen einer stark cholesterinhaltigen Diät, mittels AT_1 -Antagonisten (Losartan) sichtbare Fettstreifen an der Aorta um bis zu 50% reduziert werden konnten und somit der Atherosklerose entgegengewirkt wurde [35].

Die gesteigerte Noradrenalinfreisetzung kommt durch präsynaptische AT_1 -Rezeptoren zustande. Zusätzlich bewirken sie ein besseres Ansprechen der Gefäßmuskulatur auf Noradrenalin, sodass adrenerge Stimuli verstärkt werden. Die Blockade dieser Rezeptoren sowie ein vermindertes Angebot an Ang II kann somit bei Krankheiten mit einer pathologisch gesteigerten sympathischen Aktivität, wie z.B. der kongestiven Herzinsuffizienz, eine therapeutische Option darstellen [36; 37].

Nicht zuletzt spielt der AT_1 -Rezeptor bei der Pathophysiologie der Thrombose eine wichtige Rolle. Ang II stimuliert die Entstehung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und Thrombozyten werden aktiviert [38]. Des Weiteren spielt auch hier die verminderte Freisetzung von NO und gleichzeitige Induktion von „*tissue factor*“ eine tragende Rolle bei der Thromboseentstehung. Dieser kann wiederum durch Blockade der Rezeptoren und der damit verbundenen Besserung der fibrinolytischen Plasmaparameter entgegengewirkt werden [39; 40]. Eine Studie mit Herzinsuffizienzpatienten konnte belegen, dass durch die Einnahme von Losartan, die Konzentration von PAI-1 signifikant gesenkt wurde, wobei gleichzeitig eine erhöhte Konzentration von tPA gemessen werden konnte [2; 41].

AT₁-Rezeptor vermittelte Wirkungen von Angiotensin II

- Vasokonstriktion (koronar, renal, cerebral)
- Positive Inotropie und Chronotropie
- Natriumretention (Aldosteronausschüttung)
- Wasserretention (Vasopressinausschüttung)
- Reninsuppression (negatives Feedback)
- Hypertrophie von Myozyten und glatter Gefäßmuskulatur
- Stimulation von vaskulärer und myokardialer Fibrose
- Aktivierung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
- Stimulation von Superoxidbildung
- Aktivierung des sympathischen Nervensystems
- Endothelinausschüttung

Tab.1: AT₁-Rezeptor vermittelte Wirkungen von Angiotensin II (in Anlehnung an [12]).

1.4.2 Der Angiotensin Typ-2 (AT₂) Rezeptor

Der AT₂-Rezeptor besteht aus 363 Aminosäuren, wobei die Sequenz nur zu 32-34 % mit der des AT₁-Rezeptors homolog ist. Das Gen des AT₂-Rezeptors befindet sich auf dem X-Chromosom [42]. Die Lokalisation des Gens sowie die Molekülgröße des Rezeptors sind bei Mensch, Maus und Ratte identisch. Die Aminosäuresequenz von Ratte und Maus zeigt eine 92-% Übereinstimmung mit der des menschlichen Rezeptors. Wie der AT₁-Rezeptor ist auch der AT₂-Rezeptor ein 7-transmembranäres Glykoprotein [43]. Die Signalwege sind noch nicht vollständig entschlüsselt, man vermutet jedoch, dass Tyrosin- und Serinphosphatasen, Stickstoffmonoxid, Phospholipase A₂ und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) daran beteiligt sind [44].

1.4.2.1 Regulation der AT₂-Rezeptor Expression

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des AT₂-Rezeptors in vitro durch Serumentzug, Gabe von Insulin, IGF-1, Interferon- γ (IFN- γ) oder Interleukin- β (IL- β) stimuliert wird [45; 46]. Hingegen konnte nach Zugabe von Serum,

Lysophosphatsäure, Phorbolster, Glukokortikoiden und diversen Wachstumsfaktoren wie PDGF eine verminderte Expression beobachtet werden [47]. In der Promotorregion des AT₂-Rezeptors konnten Sequenzen nachgewiesen werden, die bei der Expression des Rezeptors eine Rolle spielen könnten. So konnten beispielsweise mehrere Bindungsstellen für Interferon regulierende Faktoren (IRF) nachgewiesen werden. Hier kann man zwei Subtypen unterscheiden, die eine antagonistische Wirkung auf die Rezeptorregulation ausüben. IRF-1 scheint eine stimulatorische Wirkung auf die Expression zu haben, wohingegen IRF-2 die Zahl der AT₂-Rezeptoren vermindert [48]. Des Weiteren konnte eine „*insulin-response-sequence*“ (IRS) oder eine NF/IL-6-Bindungsstelle in der Promotorregion identifiziert werden. Letztere könnte am supprimierenden Effekt der insulinunabhängigen Wachstumsfaktoren und des IL-β beteiligt sein [2; 47]. Neben den eben geschilderten transkriptionalen Regulationsmechanismen unterliegt der AT₂-Rezeptor auch einer posttranskriptionalen Regulation. Hierbei wird durch die Besetzung des Rezeptors mit einem Liganden dessen Abbau verlangsamt [49].

1.4.2.2 AT₂-Rezeptor-gekoppelte Signaltransduktion

Die Signaltransduktionswege des AT₂-Rezeptors sind erst zum Teil entschlüsselt und noch Gegenstand intensiver Forschung. Auch wenn der Rezeptor strukturelle Merkmale eines 7-transmembranären Rezeptors aufweist, so fehlen doch klassische funktionelle Eigenschaften dieser Rezeptorklasse. Als Beispiel kann hier die teilweise fehlende Aktivierung von G-Proteinen in bestimmten Signalwegen dienen. Auch wenn eine G-Protein-Kopplung mit Binding Assays nachweisbar war, so war diese eher untypisch: Über die Aktivierung von G_{1α}-Proteinen konnte ein nach auswärts gerichteter Kalium-Strom in neuronalen Zellen bewirkt werden [50]. Ein Hauptmerkmal des AT₂-Signalwegs ist die Aktivierung von Phosphatasen. Hierbei spielen drei Phosphatasen eine zentrale Rolle, die durch den AT₂-Rezeptor aktiviert werden: die Tyrosin/Threonin-Phosphatase MKP-1 (mitogenaktivierte Proteinkinase-Phosphatase 1), die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (SH2-domain containing phosphatase 1) und die Serin/Threonin Phosphatase PP2A (Protein-Phosphatase 2A) [2; 51]. Man nimmt an, dass diese verschiedenen Phosphatasen an bestimmten Punkten in den jeweiligen Signaltransduktionskaskaden dephosphoryliert werden

und somit ihre Wirkung entfalten. So können sie beispielsweise Wachstumsfaktoren und auch direkt dem AT₁-Rezeptor entgegenwirken. Dieses als „Crosstalk“ bezeichnete Phänomen wurde für die extrazellulär signalregulierten Kinasen 1/2 (ERK 1/2) demonstriert [2; 52; 53]. Der Einfluss des AT₂-Rezeptors auf diese MAP-Kinasen ist sehr stark abhängig von dem Zelltyp und den biologischen Rahmenbedingungen. So konnte gezeigt werden, dass in neuronalen Zelllinien, die ausschließlich AT₂-Rezeptoren aufweisen, eine Stimulation mit Ang II in differenzierungsfreundlicher Umgebung zu einer initialen Aktivierung von ERK 1 und 2 führt. Erfolgte hingegen eine Stimulation der MAP-Kinasen mit NGF, konnte durch Zugabe von Ang II eine Hemmung dieser Kinasen bewirkt werden [54].

Ein weiterer wichtiger Signalweg des AT₂-Rezeptors findet über das NO/cGMP-System statt. Eine AT₂-induzierte NO-Freisetzung konnte in vaskulärem und neuronalem Gewebe nachgewiesen werden. Hierdurch wird im vaskulären Gebiet eine Vasodilatation bewirkt, im neuronalen Gewebe spielt das NO bei Differenzierungsprozessen und neuronalem Wachstum eine Rolle [55; 56; 57]. Der Anstieg von NO ist dabei fest mit der Freisetzung von endogenem Bradykinin verknüpft. Man konnte zeigen, dass der über AT₂-Rezeptoren vermittelte NO-abhängige cGMP-Anstieg durch Blockade von Bradykinin-Rezeptoren unterbunden werden konnte. Des Weiteren zeigen sich in AT₂-defizienten Mäusen sowohl die basalen als auch die Ang II-induzierten cGMP- und Bradykininspiegel erniedrigt [58; 59]. Jedoch scheint der NO-Anstieg nicht in allen Geweben bradykininabhängig zu sein. In neuronalen PC12 W Zellen konnte keine Änderung der cGMP-Konzentration durch Bradykininblockade verzeichnet werden. Diese Zellen stammen aus einer Zelllinie aus dem Phäochromozytom der Ratte ab und exprimieren ausschließlich AT₂-Rezeptoren [57].

Als weiterer Signalweg über einen Second-messenger wurde, wie auch für den AT₁-Rezeptor, ein sog. „Binding-Protein“ für den AT₂-Rezeptor beschrieben, welches AT₂-interacting protein (ATIP) oder AT₂-receptor binding protein of 50 kDa (ATBP50) genannt wird. Es wird beschrieben, dass ATIP, genau so wie der AT₂-Rezeptor zu einer Aktivitätsminderung von ERK 1 und 2 führt. Hierfür ist die Expression von AT₂-Rezeptoren in derselben Zelle notwendig. Wird Ang II an den Rezeptor gebunden, so wird der hemmende Effekt verstärkt, die Bindung ist jedoch nicht zwingend notwendig um die Wirkung auszulösen. In welcher Weise die Hemmung der Kinasen erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Theorie besagt, dass ATIP an der

Regulation der Rezeptorexpression beteiligt ist oder eine intrazelluläre, ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors hervorruft. Des Weiteren konnte auch, wie beim AT₂-Rezeptor, eine proliferationshemmende Wirkung nachgewiesen werden [60; 61].

In Kardiomyozyten von Ratten konnte über AT₂ eine Aktivierung des Na⁺/HCO₃⁻-Symporters und nachfolgende Freisetzung von Arachidonsäure beobachtet werden. Hierdurch kann über den AT₂-Rezeptor die Regulation des intrazellulären pH-Wertes vorgenommen werden [62].

1.4.2.3 Funktionelle Bedeutung des AT₂-Rezeptors

Durch Deletion des den AT₂-Rezeptor codierenden Gens konnten sog. AT₂-Rezeptor-knock-out-Mäuse erzeugt werden. Dies war ein bedeutender experimenteller Ansatz zur Aufklärung der Funktionen des AT₂-Rezeptors. Im Vergleich zum Wildtyp fielen diese Mäuse durch ein signifikant gesteigertes Trinkverhalten, erniedrigte Schmerzschwelle, vermindertes exploratives Verhalten, erhöhte Körpertemperatur, erhöhten spontanen Blutdruck sowie stärkeren Blutdruckanstieg nach Gabe von Ang II auf. Des Weiteren zeigte sich ein erniedrigter renaler Bradykininspiegel, erniedrigte NO-Produktion, eine gesteigerte Rate urogenitaler Fehlbildungen und erhöhte Prädisposition für Nierenerkrankungen [63].

Auf zellulärer Ebene wirkt der AT₂-Rezeptor proliferationshemmend und induziert die Apoptose. Der antiproliferative Effekt konnte in koronaren Endothelzellen nachgewiesen werden [64]. Durch eine erhöhte AT₂-vermittelte Expression von Thrombospondin-1 konnten eine Inhibition von Wachstum sowie ein Remodeling der extrazellulären Matrix in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen beobachtet werden [31]. Weiterhin sah man in in-vivo Versuchen, dass eine Überexpression von AT₂-Rezeptoren in geschädigten Karotiden von Ratten die Bildung einer Neointima beeinträchtigte oder bei der mikrovaskulären Angiogenese im M. cremaster der Ratte eben dieser entgegenwirkt [23; 65]. Der über den AT₂-Rezeptor vermittelte Stillstand des Zellzyklus ist Voraussetzung für eine nachfolgende Zelldifferenzierung oder ggf. Apoptose. Eine weitere Differenzierung der Zelle könnte hierbei über eine Modifikation des Zytoskeletts bewerkstelligt werden. Dies konnte in neuronalem

Gewebe gezeigt werden, nachdem nach Ang II-Gabe eine erhöhte Konzentration von Beta-Tubulinpolymeren gemessen werden konnte [66; 67]. Die AT₂-Rezeptor-vermittelte Apoptose konnte in vielen verschiedenen Zellkulturen belegt werden [64; 66]. Interessanterweise zeigte sich dabei in einigen Zelltypen (Fibroblasten, Epithelzellen und glatten Muskelzellen), dass eine Überexpression des AT₂-Rezeptors alleine, auch ohne die Bindung eines Liganden, genügt um eine Apoptose auszulösen [68]. Die über den AT₂-Rezeptor vermittelte Apoptose konnte auch in vivo gezeigt werden. So konnte über die direkte Blockade des AT₁-Rezeptors eine Abnahme von aortaler Gefäßmasse durch gesteigerte Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen verzeichnet werden. Über ACE-Inhibition blieb dieser Effekt aus [69].

Im kardiovaskulären System spielt der AT₂-Rezeptor am ehesten in pathologischen Situationen wie Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt eine Rolle. In eben solchen Situationen konnte eine verstärkte Expression des Rezeptors nachgewiesen werden. BUSCHE et al. sowie auch andere Gruppen konnten zeigen, dass während in gesunden Kardiomyozyten von Ratten nur auf etwa 10 % der Zellen AT₂-Rezeptoren gefunden werden, der Anteil an AT₂-Rezeptor-exprimierenden Zellen nach einem myokardialen Infarkt bis auf 50 % ansteigt [70]. Hinweise dafür, dass diese Überexpression auch eine funktionelle Bedeutung hat, erbrachten Versuche mit AT₂-Rezeptor-defizienten Mäusen. Hierbei zeigten sich eine höhere Mortalität sowie auch eine höhere Inzidenz einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt bei den Tieren ohne AT₂-Rezeptor. Somit lässt sich dem AT₂-Rezeptor eine kardioprotektive Rolle zuschreiben [71]. Widersprüchliche Daten zeigen sich im Fall der isolierten Herzinsuffizienz. Hier konnte sowohl eine Überexpression bei Herzinsuffizienz mit interstitieller Fibrose, als auch eine verminderte Expression gezeigt werden. Der Grund für diese diskrepanten Ergebnisse könnte in der Zellspezifität gesehen werden, da zum einen die Überexpression in Fibroblasten bei Begleitfibrose [72] und zum anderen die Unterexpression in kardialen Myozyten gemessen wurde [73]. Auch im Falle der linksventrikulären Hypertrophie zeigen sich diskrepante Ergebnisse. So konnte gezeigt werden von BARTUNEK et al., dass durch eine Blockade des AT₂-Rezeptors eine Hypertrophie verstärkt werden kann [74]. Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass bei AT₂-Rezeptor-defizienten Mäusen die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie bei Hypertonie ausblieb [75].

Bei der Blutdruckregulation scheint der AT₂-Rezeptor eine modulatorische Rolle zu spielen. AT₂-defiziente Mäuse haben einen leicht erhöhten Blutdruck bei diskret verminderter Natriumauscheidung. Verabreicht man diesen Tieren Ang II so resultiert jedoch eine deutlich ausgeprägtere und überschießende Blutdrucksteigerung im Vergleich zu den AT₂-Rezeptor exprimierenden Mäusen [76]. Analog hierzu ist erkennbar, dass bei Ang II induzierter Hypertonie die pharmakologische Blockade des AT₁-Rezeptors zu einer Normalisierung des Blutdruckes, hingegen die Blockade des AT₂-Rezeptors zu einer weiteren Drucksteigerung führt [59].

AT₂-Rezeptor vermittelte Wirkungen von Angiotensin II
<ul style="list-style-type: none">• Antiproliferation• Inhibition von Zellwachstum• Zelldifferenzierung• Apoptose• Gewebeerneuerung• Vasodilatation• Intrauterine Organentwicklung von Nieren und Harntrakt

Tab. 2: AT₂-Rezeptor vermittelte Wirkungen von Angiotensin II (in Anlehnung an [12]).

1.5 Kardiovaskuläre und pathologische Wirkungen von Angiotensin II

In der heutigen Wohlstandsgesellschaft stellen die arterielle Hypertonie, die Atherosklerose, die Herzinsuffizienz und der Myokardinfarkt die kardiovaskulären Erkrankungen mit der höchsten Inzidenz dar [77]. Diese Erkrankungen stehen sowohl in ätiopathogenetischem als auch in kausalem Zusammenhang, den man auch als „kardiovaskuläres Kontinuum“ bezeichnet [78]. Eine arterielle Hypertonie gehört zusammen mit dem Diabetes mellitus und einer Dyslipidämie zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose. Eine zunehmende Sklerosierung der Koronargefäße führt zu einer koronaren Herzerkrankung mit daraus resultierender Ischämie des Myokards. Kommt es durch das Aufplatzen einer atherosklerotischen Plaque zum thromboembolischen Verschluss einer

Koronararterie folgen daraus eine Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt. Im Falle eines Infarktes kommt es zum Untergang von Herzmuskelgewebe. Abhängig von der betroffenen Fläche resultieren daraus lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen bis hin zum akuten Herzversagen. Wird diese akute Phase des Infarktes überlebt, treten in späteren Phasen Umbauvorgänge (sog. Remodeling) im Bereich der Infarktnarbe auf. Die Kontraktilität des Myokards ist in diesem Bereich verloren gegangen. Bei großen Narben kann auch eine Wandschwäche mit dilatativer Veränderung auftreten. Die Folge ist ein Funktionsverlust des Myokards mit eingeschränkter Pumpfunktion bis hin zur terminalen Herzinsuffizienz [77].

Wie bereits ausgeführt, ist Ang II an der physiologischen Regulation von kardiovaskulären Mechanismen entscheidend beteiligt. Im Falle einer Überstimulation des RAS und daraus resultierenden hohen Ang II Spiegeln verstärkt Ang II die Progression des kardiovaskulären Kontinuums auf allen Stufen. Meistens geschieht dies über den AT₁-Rezeptor. Das ist der ausschlaggebende Grund für den therapeutischen Einsatz von Pharmaka, die das RAS an verschiedenen Stellen in der ablaufenden Kaskade hemmen.

Die WHO definiert eine arterielle Hypertonie ab 140/90 mmHg [77]. Blutdruckwerte oberhalb dieser Grenze sind mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko assoziiert, sodass eine antihypertensive Behandlung indiziert ist, denn mit steigendem Blutdruck steigt auch das Risiko für Folgeerkrankungen kontinuierlich an. Es werden drei Schweregrade der Hypertonie unterschieden (Tab. 3).

Klassifikation	Systolisch	Diastolisch
Normal	< 130	< 85
Hochnormal	130 – 139	85 – 89
Leichte Hypertonie = Schweregrad I	140 – 159	90 – 99
Mittelschwere Hypertonie = Schweregrad II	160 – 179	100 – 109
Schwere Hypertonie = Schweregrad III	> 180	> 110
Isolierte systolische Hypertonie	> 140	< 90

Tab. 3: Klassifikation von Blutdruckbereichen in mmHg (in Anlehnung an [79])

In Industrieländern haben etwa 10 – 15 % der Erwachsenen eine milde Hypertonie mit RR-Werten zwischen 140/90 und 160/95 mmHg. Weitere 10 – 15 % weisen Werte über 160/95 mmHg auf. Die Prävalenz des Bluthochdrucks steigt mit dem Lebensalter an, so zeigt sich beispielsweise die isolierte systolische Hypertonie nahezu nur bei über Sechzigjährigen. Der größte Teil der Patienten (90 %) leidet dabei an einer primären Hypertonie. Hierbei handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose, d.h. dass zunächst eine sekundäre Hypertonie, z.B. aufgrund einer Nierenarterienstenose, endokrinologischen Grunderkrankungen oder Medikamenteneinnahme ausgeschlossen werden muss. Als Auslöser einer primären Hypertonie wird das Zusammenspiel mehrerer Faktoren betrachtet. Hierzu zählen eine erbliche Komponente, eine Ernährung mit erhöhtem NaCl-Gehalt, Fett- und Alkoholkonsum, Übergewicht und psychischer Stress. Die Art der Behandlung richtet sich nach dem kardiovaskulären Gesamtrisiko. Eine Risikostratifizierung erfolgt anhand von Risikofaktoren (Schweregrad der Hypertonie, Diabetes, Nikotinabusus, Alter, Familienanamnese), nach Grad von Organschäden (Linksherzhypertrophie, Proteinurie, Retinopathie) und Folge- und Begleiterkrankungen (KHK, Herzinsuffizienz). Die Leitlinien empfehlen für alle Schweregrade zunächst nichtmedikamentöse Maßnahmen wie Gewichtsreduktion, regelmäßiges körperliches Training, Entspannungsübungen und natriumreduzierte Kost. Eine medikamentöse Therapie ist in jedem Fall bei Schweregrad III indiziert, bei Schweregrad I und II muss diese anhand des jeweiligen persönlichen Risikos des Patienten evaluiert werden. Bei sehr hohem Risiko liegt das 10-Jahresrisiko, einen kardiovaskulär bedingten Tod durch Apoplex oder Myokardinfarkt zu erleiden, bei über 30 % [79]. Die arterielle Hypertonie stellt eine Volkskrankheit mit einer erheblichen Mortalität dar, deren Prävalenz aufgrund der aktuellen demographischen Entwicklung mit einer immer älter werdenden Bevölkerung, weiter ansteigt. Deshalb sind Forschung und weitere Anpassung von Therapiekonzepten auf diesem Gebiet von eminenter Wichtigkeit. Gerade die primäre Hypertonie ist in ihrer Entstehung noch nicht vollständig erfasst. Im Folgenden sollen hierzu Erklärungsansätze aus der Sicht des RAS und speziell anhand von Ang II vermittelten Wirkungen erfolgen.

Die Wirkungen der im Kreislauf zirkulierenden RAS-Komponenten beinhalten die Regulation und Aufrechterhaltung des Natrium- und Volumenhaushaltes, sowie der Herz-Kreislauffunktion. Ang II führt sowohl direkt, durch Aktivierung von AT₁-Rezeptoren im Gefäßsystem, als auch indirekt, durch Steigerung des

Sympathikotonus und Freisetzung von Vasopressin zur Vasokonstriktion. Eine arterielle Vasokonstriktion führt zur Zunahme des peripheren Widerstandes und somit zur Hypertonie [80]. Weiterhin bewirkt Ang II durch Stimulation von renalen AT₁-Rezeptoren im proximalen Tubulus und indirekt durch Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere, eine erhöhte Natrium- und Wasserrückresorption. Hierdurch kommt es ebenfalls zu einer Blutdrucksteigerung [23]. Ein arterieller Hypertonus begünstigt seinerseits die Entstehung der Atherosklerose. Zum einen werden durch den mitogenen Effekt von Ang II auf die glatten Gefäßmyozyten Umbauvorgänge verursacht. Zum anderen entsteht durch eine erhöhte Durchflussgeschwindigkeit auch ein vermehrtes Auftreten von Scherkräften an der Gefäßwand. Dies zieht ebenfalls Umbauvorgänge nach sich. Es kommt zu einer Zunahme der Mediadicke und dadurch einer Abnahme des Gefäßlumens [81]. Weiterhin bewirkt Ang II eine Zunahme von Sauerstoffradikalen in den Gefäßendothelzellen. Hierdurch wird endotheliales NO und die dadurch induzierte Gefäßrelaxation inaktiviert. Dies wird als ausschlaggebender Faktor für die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques diskutiert [82; 83]. Schließlich führt die arterielle Hypertonie zu einer verstärkten hämodynamischen Belastung und damit zu einer linksventrikulären Hypertrophie. Ang II selbst ist jedoch auch ein eigenständiger Faktor, der zur Hypertrophie des linken Ventrikels führt [84].

1.6 Inhibition des RAS

Ang II, das Endprodukt des RAS, spielt also eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung des kardiovaskulären Kontinuums. Es ist somit von größter klinischer Bedeutung dieses Kontinuum zu durchbrechen und damit die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen zu senken. Hierzu gibt es bereits einige etablierte sowie auch neue Substanzen, die innerhalb der RAS-Kaskade eingreifen (Abb. 2).

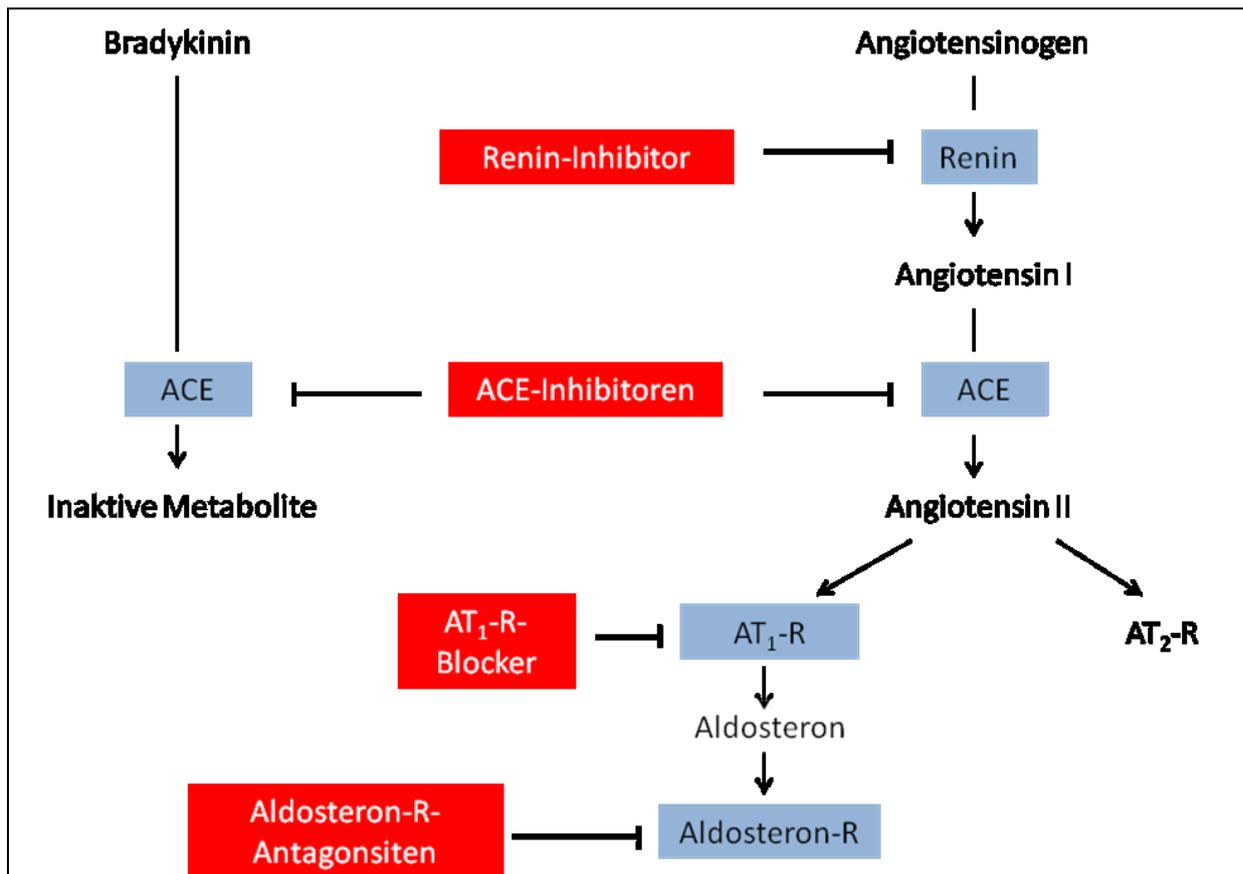


Abb. 2: Ansatzpunkte unterschiedlicher Arzneimittel entlang der RAS-Kaskade (in Anlehnung an [12]): $AT_{1/2}$ -R = $AT_{1/2}$ -Rezeptor, Aldosteron-R = Aldosteron-Rezeptor, ACE = Angiotensin converting enzyme. Der Renininhibitor greift am frühesten in die RAS-Kaskade ein, bindet an Renin und verhindert dadurch die Konversion von Angiotensinogen zu Angiotensin I. ACE-Inhibitoren verhindern die ACE-abhängige Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II. Gleichzeitig wird der Abbau von Bradykinin gehemmt, welches für spezifische Nebenwirkungen der ACE-Inhibitoren verantwortlich ist. AT_1 -R-Blocker binden kompetitiv an den AT_1 -R und verhindern somit, dass Angiotensin II seine Wirkung an diesem Rezeptor entfalten kann. Aldosteron-R-Antagonisten binden an den intrazellulären Aldosteron-R und verhindern dadurch die Bindung und somit auch die spezifischen Wirkungen des Aldosterons.

1.6.1 ACE-Inhibitoren

ACE-Inhibitoren hemmen das *Angiotensin converting enzyme* und unterbinden damit die Bildung von Ang II. Sie wurden im Rahmen von Studien zur Erforschung der Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II entdeckt. Inzwischen sind diese Substanzen ein fester Bestandteil von antihypertensiven Therapieschemata. Zusätzlich sind einige dieser Präparate bei Patienten mit diversen Komorbiditäten wie

Herzinsuffizienz, linksventrikulärer Hypertrophie, Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus mit Proteinurie indiziert, da sie kardio- und nephroprotektive Eigenschaften aufweisen [85; 86]. Insgesamt sind heutzutage 17 verschiedene ACE-Hemmer im klinischen Gebrauch. Zu ihnen gehören Substanzen wie Captopril, Ramipril oder Lisinopril. All diese Substanzen binden an das aktive Zentrum des *Angiotensin converting enzyme* und verhindern somit eine Bindung zwischen ACE und seinen wichtigsten Substraten, Angiotensin I und Bradykinin. Die ACE-Hemmer unterscheiden sich in ihrer Tertiärstruktur, sodass sie mit unterschiedlichen Bindungsstellen an das ACE binden. Hierdurch ergeben sich auch Unterschiede in ihrer Wirkungsdauer [87]. Die antihypertensive Wirkung ergibt sich nicht nur aus der verminderten Produktion von Ang II sondern auch durch eine Akkumulation von Bradykinin, da dieses nicht hydrolysiert wird. Seinerseits bewirkt Bradykinin die Ausschüttung von vasodilatatorischen Prostaglandinen (PGE₂ und PGI₂) und NO. Diese Substanzen haben wiederum eine antihypertensive, vasoprotektive und antioxidative Wirkung. Weiterhin bewirkt Bradykinin die Ausschüttung von tPA und wirkt somit thrombolytisch [88]. Die Akkumulation von Bradykinin könnte jedoch für die Nebenwirkungen der ACE-Hemmer, wie Reizhusten oder dem Angioödem verantwortlich sein. Als neuer Therapieansatz erfolgt daher beim Quincke-Ödem die subkutane Gabe von Bradykinin-Inhibitor (Icatibant) [89]. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Studien, die belegen, dass ACE-Hemmer die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Hypertonie, linksventrikulärer Dysfunktion nach Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und KHK senken [90].

1.6.2 Angiotensin₁-Rezeptor-Blocker

Eine neuere Substanzklasse von Antihypertensiva, die in das RAS eingreift sind die Angiotensin-Rezeptor-Blocker (AT₁-Blocker). Diese stellten sich als sehr effektiv heraus und werden in der Regel von den Patienten sehr gut vertragen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass sie über die antihypertensive Wirkung hinaus auch eine kardio- und vasoprotektive Wirkung entfalten. Zu ihnen gehören Substanzen wie Losartan, Valsartan oder Candesartan. Sie binden gezielt an den AT₁-Rezeptor und besetzen die 7-transmembranäre Domäne durch Interaktion mit den

Aminosäureresten dieser Rezeptorregion. Hierdurch wird eine Bindung von Ang II an den Rezeptor und folglich auch das Auftreten von den zuvor beschriebenen AT₁-vermittelten Wirkungen verhindert. Die Rezeptorbindung kann kompetitiver oder nicht-kompetitiver Art sein. Eine Bindung an den AT₂-Rezeptor findet nicht statt. Hierdurch wird dieser indirekt aktiviert, da das negative Feedback für die Reninausschüttung entfällt. Somit kommt es zu einer Aktivierung der RAS-Kaskade und weiteren Produktion von Ang II. Da dieses nun aber nicht an den AT₁-Rezeptor binden kann, muss es auf den AT₂-Rezeptor ausweichen [91]. Mehrere Studien haben das niedrige Nebenwirkungsprofil der AT₁-Blocker belegt. Klassische unerwünschte Wirkungen der ACE-Hemmer wie Reizhusten und das Angioödem treten bei Therapie mit AT₁-Blocker nur vereinzelt auf, vergleichbar mit einem Placebo. Mitunter kann man das Auftreten von Hyperkaliämien beobachten, v.a. bei Patienten mit Niereninsuffizienz, jedoch kommt dies seltener vor als bei ACE-Hemmern. Generell werden AT₁-Blocker bei chronischer Niereninsuffizienz gut vertragen, da sie, im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, hauptsächlich über die Leber ausgeschieden werden [44; 91]. Als weitere günstige Auswirkung konnte, lediglich bei Losartan, ein urikosurischer Effekt beobachtet werden. Dieser hängt mit einer Interaktion zwischen Losartan und dem Harnsäuretransport im proximalen Tubulus zusammen [92]. Im klinischen Alltag spielen die AT₁-Blocker bei der antihypertensiven Therapie, nicht zuletzt aufgrund höherer Tagestherapiekosten, noch eine untergeordnete Rolle und werden meist als Reservemedikamente bei Unverträglichkeit einer Therapie mit ACE-Hemmern angewendet.

1.6.3 Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten

Obwohl sie nicht direkt in das RAS eingreifen, sollen die Aldosteron-Rezeptor Blocker hier dennoch kurz erwähnt werden. Neben ihrer blutdrucksenkenden Wirkung bei Patienten mit essenzieller Hypertonie, konnte auch eine Reduktion von perivaskulärer Fibrose, linksventrikulärer Hypertrophie und endothelialer Dysfunktion verzeichnet werden. Des Weiteren zeigte sich unter Blockade von Aldosteron, zusätzlich zur konventionellen Therapie, eine deutliche Senkung von Morbidität und Mortalität bei schwerer Herzinsuffizienz [93].

Es scheint sich immer mehr herauszukristallisieren, dass ein Überschuss an Aldosteron mehr zur Entstehung einer Hypertonie beiträgt als ursprünglich angenommen. Das Auftreten einer Hypokaliämie als Voraussetzung für das Vorliegen eines primären Hyperaldosteronismus hat sich nicht bewahrheitet. Vielmehr sah man, dass hierbei eine Hypertonie als einziges Symptom auftreten kann [94]. Somit hat man das Screening für Hyperaldosteronismus bei hypertensiven Patienten ausgeweitet und es wurden Prävalenzraten zwischen 8 und 32 % berichtet. Hieraus lässt sich die klinische Relevanz dieser Substanzklasse ableiten. Gerade bei diesen Patienten zeigen Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten, deren wichtigster Vertreter Spironolaktone ist, eine sehr hohe Wirksamkeit [94].

Ein großer Nachteil von Spironolaktone ist jedoch die anti-androgene Wirkung. Diese wird der Affinität zu anderen Steroid-Rezeptoren geschuldet und bewirkt unerwünschte Wirkungen wie Gynäkomastie, Impotenz und Menstruationsstörungen. Um diese Nebenwirkungen zu minimieren wurde Eplerenon als selektiver Aldosteron-Rezeptor Antagonist entwickelt [95].

1.6.4 Direkte Renin-Inhibition

Als neueste Substanz, die auf das RAS wirkt, kam der direkte Renininhibitor Aliskiren im März 2007 auf den Markt. Es ist der erste oral verfügbare Renininhibitor, der für die Therapie der essentiellen Hypertonie zugelassen wurde. Es ist eine hydrophile, Nicht-Peptid-Verbindung, die direkt an Renin bindet und damit die Konversion von Angiotensinogen zu Angiotensin I unterbindet. Folglich wird hierdurch die Bildung von Ang II durch ACE oder über ACE-unabhängige Wege reduziert. Nach oraler Applikation wird Aliskiren schnell resorbiert und zum größten Teil unverändert über das hepatobiliäre System ausgeschieden. Die Einnahme erfolgt einmal täglich in einer Dosis von 150 mg oder 300 mg. Hierunter zeigte sich in mehreren Studien mit über 12.000 hypertensiven Patienten eine effektive und langfristige blutdrucksenkende Wirkung bei sehr guter Verträglichkeit [96]. Die Reninaktivität im Plasma wird um bis zu 80 % reduziert, selbst bei gleichzeitiger Gabe von Thiaziddiuretika, ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern, alles Stoffe, die an sich die Reninaktivität steigern [97]. Zusätzlich gibt es bereits vorläufige Daten, die bei Aliskiren nephroprotektive und antiproteinurische Eigenschaften vermuten

lassen [98]. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Aliskiren das Potential hat eine echte Alternative zu den ACE-Hemmern und AT₁-Blockern in der Behandlung der arteriellen Hypertonie, aber auch anderer kardiovaskulären und nephrologischen Erkrankungen, zu werden. Die Ergebnisse einiger derzeit durchgeführter Studien stehen derzeit noch aus und es fehlt die Langzeiterfahrung mit dieser Substanzklasse. Eine Kombination dieser Stoffe erschien initial vielversprechend, da hierbei ein synergistischer Effekt in der Blutdrucksenkung und wohl auch in kardio- und nephroprotektiver Wirkung gezeigt werden konnte [99; 100]. Allerdings zeigte sich jüngst, dass eine Kombinationstherapie mit Aliskiren und ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern bei Patienten mit Diabetes mellitus oder einer eingeschränkten Nierenfunktion mit einer GFR < 60 ml/min, i. R. der ALTITUDE-Studie, zu einer Anhäufung unerwünschter Ereignisse führte. Hierbei konnte eine höhere Inzidenz von Schlaganfällen, Synkopen, renalen Komplikationen, Hyperkaliämien und Hypotonien verzeichnet werden, sodass bei diesen Patienten eine Kombinationstherapie kontraindiziert ist [101; 102; 103] und auch für andere Patientengruppen nicht mehr empfohlen wird. Weiterhin konnte nicht gezeigt werden, dass die Patienten von der genannten Kombinationstherapie profitieren, sodass die Studie vorzeitig beendet wurde [103; 104]. Eine Kombination von Aliskiren mit Kalziumkanalblockern und/oder Thiaziddiuretika ist weiterhin möglich und stellt eine wirkungsvolle antihypertensive Therapieoption dar [105].

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das RAS spielt eine tragende Rolle in der Regulation des Volumenhaushaltes und des Blutdruckes. Daraus entstehende Pathologien und deren Behandlung stellen einen zentralen Punkt der alltäglichen klinischen Arbeit dar.

Die Komponenten des RAS konnten in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen eines lokalen, organgebundenen Renin-Angiotensin-Systems hindeutet. Die Niere stellt diesbezüglich ein zentrales Organ dar. Sie ist nicht nur der Ort der Reninsynthese und –ausschüttung, es stellte sich heraus, dass auch andere Komponenten des RAS renal produziert werden. Die meisten Daten diesbezüglich wurden in Experimenten mit Ratten erhoben. Über die intrarenale Expression der RAS-Komponenten in Mäusen ist relativ wenig bekannt. Die natürliche Physiologie dieser Spezies zieht jedoch, auch in Anbetracht der Möglichkeit Knock-Out Modelle zu generieren, immer mehr Interesse an. Somit erscheint es sehr interessant, das lokale RAS in der Mausniere unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es, über die mRNA-Expression die RAS-Komponenten Renin, Angiotensinogen, AT_{1a} -, AT_{1b} - und AT_2 -Rezeptoren sowie ACE entlang des Nephrons der Maus zu lokalisieren. Im Einzelnen bestehen die Aufgaben in der Mikrodissektion von Mäusenieren nach Kollagenaseverdau, um definierte Nephronsegmente zu gewinnen, Isolierung von mRNA und Vergleich der mRNA Expression in den einzelnen Nephronabschnitten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien:

Agarose	Cambrex
BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>)	PAA-Laboratories
Chloroform (CHCl ₃)	Sigma-Aldrich
DNA-Ladder	MBI Fermentas
dNTP	Amersham
Ethanol 70% (EtOH)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid 2 %	Sigma-Aldrich
First strand buffer 5 x	Promega
Glycin	Merck
Guanidinthiozyanat 4 mol/l	Sigma-Aldrich
Isoflouran	Abbott
Isopropanol 100%	Sigma-Aldrich
Kollagenase 248 U/μg	Worthington
Loading Dye	MBI Fermentas
MEM (<i>Minimal Essential Medium</i>)	Biochrom
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Na-Acetat [Na(CH ₃ COO)] 2M	Sigma-Aldrich
Oligo-dT	Sigma-Aldrich
PCR-Primer	MWG-Biotech
PCR-Puffer 10x	Promega
Phenol	Sigma-Aldrich
Reverse Transcriptase (RT) Enzym	GIBCO Life Tech.
Taq-Polymerase	Roche
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich

Deionisiertes Wasser (dH₂O) wurde zum Ansetzen von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen verwendet. RNA-Analysen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser durchgeführt. Hierfür wurde 1 l dH₂O mit 1 ml 97% DEPC (v/v) versetzt und über Nacht inkubiert. Die Inaktivierung des verbleibenden DEPCs erfolgte durch Autoklavieren.

Versuchstier:

Männliche Mäuse C57 – BL/6

Charles River

Geräte:

Mikroskop

Helmut Hund GmbH

Lichtquelle

Zeiss

Zentrifuge

Eppendorf

PCR-Blockcycler

MWG Biotech

Photocapturing Software

Bio 1D, Vilber Lourmat
Biotechnology

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrodissektion

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend mit einer Guillotine enthauptet. Das Abdomen wurde eröffnet, beide Nieren entnommen und auf Eis gelegt. Danach wurde jede Niere paramedian mit einem Skalpell angeschnitten und eine dünne Scheibe gewonnen. Diese Scheibe wurde nun weiter in drei Zonen unterteilt: Cortex, innere und äußere Medulla. Jeder Abschnitt wurde anschließend parallel zum Nephronverlauf in ca. 2 mm große Teile geschnitten und in 2 ml Kollagenaselösung gegeben. Es wurde abwechselnd bei jeder Mikrodissektion einmal Cortex und innere Medulla, oder einmal äußere Medulla verdaut. Diese Vorgehensweise bietet sich an, da der Cortex relativ schnell verdaut wird, so dass danach die innere Medulla, deren Verdau wesentlich länger dauert, gesammelt werden kann. Insgesamt wurden 3 Sammlungen erstellt, die alle Segmente eines Nephrons enthalten. Für eine vollständige Sammlung wurden somit zwei Nieren von je zwei Tieren verwendet.

Die Kollagenaselösung besteht aus 2,4 mg Trypsin-Inhibitor, 19 mg Glycin und 21 mg Kollagenase 248 U/mg in 50 ml MEM-Lösung aufgelöst. Die Reagenzgläser mit der Verdauungslösung wurden in ein Wasserbad gestellt und für 15 Minuten auf 37°C erwärmt. Währenddessen wurden mehrere Probenröhrchen mit je 2 ml 1% BSA vorbereitet. Dafür sind 700 mg BSA in 70 ml MEM aufgelöst worden. Nach den ersten 15 Minuten im Wasserbad wurde die Verdauungsflüssigkeit vorsichtig abpipetiert und verworfen. Erst nach dem zweiten Zyklus wurde die abpipetierete Verdauungslösung in ein Röhrchen mit BSA gegeben und ca. 10 Minuten auf Eis gestellt bis sich die Nephronabschnitte auf dem Boden des Röhrchens abgesetzt haben. Währenddessen wurde in das Reagenzglas wieder 2 ml Verdauungslösung gegeben und zu einem weiteren Zyklus in das Wasserbad gestellt. Es wurden so viele Zyklen wiederholt bis die erforderliche Menge an Nephronabschnitten gesammelt (s. unten) oder bis alles vollständig verdaut war.

Nachdem sich die Strukturen absedimentiert haben, wurde der Überstand abpipetiert und verworfen. Das Sediment wurde mit einer weiten Pipettenspitze aufgenommen, um Abscherungen zu vermeiden und in eine kleine Petrischale in 1 ml MEM

suspendiert. Die Petrischale wurde unter ein Mikroskop gelegt und mittels einer sehr feinen Nadel die Strukturen vorsichtig herausgesucht, voneinander getrennt, vermessen, bzw. abgezählt und mit einer 10 µl Pipette abgesaugt. Jede Struktur wurde in ein Eppendorf-Cup in 400 µl Lösung D mit Mercaptoethanol suspendiert.

2.2.3 Die segmentspezifischen Strukturen entlang des Nephrons

In Cortex, äußerer oder innerer Medulla sind die jeweils spezifischen Strukturen isoliert und gesammelt worden.

Cortex:

Glomerulus mit Arteriole (Glo+), Glomerulus ohne Arteriole (Glo-), proximaler convoluter Tubulus (PCT), corticaler dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife (cortical thick ascending limb – cTAL), distaler convoluter Tubulus (DCT), corticales Sammelrohr (cortical collecting duct – CCD).

Äußere Medulla:

Proximaler gerader Tubulus (proximal straight tubule – PST), absteigender Ast der Henle-Schleife (descending thin limb – dTL), medullärer dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife (medullary thick ascending limb – mTAL), Sammelrohr der äußeren Medulla (outer medullary collecting duct – OMCD).

Innere Medulla:

Dünnere Teil der Henle-Schleife (thin limb –TL), Sammelrohr der inneren Medulla (inner medullary collecting duct – IMCD).

Es wurden so viele Zyklen verdaut bis von jeder Struktur eine erforderliche Mindestmenge bzw. -länge gesammelt war (Abb. 3). Nachdem diese Mindestmenge erreicht war, ist das Cup mit dem in Lösung D suspendierten Material verschlossen, wasserfest beschriftet und tiefgekühlt bei – 80 °C gelagert worden. Nachdem in einer Sitzung Cortex und innere Medulla und in der nächsten Sitzung äußere Medulla gesammelt wurde, hat man also nach 2 Sitzungen ein gesamtes Nephron gesammelt, so dass man zum nächsten Schritt, der RNA Isolierung aus den gesammelten Strukturen, gehen konnte.

Struktur	Mindestmenge bzw. -länge
Glo –	21 Stück
Glo +	21 Stück
PCT	11 mm
PST	11 mm
dTL	15 mm
TL	20 mm
mTAL	15 mm
cTAL	15 mm
DCT	15 mm
CCD	11 mm
OMCD	11 mm
IMCD	11 mm

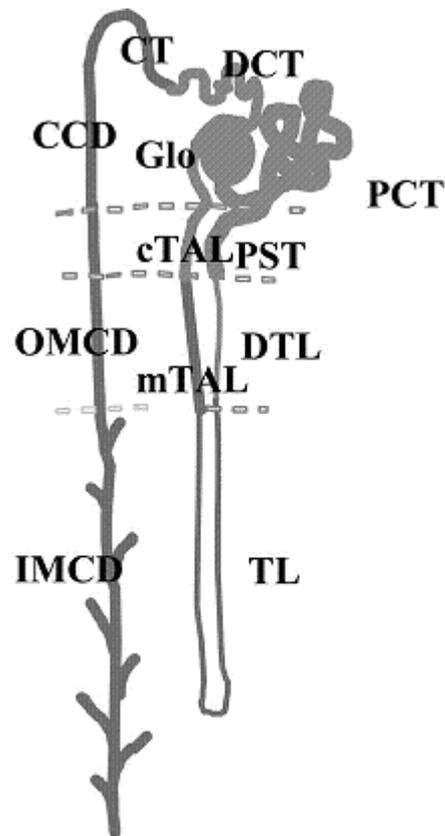


Abb. 3: Strukturen des Nephrons und Mindestmenge bzw. -länge für die Sammlung (in Anlehnung an [106]). Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

2.2.4 RNA – Isolierung

Für die RNA – Isolierung wurden die eingefrorenen Cups mit Lösung D und Tubuli bzw. Glomeruli, sowie eine Leerprobe, auf Eis aufgetaut, gevortext und kurz abzentrifugiert. Die Cups wurden der physiologischen Reihenfolge des Nephrons nach aufgestellt (Abb. 3) und zunächst mit 12 µg tRNA vermengt. Danach erfolgte die Zugabe von 40 µl 2M Natriumacetat [Na(CH₃COO)], 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform [CHCl₃]. Nach jeder Zugabe wurden die Cups gevortext, um eine gute Vermischung zu gewährleisten. Danach wurden die Proben 15 Minuten auf Eis gestellt und schließlich 20 Minuten bei 12.000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C zentrifugiert. Dadurch sind 2 Phasen entstanden. Etwa 350 µl der oberen Phase

wurden vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in 400 µl Isopropanol 100 % übertragen. Diese neuen Cups wurden beschriftet, gevortext und mindestens eine Stunde bei – 20 °C gelagert. Danach wurden die Proben erneut 20 Minuten lang bei 12.000 Umdrehungen/min und 4 °C zentrifugiert. Bei dieser Prozedur ist am Boden jedes Eppendorf-Cups ein die RNA enthaltendes Pellet entstanden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Cups erneut 20 Minuten lang nach oben genanntem Protokoll zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig wieder abgesaugt und verworfen. Die Cups wurden in eine Speed-Vac-Zentrifuge überführt, wo sie ca. 2 Minuten im Vakuum zentrifugiert wurden, um die Pellets zu trocknen. Die Pellets wurden anschließend in 9 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die so erhaltenen 9 µl RNA wurden für die RT-PCR angesetzt.

2.2.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mittels reverser Transkriptase (RT), einem Enzym aus Retroviren. Diese Enzyme verwenden RNA als Matrize und synthetisieren an das 3'-Ende eines Primers die komplementäre DNA (cDNA). Hierzu wurden 9 µl RNA mit 1µl Oligo-DTs (Oligonukleotidprimer) versetzt, zentrifugiert, gevortext und noch einmal kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Proben für bei 65 °C für 5 Minuten in den Blockcycler gestellt, damit die Oligo-DTs an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl dNTP, 4 µl First Strand Buffer (5x), 3 µl DEPC-H₂O und 1 µl RT. Danach wurden die Proben für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und schließlich für 2 Minuten auf 94 °C erhitzt. Somit wurden 22 µl cDNA erhalten, die für die PCR weiter verwendet wurden.

2.2.6 PCR

Aus der zuvor gewonnenen DNA wurden die gesuchten Genabschnitte durch die „Polymerasekettenreaktion“ (PCR) amplifiziert. Die PCR erlaubt die millionenfache selektive Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Spezifität dieser Reaktion für eine gesuchte Sequenz in der Ziel-DNA wird dabei durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern erreicht, welche die ausgesuchte Sequenz sowohl auf dem (+) als auch auf dem (-) Strang begrenzen. Zunächst wurden die DNA-Stränge durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Bei Abkühlung auf 54 °C banden die Primer spezifisch an ihren komplementären Abschnitt in der DNA an die jeweils flankierenden Sequenzen des zu vervielfältigenden Genabschnitts. Nach Erhitzen der Lösung auf 72 °C synthetisierte die Taq-Polymerase die komplementären DNA-Stränge. Diese drei Schritte der Strangtrennung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese liefen mehrfach wiederholt durch die Änderung der Temperatur in dem Reaktionsansatz ab. Durch die Thermoresistenz der verwendeten Taq-DNA-Polymerase konnten die neusynthetisierten DNA-Stücke aufgeschmolzen werden und die in der Lösung im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer lagerten sich dadurch nicht nur an die parentalen DNA-Stränge, sondern auch an die neusynthetisierten Stränge an. Danach synthetisierte die Taq-Polymerase erneut die komplementären Stränge [5].

Von der in der reversen Transkription gewonnenen cDNA, wurden je 2 µl jedes Nephronsegments in ein frisches Eppendorf-Cup überführt. Es erfolgte die Zumischung von 1 µl Sense-Primer und 1 µl Antisense-Primer (jeweils 10 - 20 pmol/µl, verwendete Primer s. Tab. 6), 2 µl dNTP (2,5 mM), 2 µl PCR-Puffer 10 x und 1 µl Taq-Polymerase (1U/µl). Jedes Cup wurde anschließend ad 20 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Zusätzlich zu den Nephronsegmenten wurden noch vier Kontrollproben nach gleichem Protokoll angesetzt. Die erste Probe enthielt cDNA der Mausniere in unverdünnter Form, die zweite Probe war 1:20 und die dritte Probe 1:100 verdünnt. Die vierte Probe stellte die Negativkontrolle dar und enthielt statt cDNA, 2 µl DEPC-H₂O. Alle Proben wurden zentrifugiert, gevortext und anschließend noch einmal zentrifugiert. Schließlich wurden die Proben in den Blockcycler gestellt und nach folgendem Protokoll inkubiert (Tab. 4).

Phasen	Temperatur	Dauer
Denaturierungsphase	94°C	2:00 min
30/32 Zyklen mit jeweils:		
Denaturierungsphase	94°C	0:30 min
Annealingphase	60°C	0:30 min
Synthesephase	72°C	1:00 min
Kühlung	4°C	-

Tab 4: Standard PCR-Protokoll in Anlehnung an [106]

Alle Sammlungen wurden einer PCR mit Aktin unterzogen. Diese wurde mit 30 Zyklen durchgeführt.

Um die Ergebnisse zu verifizieren erfolgten anschließend PCRs mit speziellen Primern zur Bestätigung der jeweiligen Strukturen. Hierfür wurden Primer gewählt, die nur in einem spezifischen Segment ein positives PCR-Signal hervorrufen (Tab. 5). Somit konnte bei Nachweis der jeweiligen mRNA in einem bestimmten Segment dieses bestätigt und eine Kontamination mit benachbarten Segmenten je nach Expressionsprofil ausgeschlossen werden.

Danach erfolgte für jede Sammlung eine PCR mit den Primern Renin, AGTN, AT_{1a}, AT_{1b}, AT₂ und ACE der Maus, beruhend auf bekannte cDNA Sequenzen aus der Gen Bank (Tab. 6), mit 32 Zyklen.

Primer	Sense- und Antisense-Primer	Spezifisches Segment
NKCC-2A	5'-CTT-CTT-TCC-ACC-ATG-GTA-3' 5'-ACC-ATG-CTG-GCC-ATC-TTC-3'	mTAL
NKCC-2B	5'-CGG-CTT-AGC-CGT-GAC-AGT-3' 5'-ACC-ATG-CTG-GCC-ATC-TTC-3'	cTAL
SGLT-1	5'-TCT-AGC-CTT-GGG-CCT-GGA-3' 5'-GAG-CCC-AGG-CCA-CGG-CAT-GTC-3'	PST
SGLT-2	5'-GGC-CTG-GCA-GGG-ACT-GGC-GC-3' 5'-CAG-TGC-CGC-CAG-CCC-TCC-3'	PCT
Aquaporin 4	5'-AGC-ATC-ATG-GTG-GCT-3' 5'-TCA-CTG-CTG-GCC-ATG-3'	CCD, OMCD, IMCD

Tab. 5: Markerprimer zur Bestätigung von PCR-Segmenten in Anlehnung an [106].

NKCC = Natrium-Kalium-2-Chlorid Co-Transporter Isoformen 2A und 2B, SGLT 1/2 = Natrium-Glukose Transporter Isoformen 1 und 2, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, PST = proximal straight tubule, PCT = proximal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

Primer	Gen Bank Zugangs-Nr.	Sense- und Antisense-Primer	Fragmentlänge
Renin	X16642	5' -ATG-AAG-GGG-GTG-TCT-GTG-GGG-TC-3' 5'-ATG-TCG-GGG-AGG-GTG-GGC-ACC-TG- 3'	194 bp
AGTN	NM_007428	5'-CTG-GCC-GCC-GAG-AAG-CTA-G- 3' 5'-CCC-CAC-CAC-AAT-GGA-CTG-TA- 3'	340 bp
AT _{1a}	S37484	5'-CCT-GTG-GGC-TGT-CTA-TAC-CG- 3' 5' -GGG-AAC-AGG-AAG-CCC-AGG- 3'	374 bp
AT _{1b}	S37491	5' -GCC-GGC-CGT-CAT-CCA-CCG- 3' 5'-CAT-GGA-TGA-CGC-CCA-GCT-G- 3'	316 bp
AT ₂	NM_007429	5' -TCC-TTT-TGA-TAA-TCT-CAA-C- 3' 5' -CAA-ACA-CTT-TGC-ACA-TCA-CA- 3'	317 bp
ACE	J04946	5' -CTG-CGT-AGA-GGT-GCC-AAC-C -3' 5' -ACG-GTG-TCA-CGT-TTG-GGA-TG -3'	337 bp
β-Actin	M12481	5' -CCG-CTC-TAG-GCA-CCA-AGG-TG -3' 5'-GGC-TGG-GGT-GTT-GAA-GGT-CTC-AAA-3'	286 bp

Tab. 6: Verwendete Primer, Nukleotidsequenz und Länge des PCR-Produktes

AGTN = Angiotensinogen, AT_{1a/1b/2} = Angiotensin-Rezeptor-1a/1b/2, ACE = Angiotensin converting enzyme, bp = Basenpaare

2.2.7 Gelelektrophorese

Für jede Elektrophorese wurde ein 2 % Agarosegel aus 2 g Agarose, 100 ml TBE-Lösung 1x und 2 µl Ethidiumbromid hergestellt.

Die fertigen PCR-Produkte wurden mit Loading Dye (10x), einem fluoreszierendem Farbstoff, versetzt, zentrifugiert und gevortext. Anschließend wurden sie in die Taschen des Agarosegels pipettiert. In die erste Tasche des Gels erfolgte dabei immer die Zugabe eines DNA-Längenstandards. Die Probenreihenfolge entspricht der Reihenfolge der Nephronabschnitte. Auf der oberen Hälfte des Agarosegels befinden sich von links nach rechts: GLO -, GLO+, PCT, PST, DTL, TL, mTAI, cTAL, DCT, CCD, OMCD, IMCD. Auf der unteren Hälfte befindet sich eine Leerprobe, eine Probe unspezifischer Nieren-DNA von der Maus, eine Verdünnung dieser Probe von 1:20, eine weitere Verdünnung von 1:100 und eine Probe die lediglich DEPC-Wasser enthält und somit also noch eine Leerprobe darstellt. Das Gel wurde anschließend für 45 min an eine Spannung von 120 mV angeschlossen. Danach wurde das Gel photographiert und das Ergebnis dokumentiert.

3. Ergebnisse

Nachfolgend werden die erhobenen Ergebnisse dargestellt. Diese wurden März 2012 im *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* publiziert [107].

Die Expression von Renin, AGTN, AT_{1a}, AT_{1b}, AT₂ und ACE wurde mittels RT-PCR ermittelt. Hierbei wurde die mRNA-Expression in drei verschiedenen Sammlungen von Nephronsegmenten untersucht, die jeweils von verschiedenen Tieren stammten. Im Folgenden wird das Ergebnis einer Sammlung repräsentativ für das Ergebnis aller drei Sammlungen gezeigt.

3.1 Aktin

Zunächst erfolgte eine PCR mit dem Primer Aktin über 30 Zyklen, um zu beweisen, dass die jeweilige Sammlung genügend Material enthält (Abb. 4). Nur Sammlungen mit deutlichem Aktinsignal wurden für die folgenden Untersuchungen weiter verwendet.

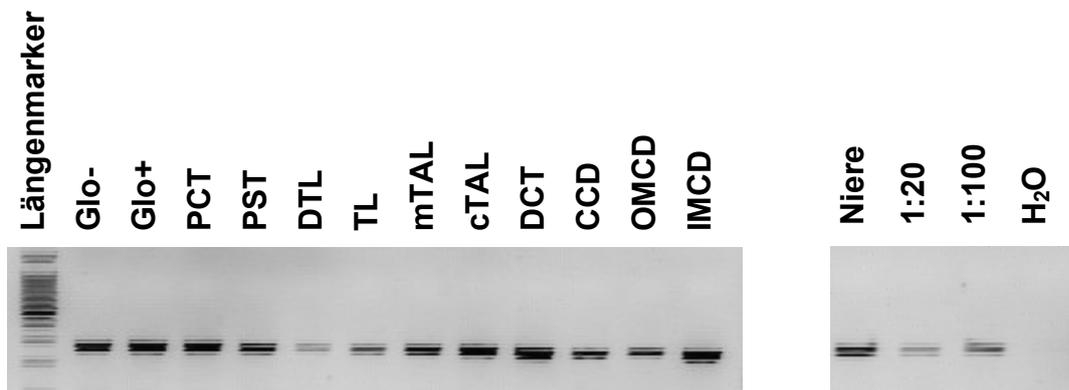


Abb. 4: Links: PCR (30 Zyklen) mit Aktin. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.2 Bestätigungen

Um eine Kontamination oder eine mögliche Verwechslung zwischen bestimmten Segmenten ausschließen zu können wurden PCRs mit segmentspezifischen Markerprimern durchgeführt (Tab. 5).

Zunächst wurde mit den kortikalen Strukturen PCT, cTAL und DCT eine PCR mit dem PCT-spezifischen Marker SGLT-2 gefahren. Hierbei ergab sich ein positives Signal für PCT und kein Signal für cTAL und DCT (Abb. 5).

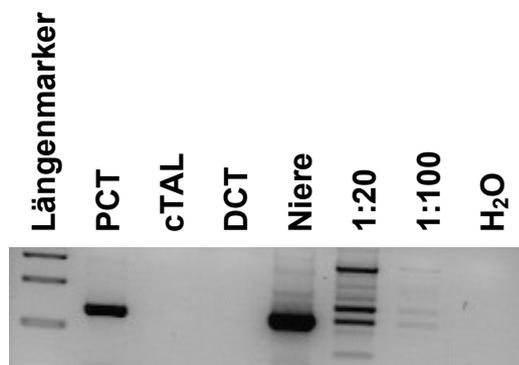


Abb 5: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit SGLT-2 mit pos. Signal im PCT bei Negativität im cTAL und DCT. PCT = proximal convoluted tubule, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule. SGLT-2 = Natrium-Glukose-Transporter Isoform 2.

Weiterhin wurden PCT und PST mit CCD, OMCD und IMCD mit dem Sammelrohrspezifischen Marker Aquaporin-4 aufgetragen. Bei positivem Signal für CCD, OMCD und IMCD konnten die Sammelrohrsegmente bestätigt werden (Abb. 6).

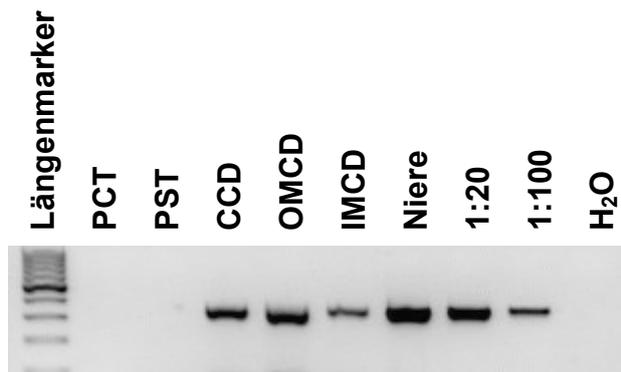


Abb. 6: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit Aquaporin 4 zur Bestätigung der Sammelrohrsegmente. Ein negatives Signal im PCT und PST schließt eine Kontamination von PCT und PST mit Sammelrohrsegmenten aus. PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

PCT, CCD, OMCD und IMCD wurden weiterhin mit dem PCT-spezifischen Marker SGLT-2 inkubiert. Hier zeigte sich ein positives PCT-Signal bei Negativität in den Sammelrohren. Somit konnte eine Kontamination zwischen proximalem Tubulus und Sammelrohr ausgeschlossen werden (Abb. 7).

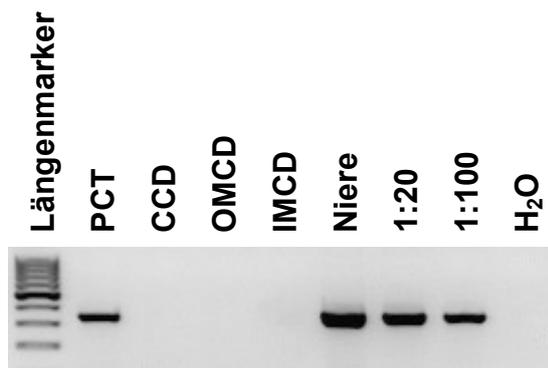


Abb. 7: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit SGLT-2 zum Ausschluss einer Kontamination von Sammelrohren mit PCT. PCT = proximal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct. SGLT-2 = Natrium-Glukose-Transporter Isoform 2.

Als nächstes wurden mTAL und cTAL einmal mit NKCC-2A (mTAL-spezifisch) und einmal mit NKCC-2B (cTAL-spezifisch) gefahren. Somit konnte eine Kontamination zwischen diesen beiden Strukturen ausgeschlossen werden (Abb. 8).

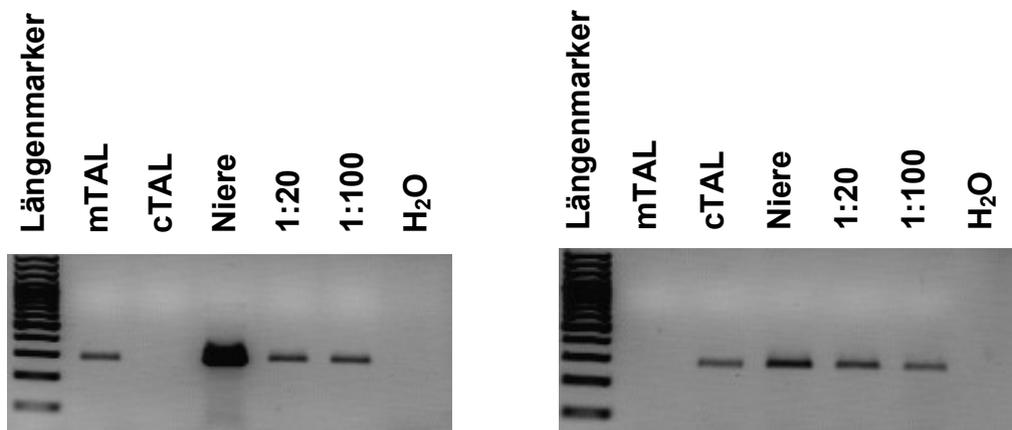


Abb. 8: Links: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit NKCC-2A mit pos. Signal im mTAL bei neg. Signal im cTAL. Rechts: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit NKCC-2B mit pos. Signal im cTAL bei Negativität im mTAL. mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, NKCC-2A/B = Natrium-Kalium-2-Chlorid-Co-Transporter Isoformen 2A und 2B.

Schließlich wurden PST und mTAL einmal mit SGLT-1 (PST-spezifisch) und einmal mit NKCC-2A (mTAL-spezifisch) inkubiert, sodass auch für diese 2 Strukturen der äußeren Medulla eine Kontamination oder Verwechslung während der Mikrodissektion ausgeschlossen werden konnte (Abb. 9).

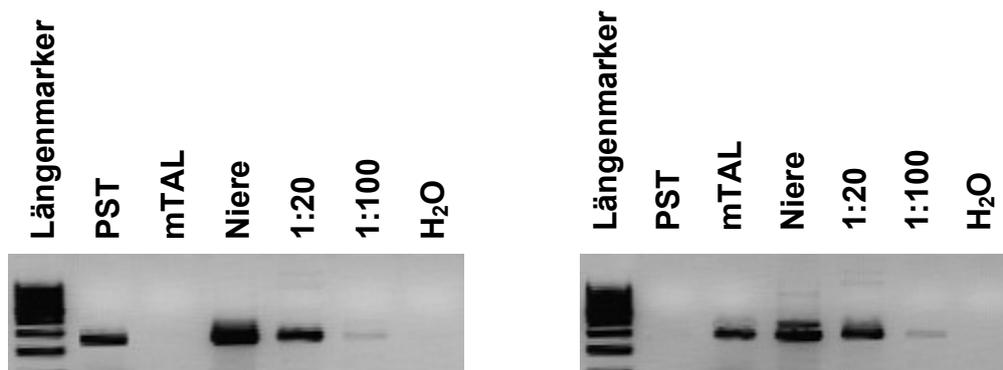


Abb. 9: Links: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit SGLT-1 und pos. Signal im PST und neg. Signal im mTAL.. Rechts: Bestätigungs-PCR (32 Zyklen) mit NKCC-2A und pos. Signal im mTAL bei Negativität im PST. PST = proximal straight tubule, mTAL = medullary thick ascending limb, SGLT-1 = Natrium-Glukose-Transporter Isoform 1, NKCC-2A = Natrium-Kalium-2-Chlorid-Co-Transporter Isoform 2A.

3.3 Renin

Für Renin zeigte sich nach 32 Zyklen eine deutliche Expression in Glo +, Glo -, PCT, PST, DCT und CCD (Abb. 10).

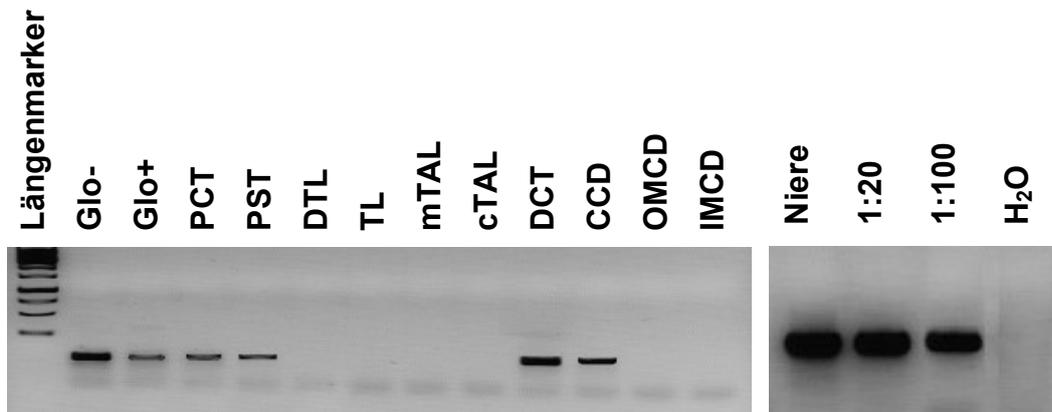


Abb. 10: Links: PCR (32 Zyklen) mit Renin. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.4 Angiotensinogen (AGTN)

Eine Expression von Angiotensinogen fand sich nach 32 Zyklen in PCT, PST, DTL und mTAL. Hierbei zeigte sich eine ausgeglichene Signalintensität (Abb. 11).

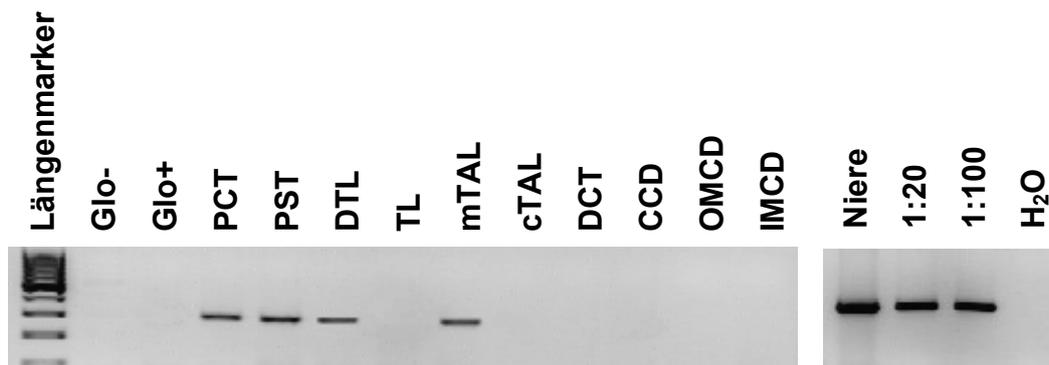


Abb. 11: Links: PCR (32 Zyklen) mit AGTN. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.5 AT_{1a}-Rezeptor

Eine Expression von AT_{1a}-mRNA fand sich nach 32 Zyklen in Glo +, Glo – und PCT (Abb. 12).

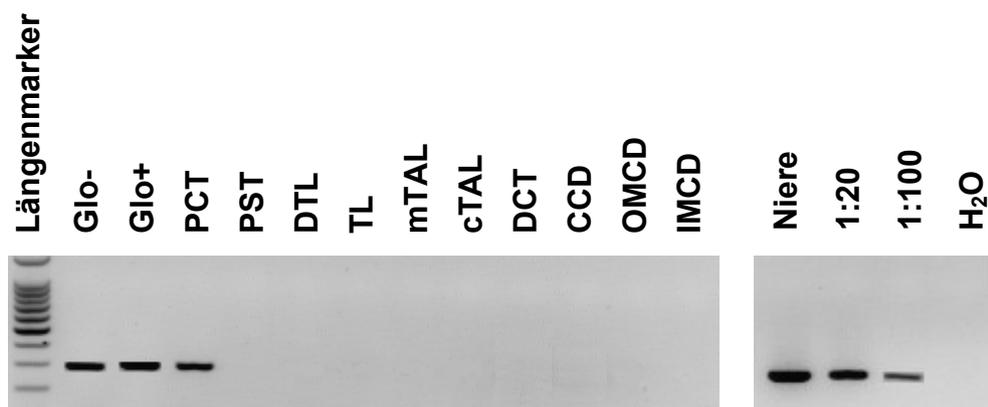


Abb. 12: Links PCR (32 Zyklen) mit AT_{1a}. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.6 AT_{1b}-Rezeptor

AT_{1b}-mRNA ließ sich in Glo+, Glo- und PCT nachweisen (Abb. 13).

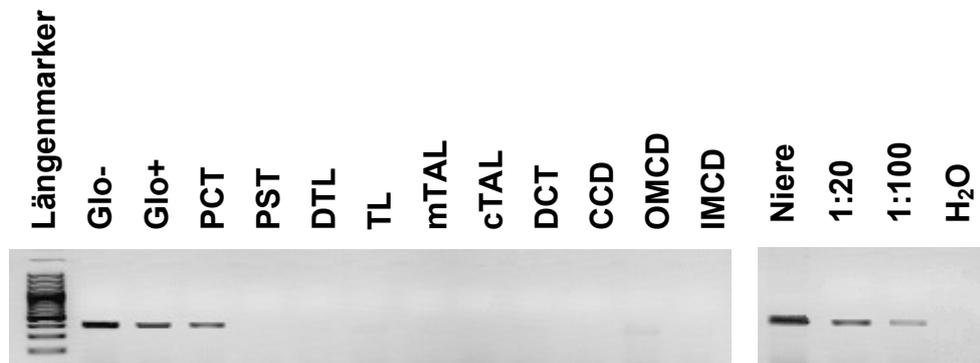


Abb. 13: Links: PCR (32 Zyklen) mit AT_{1b}. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.7 AT₂-Rezeptor

Analog zu den beiden AT₁-Rezeptor-Isoformen war AT₂ mRNA in Glo-, Glo+ und PCT nachweisbar (Abb. 14).

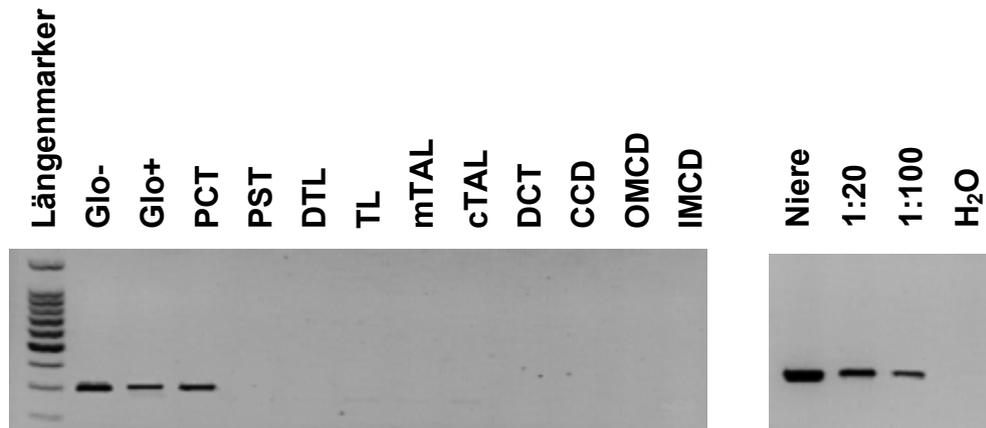


Abb. 14: Links: PCR (32 Zyklen) mit AT₂. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.8 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

In allen drei Sammlungen konnte trotz positivem Signal in der Positivkontrolle entlang des gesamten Nephrons kein mRNA-Signal für ACE nachgewiesen werden (Abb. 15).

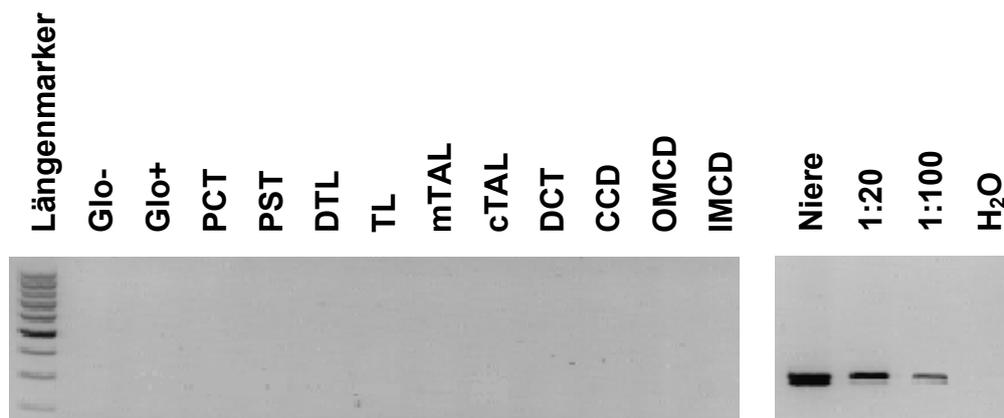


Abb. 15: Links: PCR (32 Zyklen) mit ACE. Rechts: Positivkontrolle mit Verdünnung 1:20 und 1:100 sowie Negativkontrolle. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Abschließend werden die erhobenen Ergebnisse tabellarisch und schematisch zusammengefasst (Tab. 7 und Abb. 16).

	Glo-	Glo+	PCT	PST	dTL	TL	mTAL	cTAL	DCT	CCD	OMCD	IMCD
Renin	X	X	X	X					X	X		
AGTN			X	X	X		X					
AT _{1a}	X	X	X									
AT _{1b}	X	X	X									
AT ₂	X	X	X									
ACE												

Tab. 7: mRNA Expression der RAS Komponenten entlang des Mausnephrons, tabellarische Zusammenfassung. Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct, AGTN = Angiotensinogen, AT_{1a/1b/2} = Angiotensin-Rezeptor Isoformen 1a/1b/2, ACE = Angiotensin converting enzyme.

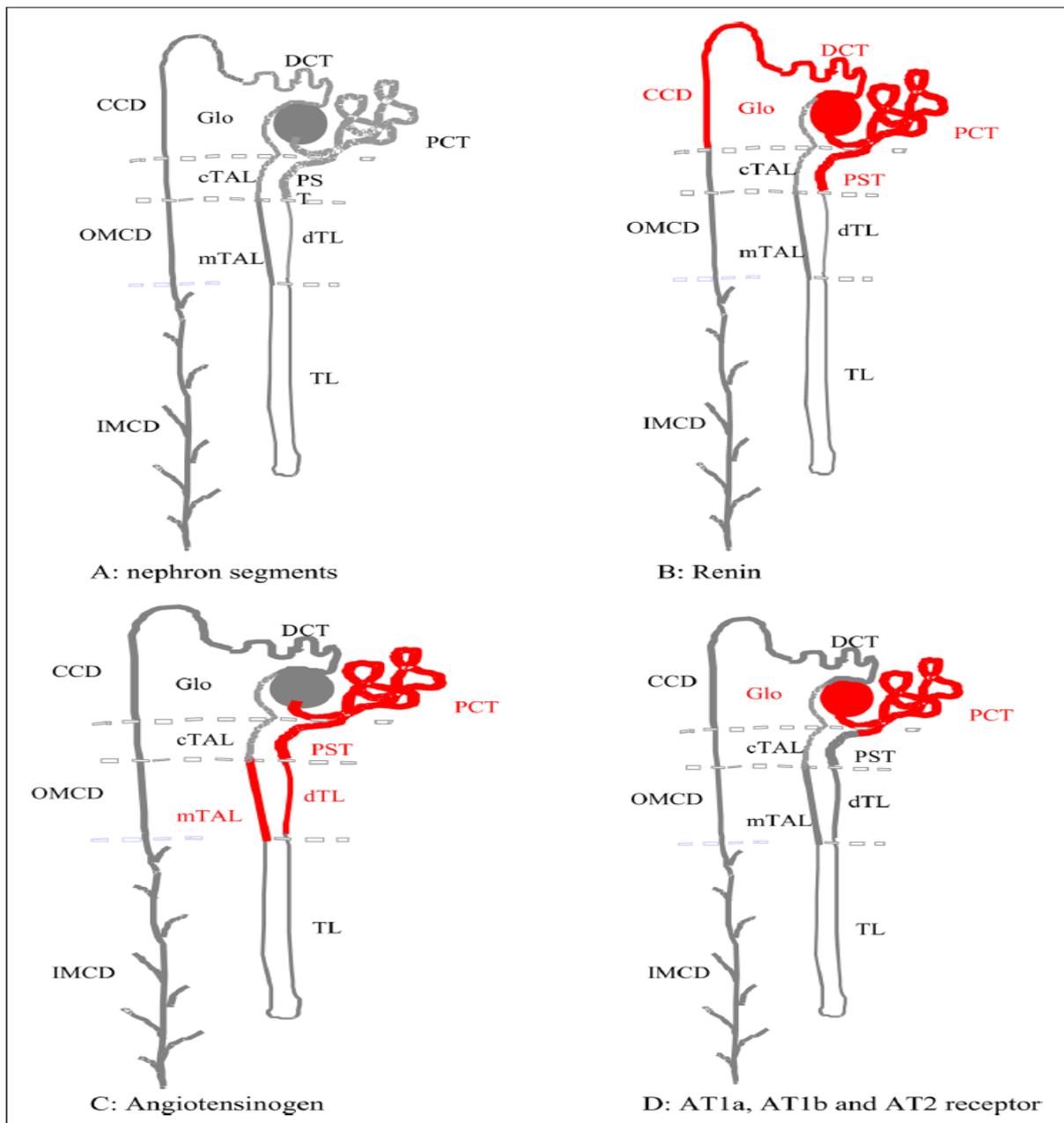


Abb. 16 A-D: Expression der RAS-Komponenten entlang des Mausephrons, schematische Darstellung wie publiziert [107].

A: Lokalisation der gesammelten Nephronsegmente. B: Renin mRNA wurde im Glomerulus, im proximalen convoluten und geraden Tubulus (PCT und PST) sowie im distalen convoluten Tubulus (DCT) und corticalem Sammelrohr (CCD) nachgewiesen. C: Angiotensinogen mRNA zeigte sich in PCT, PST, absteigendem Ast der Henle-Schleife (dTL) und medullärem dickem aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (mTAL). D: mRNA Expression der Angiotensin-II-Rezeptoren AT_{1a} , AT_{1b} und AT_2 fand sich im Glomerulus und PCT.

Glo-/+ = Glomerulus ohne/mit Arteriole, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, dTL = descending thin limb, TL = thin limb, mTAL = medullary thick ascending limb, cTAL = cortical thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CCD = cortical collecting duct, OMCD = outer medullary collecting duct, IMCD = inner medullary collecting duct.

4. Diskussion

Nachfolgend werden die oben beschriebenen Ergebnisse mit bereits bekannten Expressionsmustern in anderen Spezies verglichen und ihre Einordnung in den Kontext der RAS-Funktion diskutiert.

4.1 Renin

Renin mRNA wurde in hohen Konzentrationen in Nieren, Nebennieren, Herz, Hoden und der submandibulären Speicheldrüse, sowie in niedrigeren Konzentrationen in Ovarien, Leber, Gehirn, Milz, Lunge und Thymus nachgewiesen [108]. Die Anwesenheit von Renin in zahlreichen extrarenalen Geweben könnte für ein organspezifisches parakrines RAS sprechen. Hierbei könnte der Unterschied in der Expression der Renin-mRNA ein Hinweis dafür sein, dass in den Geweben mit niedriger Expression die Umwandlung von Angiotensinogen bevorzugt über von Renin unabhängige Wege läuft [108].

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine Renin mRNA-Expression in Glomeruli mit und ohne Arteriole, PCT, PST, DCT und CCD.

MOE et al. konnten in Hasen mittels RT-PCR die Expression von Renin-mRNA in PCT und PST nachweisen, Glomeruli wurden hier nicht untersucht [109]. In einer weiteren Arbeit dieser Arbeitsgruppe an der Ratte konnte mRNA in den Glomeruli nachgewiesen werden, jedoch konnte keine Expression im proximalen Tubulus gezeigt werden. Weiterhin wurden Ratten untersucht, die mit dem ACE-Inhibitor Enalapril behandelt wurden. Bei diesen Tieren zeigte sich nicht nur eine, durch das negative Feedback induzierte, erhöhte Plasmapreninaktivität, und gleichzeitig auch eine erhöhte Expression von Renin-mRNA in den Glomeruli sondern nun auch im proximalen Tubulus. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im proximalen Tubulus ein lokales autokrines Renin-Angiotensin System vorliegt, welches durch die Produktion von Ang II vor Ort die lokale NaCl- und Bikarbonatresorption beeinflusst [109].

Ebenso konnten TANK et al. eine mRNA-Expression mittels quantitativer PCR in mikrodissezierten Glomeruli und proximalen Tubuli der Ratte nachweisen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression von der NaCl-Zufuhr abhängig ist. Die

glomeruläre Reninexpression war in den Versuchstieren mit niedriger NaCl-Zufuhr doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig zeigte sich in den Tieren mit hoher NaCl-Aufnahme eine Herunterregulierung der Reninexpression um 50 %. Im proximalen Tubulus zeigte sich eine um 230 % verstärkte Reninexpression in den Tieren mit salzreicher Diät und um 68 % verminderte Expression in der Gruppe mit salzreicher Nahrung. Diese Daten belegen die hohe Anpassungsfähigkeit des lokalen RAS im Falle von diätetischen Veränderungen [110].

Die Arbeit von PRIETO-CARRASQUERO et al. konnte Reninaktivität entlang des gesamten Sammelrohres belegen. Hierbei wurden sowohl mRNA-Expression mittels RT-PCR und real-time RT-PCR, sowie auch die Proteinaktivität mittels immunhistochemischen Methoden in Ratten untersucht. Es zeigte sich, dass durch Infusion von Ang II die Reninaktivität im Plasma und in Zellen des JGA herunterreguliert wird. Gleichzeitig wurde jedoch in den distalen Nephronsegmenten eine erhöhte Aktivität gemessen. Immunhistochemische Färbungen zeigten eine apikale Kolo-kalisation von Renin und Aquaporin 2 in den Hauptzellen aller Sammelrohrabschnitte. Die mRNA-Expression wurde unspezifisch in Nierenkortex und -medulla nachgewiesen. Hier ergab sich durch Ang II-Infusion keine Änderung der medullären mRNA-Expression, während die kortikale Expression herunterreguliert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine lokale Reninsynthese unabhängig vom JGA existiert. Während die Reninaktivität durch Ang II im JGA supprimiert wurde, wurde sie im Sammelrohr stimuliert. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum bei hypertensiven Patienten erhöhte intrarenale Ang II-Spiegel gemessen werden, die im Sinne eines Circulus vitiosus zum Erhalt der Hypertonie beitragen [111].

GOMEZ et al. konnten an Ratten mittels Northern-Blot Analyse ebenfalls einen interessanten Zusammenhang zwischen Renin-mRNA und Einnahme von ACE-Inhibitoren zeigen. Während in der Kontrollgruppe ohne den ACE-Hemmer Enalapril die Expression im juxtaglomerulären Bereich lokalisiert war, zeigte sich in der behandelten Gruppe eine Ausdehnung der Immunoreaktivität der Renin-mRNA entlang der afferenten Arteriole nach proximal, weit über den JGA hinaus. Es kann somit daraus geschlossen werden, dass die Inhibition von ACE die intrarenale vaskuläre Expression und Synthese von Renin steigert [112].

Ein ähnlicher Versuch wurde von der Arbeitsgruppe um CHEN unternommen. Diese konnte mRNA-Expression für Renin mittels quantitativer PCR in Glomeruli, PCT und

PST in Rattennieren belegen. Dabei war das Expressionslevel glomerulär deutlich höher als im proximalen Tubulus. Reninaktivität wurde mittels Radioimmunoassay in Glomeruli und PCT, nicht jedoch im PST gemessen. Im OMCD war weder Renin-mRNA noch –aktivität nachweisbar. Nach Gabe eines ACE-Inhibitors zeigte sich eine Zunahme sowohl von mRNA als auch von Reninaktivität in den Glomeruli, nicht jedoch im proximalen Tubulus. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Arbeiten von GOMEZ, PRIETO-CARRASQUERO und GONZALES-VILLALOBOS und könnte auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der Reninsynthese zwischen dem tubulären und vaskulären Kompartiment hinweisen [113; 114].

Des Weiteren konnten ROHRWASSER et al. in Mäusen eine mRNA-Expression in den distalen Nephronsegmenten, in den „*connecting tubules*“ (CnT) nachweisen. Diese stellen ein Verbindungsstück zwischen distalem Tubulus und Sammelrohr dar und können somit als ein Teil des DCT betrachtet werden. Zusätzlich konnte ROHRWASSER mittels Immunoblotting zeigen, dass Renin aus den Hauptzellen der CnT sezerniert wird [115; 116].

Weiterhin konnte Renin mRNA in einer Zelllinie von Sammelrohren der Maus in vitro und in vivo nachgewiesen werden [114; 117].

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis im proximalen Nephron, einschließlich Glomeruli, stimmt mit den erwähnten Arbeiten überein. Da die Glomeruli den JGA enthalten, war hier eine Expression zu erwarten. Die tubuläre Expression scheint vom Salzgehalt der Nahrung abhängig zu sein, während die glomeruläre Expression eher pharmakologischen Einflüssen unterworfen ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine ausgeglichene Expression zwischen Glomeruli, PCT und PST und lässt somit auf eine ausgeglichene NaCl-Zufuhr schließen. Der Nachweis von Renin-mRNA in DCT und CCD könnte zu den Ergebnissen von PRIETO-CARRASQUERO passen, unter der Annahme, dass Renin im distalen Konvolut und proximalen Sammelrohr synthetisiert wird und anschließend in die distalen Bereiche des Sammelrohres transportiert wird [111]. Diese Hypothese, sowie auch die nachgewiesene Expression im DCT, stimmt mit den Ergebnissen von ROHRWASSER et al. überein, eine Kontamination mit juxtaglomerulären Zellen kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die von KANG et. al verwendete Sammelrohrzelllinie entstammt kortikalen Sammelrohrzellen, was gut zum vorliegenden Ergebnis passt [117]. Weiterhin ist das negative PCR-Ergebnis für OMCD übereinstimmend mit CHEN et al. Insgesamt stimmt die Lokalisation von

Renin mit den existierenden Daten gut überein, was die Expression in Glomeruli und proximalen Tubulus betrifft. Die Datenlage zur Expression im distalen Tubulus und Sammelrohren ist dünn. Der Nachweis von mRNA im DCT stellt eine Erweiterung des bislang bekannten Expressionsmusters dar und deutet auf eine Reninproduktion proximal der „*connecting tubules*“ hin. Dies widerlegt die alte Hypothese, dass tubulär nachgewiesenes Renin nur glomerulär filtriertem Renin entstammt und unterstreicht dadurch die Bedeutung des vorliegenden mRNA Nachweises im Vergleich zu anderen Lokalisationsmethoden, wie immunhistochemischen oder Western-Blot Untersuchungen. Weiterhin bestärkt das Ergebnis die Anwesenheit und Bedeutung des lokalen RAS.

4.2 Angiotensinogen

Die Synthese von Angiotensinogen (AGTN) findet hauptsächlich in der Leber statt. In Ratten konnte AGTN-mRNA und als Protein weiterhin in Niere, Nebenniere, Herz, Lunge, Hypothalamus, Hypophyse, Mittelhirn, Hirnstamm, Hoden, Thymus, Fettgewebe und Haut nachgewiesen werden [3; 17]. Die Expression des Gens ist von etlichen Faktoren wie Glukokortikoiden, Sexual- und Schilddrüsenhormonen sowie Ang II abhängig. Ang II scheint über eine positive Rückkopplung die AGTN-Expression zu stimulieren. Beim Menschen wurden verschiedene AGTN-Genvarianten beschrieben. Bei der sog. 235-T Variante bewirkt ein Polymorphismus in der Promotorregion eine erhöhte Transkriptionshäufigkeit und damit auch eine erhöhte Produktion von AGTN. Ein erhöhter AGTN-Spiegel im Serum scheint wiederum mit einer arteriellen Hypertonie vergesellschaftet zu sein [3]. Dies konnte am Tiermodell belegt werden, indem in Mäusen das AGTN-Gen in 0 bis 4 funktionellen Kopien exprimiert wurde. Folge davon war ein zunehmender Anstieg der Serum-AGTN-Spiegel und parallel hierzu ein nahezu linearer Anstieg des Blutdruckes um etwa 8 mmHg pro Genkopie [118].

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine renale AGTN-mRNA Expression in PCT, PST, DTL und mTAL.

DARBY und Mitarbeiter konnten mittels Immunhistochemie und Immunoelektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ratten AGTN-mRNA in PCT und PST nachweisen. Bei neugeborenen Tieren war hierbei ein stärkeres Signal zu

verzeichnen als bei adulten [119]. Weiterhin konnte eine Sekretion von AGTN in den Primärharn belegt werden [115; 120].

INGELFINGER et al. zeigten ebenfalls, mittels in-situ-Hybridisierung (ISH), eine Expression im proximalen Tubulus der Ratte [121]. Weiterhin konnte eine schwache Expression in den Glomeruli sowie in Anteilen des distalen Tubulus verzeichnet werden. Ähnlich wie im Falle von Renin, zeigte sich auch hierbei eine Beeinflussung der mRNA-Expression durch NaCl-Zufuhr. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Natriumdepletion, sondern auch eine gesteigerte Kaliumzufuhr oder Androgeneinnahme zu einer erhöhten renalen Expression von AGTN führt. Die hepatische AGTN-Expression blieb durch diese Faktoren unbeeinflusst. Dies lässt wiederum den Rückschluss zu, dass neben dem systemischen RAS auch ein lokales RAS existiert, welches vor Ort die Elektrolytresorption und pH-Regulierung des Harns steuert [121; 122; 123].

Basierend auf der Annahme, dass AGTN mit einem Molekulargewicht von 61-65 kDa nicht glomerulär filtriert werden kann, belegten auch ROHRWASSER et al., eine intrarenale Synthese und Sekretion von Angiotensinogen in das Tubulussystem [116]. Mittels ISH, Northern Blot und RT-PCR konnte die Expression von mRNA in Zellen des gesamten proximalen Tubulus nachgewiesen werden. Weiterhin wurden angiotensinogenhaltige Granula in den apikalen Zellanteilen der Tubuluszellen gefunden, welche auf die dortige Sekretion des Proteins hinweisen [116]. Das sezernierte AGTN wird über den Primärharn nach distal transportiert, wo es von Renin, welches im Bereich des DCT und Sammelrohres synthetisiert und sezerniert wird (s.o.), verstoffwechselt wird. Dies ist wiederum ein Anhalt für ein parakrines RAS, welches im Bereich des distalen Nephrons aktiv ist. Nicht metabolisiertes AGTN wird ausgeschieden und kann im Urin nachgewiesen werden. Das mit dem Urin ausgeschiedene AGTN steht in einem direkten Zusammenhang mit dem intrarenalen Ang II- und AGTN-Gehalt. Somit wäre das Urin-AGTN als Surrogatparameter für die Aktivität des intrarenalen RAS verwendbar [120]. Die Menge des ausgeschiedenen AGTN steht dabei in umgekehrter Relation zum aufgenommenen NaCl. Aufgrund dieser starken Beeinflussbarkeit durch die Nahrungsaufnahme, sind Untersuchungen auf Angiotensinogen im Urin als Hinweis für eine Schädigung der glomerulären Membran obsolet [116].

INGELFINGER et al. konnte in einer früheren Arbeit an Mäusen mittels RT-PCR abgesehen von einer kortikalen, auch eine medulläre mRNA-Expression nachweisen, jedoch wurden hierbei keine genauen Strukturen determiniert [122].

Andere Arbeiten von YAMAGUCHI und TERADA an der Ratte zeigten weiterhin eine schwache Expression in den Glomeruli und den Vasa recta [124; 125].

Die hier vorliegende Expression in PCT und PST deckt sich mit allen zuvor beschriebenen Arbeiten. Eine Expression in DTL und mTAL wurde bislang noch nicht beschrieben. YAMAGUCHI und TERADA beschreiben eine glomeruläre Expression, es wird jedoch eingeräumt, dass diese nur sehr schwach ist und v.a. bei jungen Tieren auftritt. Dieses Phänomen, dass bei neugeborenen Tieren eine deutlich stärkere Expression auftritt als bei adulten Tieren wird von DARBY et al. bestätigt [119; 124]. Dass in dieser Arbeit ausgewachsene Mäuse verwendet wurden, kann somit möglicherweise als Erklärung für ein fehlendes PCR Signal in den Glomeruli dienen. Über eine Expression von AGTN in distaleren Nephronabschnitten, so wie sie hier in DTL und mTAL gezeigt werden konnte, liegen keine genauen Daten vor. Dieses Ergebnis könnte zu INGELFINGERS et al. Beschreibung einer medullären Expression passen, wobei diese auch durch den Nachweis in den Vasa recta erklärt wäre [122]. Trotz der Bestätigung durch Markerprimer lässt sich in dieser Arbeit eine Kontamination mit Vasa recta nicht sicher ausschließen. Dennoch passt die Expression in DTL und mTAL sehr gut zu dem postulierten parakrinen RAS, welches im distalen Nephron operiert. Durch eine Produktion und Sekretion in diesem Bereich kann sich AGTN als Anfangspunkt der RAS-Kaskade unmittelbar auf die Salz- und Wasserrückresorption auswirken. Zusammenfassend wird in dieser Arbeit die bekannte Expression in PCT und PST bestätigt und die medulläre Expression konkretisiert.

4.3 AT₁-Rezeptoren

Bei Nagetieren kommen zwei Isoformen des AT₁-Rezeptors vor. In der adulten Ratte werden AT_{1A} und AT_{1B} in Nieren, Nebennieren, Gehirn, Hypophyse, Hoden, Lunge, Herz, Aorta und Fettgewebe exprimiert. Dabei überwiegt die AT_{1A}-Isoform. Auch beim Menschen wird der AT₁-Rezeptor in zahlreichen Geweben exprimiert. In den

Gefäßen befindet er sich v.a. in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen, in geringerem Maße auch in der Adventitia [44].

In der Nebenniere findet er sich v. a. in der Zona glomerulosa. Bei Kortisol und Aldosteron produzierenden Adenomen wird er verstärkt exprimiert [126].

AT₁-Rezeptoren lassen sich im Endometrium nachweisen und während der Schwangerschaft auch im Zyto-, Synzytio- und extravillösen Trophoblasten, sowie in den Blutgefäßen der plazentären Villi [127]. Bei Schwangeren mit Hypertonie im Rahmen einer Präeklampsie ist eine verstärkte Heterodimerisierung mit einem Bradykinin-Rezeptor nachweisbar, die wohl zu einer erhöhten Angiotensin II Sensitivität beiträgt [2; 128].

In der Lunge lassen sich AT₁-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und im subepithelialen Stroma der Atemwege nachweisen [2; 44]. Auch auf Kupffer'schen Sternzellen der Leber werden AT₁-Rezeptoren exprimiert. Bei chronischen Lebererkrankungen sind diese aktiviert und weisen auch eine Produktion von Komponenten des RAS auf. Angiotensin II hat auf diese Zellen eine mitogene Wirkung. Darüber hinaus erlangen die Sternzellen unter diesen Bedingungen kontraktile Eigenschaften. Es wird angenommen, dass Angiotensin II dadurch beim strukturellen Remodeling der Leber eine Rolle spielt [129]. Keratinozyten der Haut sind in der Lage Angiotensin II zu synthetisieren und auf vielen dermalen Zelltypen (Keratozyten, Melanozyten, Fibroblasten, mikrovaskuläre Endothelzellen) sind auch AT₁-Rezeptoren nachweisbar [10]. Vor allem im Bereich kutaner Verletzungen werden sie verstärkt exprimiert, was darauf hinweist, dass das RAS auch in der Homöostase und wohl auch in der Wundheilung der Haut involviert ist [10]. Auch im Gehirn sind AT₁-Rezeptoren in verschiedenen Arealen vorzufinden und sind an zentralen neuromodulatorischen Regulationsmechanismen beteiligt [130].

Bezüglich des Vorkommens der AT₁-Rezeptoren in den Nieren gibt es Arbeiten, die im Wesentlichen eine Expression in nahezu allen Nephronsegmenten sowie auch in verschiedenen interstitiellen Zellen und Gefäßen nachweisen. Mittels eines binding-assays von ¹²⁵I-Angiotensin II untersuchten MUJAJIS et al. die Hormonbindung entlang des Rattennephrons. Hierbei zeigte sich eine besonders hohe Bindungskapazität im Bereich des PCT und PST und ein geringeres Bindungsprofil in cTAL, mTAL, DCT, CCD und medullären Sammelrohrsegmenten, sodass sich also entlang des gesamten Nephrons mit Ausnahme von DTL und TL

Angiotensinrezeptoren nachweisen ließen. Eine Unterscheidung zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptor konnte hierbei jedoch nicht getroffen werden. Die Angiotensinbindung im Bereich des Glomerulus wurde nicht untersucht [131]. Eine aktuellere Arbeit von TSURUMI et al. bestätigte dieses Ergebnis und zeigte zusätzlich, dass AT₁-Rezeptoren in Glomeruli aber auch in interstitiellen Zellen und Gefäßen vorkommen. Hierbei erfolgte der Nachweis indirekt über das *AT₁-receptor-associated protein* (ATRAP), einem Molekül welches spezifisch an den AT₁-Rezeptor bindet und mit diesem kolokalisiert ist. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass eine verringerte Salzzufuhr zu einer Abnahme der Expression von ATRAP- und AT₁-mRNA führt [132]. Immunhistochemische Untersuchungen an Ratten zeigten speziell für den AT₁-Rezeptor ein ähnliches Verteilungsmuster. Hierbei zeigte sich die höchste Dichte der Rezeptoren im Bereich des proximalen Tubulus sowohl an der apikalen, als auch an der basolateralen Membran der Tubuluszellen. Zusätzlich ließen sich AT₁-Rezeptoren im distalen Tubulus, kortikalen und medullären Sammelrohren und den arteriellen Gefäßen der Niere nachweisen. Im Glomerulus fanden sich AT₁-Rezeptoren in den Mesangiumzellen, Podozyten und sehr zahlreich in den Zellen der Macula Densa [133]. MIYATA et al. konnten durch immunhistochemische Untersuchungen an Rattennieren die größte Dichte an AT₁-Rezeptoren in den kortikalen Blutgefäßen und in den PST, gefolgt von CCD, OMCD, IMCD und TAL nachweisen. Zusätzlich fanden sich auch hier AT₁-Rezeptoren in den Glomeruli [134]. Mittels ISH konnten MATSUBARA et al. ebenfalls eine hohe Konzentration von AT₁-mRNA in den interlobulären Arterien und dem umgebenden Bindegewebe, v. a. in Fibroblasten nachweisen. Des Weiteren fand sich AT₁-mRNA in den Glomeruli und kortikalen Tubuli [135].

4.3.1 AT_{1a}-Rezeptor

Eine pharmakologische Unterscheidung zwischen den beiden Rezeptorsubtypen AT_{1a} und AT_{1b} ist aufgrund der 95 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz nicht möglich. Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz beträgt jedoch nur 60 %, sodass auf genetischer Ebene eine Unterscheidung möglich ist [136]. Somit können genauere Aussagen über die Lokalisation getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine mRNA-Expression des AT_{1a}- Rezeptors in den Glomeruli sowie im proximalen Konvolut.

Speziell für die Expression von AT_{1a}-mRNA entlang des Nephrons gibt es mehrere Arbeiten, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Als Gemeinsamkeit bei all diesen Arbeiten zeigt sich ein Expressionsnachweis im Bereich des Cortex und v. a. in den Glomeruli. Mittels RT-PCR zeigten BOUBY et al. an Ratten die höchste Konzentration von AT_{1a}-mRNA in den Glomeruli und proximalen Tubuli gefolgt von cTAL und mTAL. Entlang der Sammelrohre fanden sich niedrigere Konzentrationen [137]. MIYATA und Mitarbeiter konnten die mRNA des AT_{1a}-Rezeptors ebenfalls in Glomeruli, mTAL, cTAL, CCD, OMCD und IMCD nachweisen. Zusätzlich gelang ein Nachweis in den afferenten Arteriolen, der Arteria arcuata und den Vasa recta in der äußeren Medulla [134]. KAKINUMA et al. zeigen mittels RT-PCR die höchste Expression von AT_{1a}-mRNA in den Glomeruli, der Papilla renalis, gefolgt von Cortex und schließlich Medulla. Eine genauere Unterscheidung wurde hierbei nicht getroffen. Weiterhin konnte mittels ISH die überwiegende Expression im Bereich der Glomeruli bestätigt werden. Bei genauer Betrachtung zeigte sich hier die höchste Expression in den Mesangiumzellen und in den vaskulären Anteilen des JGA, also der afferenten Arteriole. Während sich AT_{1a}-mRNA auch in den extraglomerulären Mesangiumzellen nachweisen ließ, war in den Arteriolen außerhalb des JGA kein Nachweis zu erbringen. Nach Einnahme eines ACE-Inhibitors zeigte sich jedoch eine Ausdehnung der mRNA-Expression in Richtung der interlobulären Arterie [138]. SCHMID et al. sahen in den Glomeruli ebenfalls die höchste Expression, gefolgt von äußerer Medulla, Cortex und innerer Medulla. Im Gegensatz zur Arbeit von KAKINUMA zeigte sich jedoch im Bereich der Papilla renalis die niedrigste Expression. Insgesamt beobachteten SCHMID und Mitarbeiter einen abnehmenden Gradient der AT_{1a}-Expression von Cortex zur Papille [139]. GASC und Mitarbeiter untersuchten Rattennieren mittels ISH und fanden AT_{1a}-mRNA in den Mesangium- und juxtaglomerulären Zellen sowie im proximalen Tubulus. Zusätzlich fand sich AT_{1a}-mRNA in den Vasa recta und in interstitiellen Zellen [140].

Das vorliegende Ergebnis deckt sich mit den Arbeiten von SCHMID und KAKINUMA, die beide eine Expression im Bereich der Glomeruli nachweisen konnten. Eine detaillierte Untersuchung des Nephrons erfolgte in diesen Fällen jedoch nicht. GASC und Mitarbeiter veröffentlichten zwei Arbeiten zu diesem Thema. In einer Arbeit

konnte, entsprechend den vorliegenden Ergebnissen, AT₁-mRNA in Glomeruli und PCT nachgewiesen werden [141]. In einer weiteren Studie gelang speziell der Nachweis von AT_{1a}-mRNA in Glomeruli und proximalem Tubulus. Hierbei erfolgte jedoch keine weitere Unterteilung in PCT und PST. Der Nachweis von AT_{1a}-Rezeptoren in Glomeruli und proximalem Tubulus durch HARRISON-BERNARD und Mitarbeitern passt ebenfalls zum Resultat dieser Arbeit [133]. Weiterhin deckt sich dieses Resultat auch mit den Arbeiten von BOUBY und MIYATA, jedoch gelang in diesen Arbeiten zusätzlich ein Nachweis von AT_{1a}-mRNA in distalen Nephronabschnitten, im Bereich der TAL und Sammelrohre [134; 137]. Ein Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen Versuchsmodellen liegen. Alle zuvor beschriebenen Studien erfolgten im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, an der Ratte. Der Nachweis von AT₁-Rezeptoren mittels Bindungsassay in TAL und Sammelrohren durch MUJAIIS et al. könnte die Ergebnisse von BOUBY und MIYATA untermauern, stellt aber nicht zwingend einen Widerspruch zur vorliegenden Arbeit dar. Das Ergebnis legt eine Produktion der AT₁-Proteine in den Zellen der TAL und Sammelrohre nahe, es wäre jedoch auch eine Produktion im Bereich der Glomeruli und des proximalen Tubulus und ein anschließender interzellulärer Transport der Rezeptoren in distale Nephronabschnitte denkbar [131]. TSURUMI et al. konnten zeigen, dass die Expression von AT₁-mRNA mit der NaCl-Zufuhr korreliert ist [132]. Diese Tatsache könnte ebenfalls zu unterschiedlichen Expressionsmustern beitragen.

4.3.2 AT_{1b}-Rezeptor

In der vorliegenden Arbeit konnte für AT_{1b}-mRNA ein identisches Expressionsmuster zu AT_{1a} festgestellt werden, es zeigte sich also Expression in den Glomeruli und PCT.

In der zuvor erwähnten Arbeit von BOUBY et al. wurde die Expression von AT_{1a}- und AT_{1b}-mRNA mittels RT-PCR entlang des Rattennephrons untersucht. Hierbei wurde mittels Messungen von intrazellulärem Ca²⁺-Anstieg auch untersucht inwiefern eine Kopplung bezüglich der Rezeptorantwort zwischen diesen zwei Subtypen besteht. Es stellte sich heraus, dass in den Glomeruli beide Subtypen exprimiert werden, wobei die Expression von AT_{1b} leicht überwiegt. In den distaleren Nephronabschnitten (v.a.

cTAL) stellte der AT_{1a}-Rezeptor die dominante Form dar und war bis zu 85% häufiger exprimiert. Im Bereich der Sammelrohre konnte eine Expression in CCD und OMCD, sowie ein fragliches Signal in IMCD nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Rezeptorantwort wieder. So zeigte sich in den proximalen Nephronabschnitten ein doppelt so hoher Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wie in den distalen Abschnitten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass bezüglich der Aktivierung des Ca²⁺-Second-messenger-Systems beide Subtypen gleichermaßen effizient sind [137].

MIYATA et al. fanden (im Rahmen der oben beschriebenen Arbeit) AT_{1b}-mRNA analog zum AT_{1a}-Subtyp in Glomeruli, proximalen Tubuli, mTAL, CCD, OMCD und IMCD. Zu Unterschieden in der Expressionsstärke beider Rezeptoren wurde keine Aussage getroffen [134].

SCHMID und Mitarbeiter sahen ebenfalls eine gleiche Verteilung von AT_{1b}- und AT_{1a}-mRNA. Hierbei wurde wiederum eine deutlich höhere Expressionsintensität für AT_{1a}-mRNA entlang des gesamten Nephrons beobachtet. Die Glomeruli wurden als der Bereich mit der höchsten AT_{1b}-Expression beschrieben [139].

CHANSEL et al. konnten mittels RT-PCR und Northern Blot beide Subtypen in Mesangiumzellen der Ratte nachweisen. Hier wurde ein Übergewicht auf Seiten der AT_{1b}-mRNA beschrieben. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern sich die Expression beider Rezeptorgene durch die Gabe von Steroiden beeinflussen lässt. Hierbei zeigte sich nach Gabe von Dexamethason eine Abnahme der AT_{1b}-mRNA, die Expression von AT_{1a}-mRNA blieb hingegen unverändert [142].

Das in dieser Arbeit gefundene Expressionsmuster deckt sich mit den zuvor beschriebenen Arbeiten, die alle ebenfalls ein identisches Expressionsmuster von AT_{1a} und AT_{1b} feststellten. Die unterschiedlichen Versuchstiere und Primer könnten dabei wiederum die Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich der Expression im Bereich der TAL und Sammelrohre erklären, die von BOUBY und MIYATA beschrieben wird. BOUBY et al. beschreiben dabei jedoch eine deutlich stärkere Expression von AT_{1a} in den distalen Nephronabschnitten. Diese Tatsache könnte die Hypothese untermauern, dass die PCR-Zyklenzahl von 32 zu niedrig ist um die schwache Expression von AT_{1b} in TAL und Sammelrohren nachzuweisen. Es besteht Einigkeit darüber, dass in den Glomeruli AT_{1b} am stärksten exprimiert wird [137; 139; 142]. Dies deckt sich mit dem vorliegenden Ergebnis, in dem sich bei Glo- und Glo+ das stärkste PCR-Signal zeigt. Die Resultate von SCHMID und Mitarbeitern, die

abgesehen von den Glomeruli eine schwächere Expression in der äußeren und inneren Medulla beschreiben, stehen nicht zwingend im Widerspruch zum vorliegenden Ergebnis. Die in der äußeren und inneren Medulla vorkommenden Strukturen wurden nicht genauer differenziert, sodass die nachgewiesene AT_{1b}-mRNA aus interstitiellen Zellen oder Endothelzellen der dort verlaufenden Gefäßen, z.B. der Vasa recta, entstammen könnte.

Insgesamt ließ sich für beide Rezeptorsubtypen die bekannte glomeruläre Expression bestätigen. Im proximalen Tubulus beschränkte sich die Expression auf das PCT. Aufgrund des Nachweises von Renin und AGTN in distalen Nephronabschnitten wäre unter der Annahme eines lokalen RAS, auch der Nachweis von Rezeptoren in diesen Segmenten zu erwarten gewesen. Dieser gelang jedoch nur proximal. Dies könnte zum einen unterschiedlichen Spezies, zum anderen auch unterschiedlichen Versuchsmethoden und äußeren Einflüssen wie z.B. der Nahrungszusammensetzung geschuldet sein [132]. Ein fehlender Nachweis von AT_{1a/b}-mRNA in den distalen Segmenten schließt ein lokales RAS jedoch nicht aus, da ein interzellulärer Transport von proximal synthetisierten Rezeptorproteinen denkbar wäre.

4.4 AT₂-Rezeptor

An Ratten konnte gezeigt werden, dass in der fetalen Entwicklungsphase der AT₂-Rezeptor in allen Geweben deutlich exprimiert wird. Nach der Geburt nimmt die Rezeptordichte generell jedoch immer mehr ab, sodass im adulten Gewebe der AT₁-Rezeptor dominiert [143]. Nichtsdestotrotz bleibt der AT₂-Subtyp in vielen Geweben noch nachweisbar. Die kardiale Expression betreffend zeigte sich eine gleichwertige Verteilung der beiden Rezeptoren im Myokard. Hierbei zeigte sich postnatal eine Zunahme der Expression sowohl von AT₁- als auch von AT₂-Rezeptoren, die nach 2 Tagen das Maximum erreicht, woraufhin wieder eine Herunterregulation stattfindet [144]. Zusätzlich zu Myokard und Koronararterien konnten bei adulten Ratten AT₂-Rezeptoren auch in Myometrium, Ovarien, Lungen, Haut, Nieren, Nebennieren, Thymus und Gehirn nachgewiesen werden [43; 145; 146; 147]. Ist die Expression dieser Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen eher gering, so kann es jedoch pathophysiologisch zu einer deutlichen Zunahme der Rezeptorexpression kommen. Dieses Phänomen wurde in verschiedenen

Organsystemen untersucht, wie beispielsweise im Bereich des Nervensystems nach Läsion des N. opticus oder Durchtrennung des N. ischiadicus [148; 149], bzw. bei Läsionen im Bereich des Großhirns, beispielsweise nach einem Insult [150; 151]. Weiterhin zeigte sich auch im kardialen Bereich eine Zunahme der AT₂-Expression bei Remodeling-Vorgängen nach Myokardinfarkt oder bei Herzinsuffizienz [152; 153]. Selbiges Phänomen konnte auch im Fall von Haut- oder Gefäßverletzungen nachgewiesen werden [65; 154]. Diese Expressionszunahme in pathologischen Situationen, bei Umbau- und Regenerationsprozessen, sowie die Dominanz der AT₂-Rezeptoren in der Fetalzeit deutet darauf hin, dass diese Rezeptoren sowohl in der Entwicklungsphase bei Proliferation und Differenzierung, als auch bei adaptativen Vorgängen wie Angiogenese oder Apoptose eine tragende Rolle spielen. Wie einleitend bereits erwähnt zeigt sich hierbei eine zum AT₁-Rezeptor gegensätzliche Wirkung [2; 155].

In der Niere, konnte in der hier vorliegenden Arbeit AT₂-mRNA analog zu AT_{1a} und AT_{1b} in Glomeruli und PCT nachgewiesen werden. Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um adulte Mäuse.

Pränatal machen die AT₂-Rezeptoren über 80 % der Angiotensinrezeptoren der Niere aus [156]. Im adulten Organ, sowohl bei Ratten als auch beim Menschen, dominieren die AT₁-Rezeptoren, während der AT₂-Subtyp nur etwa 5 % der renalen Angiotensinrezeptoren ausmacht [157; 158]. Hier konnte er in der Nierenkapsel, größeren Gefäßen und im glomerulären Bereich nachgewiesen werden [159]. Pathophysiologische Bedingungen, wie z.B. eine Niereninsuffizienz, können die AT₂-Expression beeinflussen [160].

CHANSEL et al. versuchten eine Differenzierung der beiden Rezeptoren mittels Bindingassay von AT₁- und AT₂-Antagonisten in humanen Glomeruli und Mesangiumzellen. Hierbei gelang kein Nachweis von AT₂-Rezeptoren sondern nur von AT₁ [161]. Auf molekularer Ebene gelang MATSUBARA et al. der Nachweis von AT₂-mRNA in den interlobulären Arterien. Dieser konnte mittels ISH in menschlichen Nieren erbracht werden [135].

In der umfassenden Untersuchung von MIYATA und Mitarbeitern mittels Immunhistochemie und RT-PCR konnte AT₂-mRNA in der Aa. arcuatae, den afferenten Arteriolen und den Vasa recta der äußeren Medulla nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang ein Nachweis in den proximalen Tubuli und den Sammelrohren. Im Bereich des mTAL zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse. Im

Glomerulus konnte bei geringem Rezeptorbesatz keine AT₂-mRNA gesehen werden [134].

Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von WANG et al. Hier gelang an Ratten mittels Immunhistochemie der Nachweis von AT₂-Rezeptoren hauptsächlich in den Glomeruli [162].

Bei einseitig oder subtotal nephrektomierten Ratten fand JOLY mittels RT-PCR sehr niedrige Konzentrationen von AT₂-mRNA im Cortex. Diese waren in allen Versuchsgruppen gleich und zeigten bei kompensatorischer Hypertrophie keine steigende Tendenz. Dies legt nahe, dass die renale Hypertrophie unabhängig von der AT₂-Genexpression ist [163].

OZONO und Mitarbeiter untersuchten die Expression des AT₂-Rezeptorproteins in fetalen (Tag 14 und 19), neugeborenen (1 Tag postpartal) und adulten (4 Wochen und 3 Monate alte) Rattennieren. Der Nachweis erfolgte durch Western Blot und immunhistochemische Analyse. Im fetalen und neugeborenen Stadium ließen sich AT₂-Rezeptoren in Glomeruli, Tubuli und Gefäßen nachweisen. Vor allem die Glomeruli im Bereich des äußeren Cortex zeigten Rezeptorbesatz. In den adulten Tieren ließen sich die AT₂-Rezeptoren auf den Glomeruli zwar noch nachweisen, diese waren jedoch im Vergleich zu den neugeborenen Tieren nur noch minimal exprimiert. Nachdem jedoch die adulten Ratten eine natriumdepletierte Kost erhielten, stellte man eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression im Bereich der Glomeruli und interstitiellen Zellen fest. Dies weist darauf hin, dass die AT₂-Rezeptoren auch an der Elektrolythomöostase beteiligt sind [164].

SHANMUGAM und Mitarbeiter untersuchten mittels ISH die AT₂-mRNA Expression in Nieren und Nebennieren von Ratten, von der Fetalzeit bis zur Ausreifung der Organe. Von Tag 12 der Fetalzeit bis zum 15. Tag postnatal fand man AT₂-mRNA in undifferenzierten mesenchymalen Zellen der Niere, jedoch nicht in Glomeruli oder Tubuli. Nach dem 22. postnatalen Tag war mit Abschluss der Nephrogenese keine AT₂-mRNA mehr in den Nieren nachweisbar. Im Gegensatz dazu blieb die Expression in der adulten Nebenniere unverändert hoch [165].

Die in dieser Arbeit gezeigte Expression entspricht der am häufigsten festgestellten Rezeptorverteilung. Insgesamt zeigen sich jedoch bei den beschriebenen Arbeiten widersprüchliche Ergebnisse. MIYATA et al. wiesen AT₂-mRNA in PCT nach, was auch dem vorliegenden Ergebnis entspricht. Weiterhin konnte in distalen Nephronanteilen Expression nachgewiesen werden, in Glomeruli jedoch nicht.

Andere Arbeiten konnten in adulten Ratten keinerlei AT₂-mRNA mehr nachweisen. Das Rezeptorprotein wird von den meisten hauptsächlich im kortikalen Bereich und speziell in den Glomeruli nachgewiesen, wobei sich hier starke Schwankungen abhängig vom Alter der Versuchstiere, Salzgehalt der Nahrung und etwaigen Schädigungen der Nieren zeigen. AT₂-Rezeptor-Knock-Out Mäuse zeigten ein fehlendes diuretisches Ansprechen nach Gabe eines AT₂-Blockers [166]. Dies ist ein starker Indikator für eine, wie in dieser Arbeit gezeigte, tubuläre AT₂-Expression. Die Tatsache, dass dieser Rezeptor im adulten Gewebe nur einen kleinen Bruchteil der Angiotensinrezeptoren ausmacht und dass seine Expression von zahlreichen Faktoren abhängig ist, erschwert bei adulten Tieren eine genaue Aussage über die Rezeptorverteilung und mRNA-Expression.

Die Lokalisation der Angiotensinrezeptoren ist nichtsdestotrotz von größter Wichtigkeit, gerade in Anbetracht eines lokalen RAS, um eingrenzen zu können, wo dieses seine Wirkung entfaltet.

4.5 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)

Die Hauptaufgabe von ACE besteht darin Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln. Weiterhin bewirkt es den Abbau und somit die Inaktivierung von Bradykinin. Es werden 2 Isoformen beschrieben, eine somatische Isoform, die sich auf Gefäßendothelzellen, sowie auf der Bürstensaummembran von Enterozyten, renalen Tubuluszellen, choroidalen und plazentären Zellen befindet und eine germinale Form, die ausschließlich in den Hoden vorkommt und für die Fertilität eine tragende Rolle spielt [167]. Zuletzt wurde ein ACE-Homolog namens ACE2 oder ACEH beschrieben. Dieses ist zu 33 % identisch mit dem testikulären ACE und wird überwiegend von Endothelzellen in Herz, Niere und Hoden exprimiert [168]. Neben der membrangebundenen Form gibt es auch ein zirkulierendes ACE, wobei sich hauptsächlich das membrangebundene Enzym auf den Blutdruck und die Nierenfunktion auswirkt. Dies konnte an Mäusen gezeigt werden, die ein ACE-Molekül mit fehlendem C-terminalen Ende exprimierten. Hierdurch war das ACE zwar weiterhin katalytisch aktiv, es konnte jedoch nicht mehr an der Zelloberfläche binden und wurde vollständig exozytiert. Als Folge hatten die Mäuse einen niedrigen Blutdruck, die intrarenalen Arterien und Arteriolen waren wandverdickt und eine

Urinkonzentrationsstörung trat auf [169]. Dieser Phänotyp entsprach dem von ACE-Knock-Out Mäusen mit der Ausnahme, dass die nephrologische Symptomatik milder war. Bei völliger ACE-Defizienz zeigten sich zusätzliche Störungen in der Nierenarchitektur mit Entwicklungsstörung der Medulla und der Papille [170; 171]. Diese Feststellungen weisen bei der isolierten Nierensymptomatik abermals auf ein lokales RAS hin. Hinweise hierfür gibt es in mehreren Organsystemen. Eine Kolo-kalisation von ACE und AT₁-Rezeptoren wurde in der Substantia nigra, dem Nucleus caudatus und dem Putamen nachgewiesen, alles Regionen mit einer hohen Dichte an dopaminergen Neuronen, sodass eine Beteiligung des RAS an der zentralen Dopaminausschüttung diskutiert wird [172]. Weiterhin wurde ACE zusammen mit AT₁- und AT₂-Rezeptoren in der Adventitia von Blutgefäßen gefunden, wo es im Sinne eines parakrinen RAS unmittelbar an der Blutdruckregulation beteiligt ist [172]. Im Lungengewebe zeigte sich die stärkste ACE-Expression in kapillären Endothelzellen, gefolgt von den Endothelzellen der Arteriolen und Arterien [173]. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie infolge einer interstitiellen Lungenerkrankung oder Kollagenose konnte eine signifikant höhere ACE-Expression nachgewiesen werden als bei gesunden Probanden [18]. Dieses pulmonale ACE wird als ausschlaggebend für die gesamte Blutdruckregulation erachtet, da es in der Lunge in besonders hohem Ausmaß exprimiert wird. Deswegen findet nahezu die gesamte Umwandlung von Ang I zu Ang II in der Lunge statt [174].

In der vorliegenden Arbeit konnte im Bereich des gesamten Nephrons kein Nachweis für ACE erbracht werden.

GONZALES-VILLALOBOS und Mitarbeiter sahen in Mäusen eine prädominante Expression des ACE-Proteins in der Bürstensaummembran der proximal-tubulären Zellen sowie in Endothelzellen der Arteriolen. Durch Infusion von Ang II sah man eine Zunahme der Proteinexpression, durch ACE-Inhibition mit Lisinopril eine Abnahme. Die Expression der ACE-mRNA war hierdurch nicht beeinflusst. Über die genaue Lokalisation der mRNA wurden keine Angaben gemacht [114].

In anderen Arbeiten wurde ACE mittels Autoradiographie in den interstitiellen Zellen der Medulla nachgewiesen [172]. Weiterhin konnte das Enzym in proximalen Tubuluszellen gezeigt werden [174].

Mittels Radioimmunoassay untersuchten MARCHETTI et. al. die ACE-Aktivität entlang des Hasen-Nephrons. ACE wurde in Glomeruli, PCT und PST

nachgewiesen. Hierbei zeigte sich ein Konzentrationsgradient, der in Richtung PST anstieg [175].

MIZUIRI und Mitarbeiter untersuchten in menschlichen Nieren von gesunden Probanden ob ein Zusammenhang zwischen dem ACE-Genotyp und der Konzentration von ACE-mRNA vorliegt. Es werden drei verschiedene Genotypen unterschieden: ACE-II, ACE-ID und ACE-DD. Mittels ISH und RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression bei ACE-II-Genotyp am niedrigsten und bei DD-Genotyp am höchsten ist. Expression von mRNA wurde sowohl in Glomeruli als auch in Tubuli gesehen. Eine genaue Unterscheidung der tubulären Abschnitte wurde nicht vorgenommen [176].

LAI et al. konnten ebenfalls eine glomeruläre Expression zeigen. Dabei wurde die ACE mRNA-Expression von gesunden Probanden mit der von Patienten mit Hypertension oder anderen Nierenerkrankungen, die durch eine Proliferation der Mesangiumzellen charakterisiert sind, verglichen. Es zeigte sich eine Zunahme der Expression in den pathologisch veränderten Nieren, v. a. in den Mesangium- und Epithelzellen der Glomeruli. Das restliche Nephron wurde nicht untersucht [177]. Eine Zunahme der glomerulären ACE-Proteinexpression wurde auch in Mäusen mit Diabetes mellitus beobachtet [178]. Dies suggeriert, dass ACE bei der Entstehung und Progression von Nephropathien beteiligt ist. Jedoch zeigte sich in Experimenten an Ratten mit induzierter Niereninsuffizienz, dass die ACE-Expression aktiv beeinflusst werden kann durch eine kalziumreiche Ernährung. Bei den Versuchstieren kam es zu einer Herunterregulation von ACE, welche durch Autoradiographie und Western-Blot gemessen wurde. Hierdurch kam es zu einer verminderten Albuminurie, Hypertonie und Morphologiestörungen, was den Krankheitsverlauf positiv beeinflusste [179].

Laut METZGER et al. war im humanen Nierengewebe die ACE-Proteinexpression im proximalen Tubulus dominant. Im Gegensatz zu Mäusen und Ratten, die eine sehr hohe Expression aufwiesen, war in den humanen vaskulären Endothelien, auch im glomerulären Bereich, kaum oder überhaupt kein ACE nachweisbar. Bei nierenkranken Probanden sank jedoch die tubuläre Expression und es konnte vermehrt ACE in den Endothelzellen der Arteriolen nachgewiesen werden. Dies zeigt zum einen, dass erhebliche Unterschiede zwischen den Expressionsmustern von Mensch und Versuchstieren existiert; zum anderen impliziert es abermals die Beteiligung von ACE an der renalen Pathophysiologie [180; 181].

Insgesamt zeigt sich, dass v. a. die Proteinexpression vielen Faktoren wie Nephropathien, Nahrungszufuhr und Genotyp unterliegt. Dabei zeigen sich auch Unterschiede zwischen den Spezies.

Das hier erbrachte Ergebnis deckt sich mit dem Nachweis von ACE im renalen Gefäßsystem von Nagetieren, welches im vorliegenden Experiment mit der Positivkontrolle auch mit erfasst wurde. Da die vaskuläre mRNA Expression hier vor allem in größeren Arteriolen nachweisbar war, erklärt das die fehlende Expression in den Glomeruli mit Arteriole [182]. Als weiterer Erklärungsversuch für den fehlenden mRNA-Nachweis entlang des Nephrons könnte die genotypabhängige mRNA-Expression dienen, wie sie von MIZUIRI demonstriert wurde. Angenommen, es handelt sich bei den hier verwendeten Versuchstieren um den ACE-II-Genotyp, könnten die mRNA-Spiegel so niedrig sein, dass die durchgeführten 32 PCR-Zyklen keine ausreichende Amplifikation für einen sichtbaren PCR-Nachweis erbrachten. Insgesamt lassen sich nicht alle Diskrepanzen vollständig aufschlüsseln, jedoch spielen hierbei Unterschiede zwischen den Spezies sowie auch den Untersuchungsmethoden sicherlich eine Rolle. Im proximalen Tubulus bei Maus und Ratte konnten hohe Ang II Spiegel gemessen werden [183]. Somit muss das vorliegende Ergebnis, welches ein vollständiges Fehlen von ACE in PCT und PST suggeriert, kritisch hinterfragt werden, da sich die Frage aufdrängt, woher das proximal tubuläre Ang II stammt. Ein Erklärungsansatz wäre der mittels Immunostaining erbrachte Nachweis von ACE in Glomeruli und proximalem Tubulus [114]. Dieser könnte durch eine Filtration von zirkulierendem ACE in die Bowman-Kapsel erklärt werden, wodurch es dann im proximalen Tubulus nachweisbar wäre, so wie es einst auch für Renin nahegelegt wurde [184]. Eine weitere schlüssige Erklärung lieferte der autoradiographische Nachweis von AT₁-Rezeptor-vermittelter Endozytose von Ang II in proximal-tubuläre Zellen der Maus [185; 186]. Somit schließt der fehlende Nachweis von ACE-mRNA entlang des Mausnephrons das Vorliegen eines lokalen RAS keineswegs aus, da alternative Wege sowohl für die Präsenz von ACE als auch für Ang II aufgezeigt wurden. Die Tatsache, dass Ang II hochkonzentriert im proximalen Tubulussystem zu finden ist und die Konzentration dabei um ein Vielfaches höher ist als die im Plasma [183], unterstreicht hingegen deutlich das Vorliegen eines lokal aktiven RAS.

4.6. Zusammenfassende Beurteilung

Abschließend kann man feststellen, dass alle Komponenten des RAS, mit Ausnahme von ACE, in proximalen Tubulus, speziell in den PCTs, vertreten sind. Dies lässt annehmen, dass sie vor Ort an der Homöostase von Natrium und Wasser aber auch von Bikarbonat und H^+ -Ionen, sowohl in proximalen als auch in distalen Tubulussegmenten, beteiligt sind [187; 188]. Von den PCTs sezerniertes Angiotensinogen könnte lokal, oder erst distaler im Sammelrohr, zu Angiotensin I umgewandelt werden. Weiterhin könnte dieses durch ACE aus dem renalen Gefäßsystem oder aus dem systemischen Kreislauf in Angiotensin II überführt werden, welches dann die Natrium- und Volumenresorption im proximalen und distalen Tubulus sowie auch die H^+ -ATPase Aktivität im Sammelrohr reguliert [189]. Zusätzlich zur lokalen Synthese von Ang II besteht die Möglichkeit, dass Ang II über Endozytose in die proximal-tubulären Zellen und das Tubuluslumen gelangt [185; 186]. Der fehlende Nachweis von ACE-mRNA steht dabei nicht im Widerspruch zur Existenz eines lokalen RAS, da es sowohl von basolateral aus den renalen Gefäßen, als auch durch Filtration, in das tubuläre System gelangen kann. Das Vorliegen aller weiteren Komponenten und Rezeptoren, sowie der proximal-tubuläre Nachweis von Ang I und Ang II in deutlich höheren Konzentrationen als im Plasma [183], bekräftigt vielmehr eine lokale Synthese und damit die Existenz eines lokal operierenden RAS. Der Nachweis von Renin- und AGTN-mRNA in den distalen Nephronabschnitten spricht ebenfalls für das Vorliegen eines lokalen RAS. Ein Nachweis von Rezeptor-mRNA gelang in diesen Segmenten jedoch nicht. Wie in anderen Arbeiten gezeigt, unterliegt die Rezeptorexpression sehr stark äußeren Einflüssen [132], was als Erklärung für den hier fehlenden Nachweis herangezogen werden kann. Da jedoch ein interzellulärer Transport von Rezeptorproteinen entlang des Nephrons denkbar wäre, schließt ein fehlender mRNA-Nachweis die Existenz eines lokalen, distal operierenden RAS nicht aus.

Insgesamt zeigt sich, dass trotz seiner langen Geschichte und intensiver Forschungsarbeit, das Renin-Angiotensin-System in seinen weitreichenden Wirkungen und seiner Komplexität, immer noch nicht vollständig erfasst ist. Neue Aspekte, wie beispielsweise das ACE2, bringen auch neue Perspektiven. Um klinisch Einfluss auf dieses System zu nehmen, ist es von elementarer Wichtigkeit, die

genaue Lokalisation der einzelnen Komponenten zu kennen. Gerade auch die Erforschung des lokalen RAS und der Interaktionen von lokalen und zirkulatorischen Komponenten des RAS birgt viel Potenzial, denn die lokalen Effekte sind mannigfaltig. Die vorliegende Arbeit hat sowohl bekannte Expressionsmuster bestätigt als auch neue Aspekte, gerade hinsichtlich der Expression in distalen Nephronabschnitten, gezeigt und damit die Existenz eines lokalen, parakrinen RAS untermauert. Hier könnten sich zahlreiche Anknüpfungspunkte ergeben um sowohl organspezifisch als auch systemisch therapeutisch zu interagieren.

5. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt die zentrale Rolle in der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie auch in der Blutdruckregulation bei Säugetieren. Hierbei wurde sowohl ein systemisches, als auch ein lokales RAS in verschiedenen Organsystemen beschrieben. In dieser Arbeit wurde die segmentspezifische Expression von RAS-Komponenten entlang des Nephrons in der Mausnieren untersucht.

Definierte Nephronsegmente von adulten C57BL/6 Mäusen wurden nach Kollagenaseverdau mikrodissiziert und die mRNA wurde isoliert. Anschließend wurde die Genexpression von Renin, Angiotensinogen (AGTN), AT_{1a}-, AT_{1b}- und AT₂-Rezeptor sowie Angiotensin Converting Enzyme (ACE) mittels RT-PCR untersucht.

Renin mRNA war in Glomeruli, proximalem Tubulus (PCT und PST), distalem Konvolut (DCT) und kortikalem Sammelrohr (CCD) nachweisbar. AGTN mRNA ließ sich in PCT, PST, im dünnen Teil des absteigenden und medullären Teil der aufsteigenden Henle Schleife (dTL und mTAL) detektieren. AT_{1a}-, AT_{1b}- und AT₂-Rezeptor mRNA war in Glomeruli und proximalen Konvolut (PCT) nachweisbar. ACE mRNA war trotz positivem Signal in der Positivkontrolle in keinem Segment des Mausnephrons nachweisbar. Dies ist mit der bekannten Expression von ACE mRNA im renalen Gefäßsystem vereinbar.

Zusammenfassend lässt sich eine segmentspezifische Verteilung der verschiedenen RAS-Komponenten feststellen. Hierbei zeigt sich, dass alle Komponenten, mit Ausnahme von ACE, im proximalen Konvolut vertreten sind. Dies untermauert die Hypothese eines lokal aktiven RAS und unterstreicht die Beteiligung des RAS an der Elektrolyt- und Volumenhomöostase.

6. Quellenverzeichnis

- [1] Nishimura, H. (1978). Physiological evolution of the renin-angiotensin system. *Jpn Heart J* 19, 806-22.
- [2] Ganten, D., Ruckpaul, K., and Köhrle, J., Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, Springer Berlin, Heidelberg, 2006.
- [3] Paul, M. (2000). The renin-angiotensin system as the basic principle for hypertension and coronary heart diseases--role of genetic factors. *Z Kardiol* 89, 264-8.
- [4] Klinke, R., Pape, H.-C., and Silbernagl, S., Lehrbuch Physiologie, Thieme, Stuttgart, 2006.
- [5] Horn, F., Biochemie des Menschen, Thieme, Stuttgart, 2006.
- [6] Sealey, J.E., White, R.P., Laragh, J.H., and Rubin, A.L. (1977). Plasma prorenin and renin in anephric patients. *Circ Res* 41, 17-21.
- [7] Aguilera, G., and Catt, K.J. (1979). Loci of action of regulators of aldosterone biosynthesis in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology* 104, 1046-52.
- [8] Campbell, D.J. (1987). Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79, 1-6.
- [9] Cassis, L.A., Police, S.B., Yiannikouris, F., and Thatcher, S.E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 10, 93-8.
- [10] Steckelings, U.M., Wollschlager, T., Peters, J., Henz, B.M., Hermes, B., and Artuc, M. (2004). Human skin: source of and target organ for angiotensin II. *Exp Dermatol* 13, 148-54.
- [11] Wright, J.W., and Harding, J.W. (1997). Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 96-124.
- [12] Zaman, M.A., Oparil, S., and Calhoun, D.A. (2002). Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 1, 621-36.
- [13] Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., and Kurtz, A. (2007). Renin release. *Physiology (Bethesda)* 22, 310-9.
- [14] Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J.D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109, 1417-27.
- [15] Clauser, E., Bouhnik, J., Coezy, E., Corvol, P., and Menard, J. (1983). Synthesis and release of immunoreactive angiotensinogen by rat liver slices. *Endocrinology* 112, 1188-93.
- [16] Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y.V., Lifton, R.P., Williams, C.S., Charru, A., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Williams, R.R., Lalouel, J.M., and et al. (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71, 169-80.
- [17] Regitz-Zagrosek, V., and Unger, T., Angiotensin-Rezeptorantagonisten, Uni - Med, Bremen, 2003.
- [18] Muller, A.M., Maas, M., Kozianka, U., and Franke, F.E. (2006). Expression of angiotensin I converting enzyme in pulmonary hypertension. *Pathologe* 27, 133-9.
- [19] Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S.E., Kusumi, K., Bunker, R.K., Mao, Y.P., Ganten, D., Dzau, V.J., and Lander, E.S. (1991). Genetic mapping of a gene

- causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67, 213-24.
- [20] Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J.P., Arveiler, D., Luc, G., Bard, J.M., Bara, L., Ricard, S., and et al. (1992). Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359, 641-4.
- [21] Johnston, C.I., and Risvanis, J. (1997). Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues. *Am J Hypertens* 10, 306S-310S.
- [22] Tonnesen, M.G., Klempner, M.S., Austen, K.F., and Wintroub, B.U. (1982). Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest* 69, 25-30.
- [23] Kaschina, E., and Unger, T. (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12, 70-88.
- [24] Strehlow, K., Wassmann, S., Bohm, M., and Nickenig, G. (2000). Angiotensin AT1 receptor over-expression in hypercholesterolaemia. *Ann Med* 32, 386-9.
- [25] Bucher, M., Hobbhahn, J., and Kurtz, A. (2001). Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. *Crit Care Med* 29, 1750-5.
- [26] Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52, 639-72.
- [27] Thannickal, V.J., Day, R.M., Klinz, S.G., Bastien, M.C., Larios, J.M., and Fanburg, B.L. (2000). Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *Faseb J* 14, 1741-8.
- [28] Oliverio, M.I., Kim, H.S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C.F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T.M. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15496-501.
- [29] Unger, T., and Sandmann, S. (2000). Angiotensin receptor blocker selectivity at the AT1- and AT2-receptors: conceptual and clinical effects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, S6-9.
- [30] Laragh, J.H. (1987). Two forms of vasoconstriction in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 60, 82G-93G.
- [31] Fischer, J.W., Stoll, M., Hahn, A.W., and Unger, T. (2001). Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells. *Cardiovasc Res* 51, 784-91.
- [32] Sasamura, H., Shimizu-Hirota, R., Nakaya, H., and Saruta, T. (2001). Effects of AT1 receptor antagonist on proteoglycan gene expression in hypertensive rats. *Hypertens Res* 24, 165-72.
- [33] Tokioka-Akagi, T., Fujimori, A., Shibasaki, M., Inagaki, O., and Yanagisawa, I. (2001). Comparison of the angiotensin II type 1-receptor antagonist YM358 and the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril in rats with cardiac volume overload. *Jpn J Pharmacol* 86, 79-85.
- [34] Malmqvist, K., Kahan, T., Edner, M., Held, C., Hagg, A., Lind, L., Muller-Brunotte, R., Nystrom, F., Ohman, K.P., Osbakken, M.D., and Ostergern, J. (2001). Regression of left ventricular hypertrophy in human hypertension with irbesartan. *J Hypertens* 19, 1167-76.

- [35] Strawn, W.B., Chappell, M.C., Dean, R.H., Kivlighn, S., and Ferrario, C.M. (2000). Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101, 1586-93.
- [36] Balt, J.C., Mathy, M.J., Nap, A., Pfaffendorf, M., and van Zwieten, P.A. (2001). Effect of the AT1-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 38, 141-8.
- [37] Balt, J.C., Mathy, M.J., Pfaffendorf, M., and van Zwieten, P.A. (2001). Inhibition of facilitation of sympathetic neurotransmission and angiotensin II-induced pressor effects in the pithed rat: comparison between valsartan, candesartan, eprosartan and embusartan. *J Hypertens* 19, 2241-50.
- [38] Nakamura, S., Nakamura, I., Ma, L., Vaughan, D.E., and Fogo, A.B. (2000). Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 58, 251-9.
- [39] Brown, N.J., and Vaughan, D.E. (2000). Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med* 45, 419-29.
- [40] Chen, H.C., Bouchie, J.L., Perez, A.S., Clermont, A.C., Izumo, S., Hampe, J., and Feener, E.P. (2000). Role of the angiotensin AT(1) receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2297-302.
- [41] Goodfield, N.E., Newby, D.E., Ludlam, C.A., and Flapan, A.D. (1999). Effects of acute angiotensin II type 1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure. *Circulation* 99, 2983-5.
- [42] Hein, L., Dzau, V.J., and Barsh, G.S. (1995). Linkage mapping of the angiotensin AT2 receptor gene (*Agtr2*) to the mouse X chromosome. *Genomics* 30, 369-71.
- [43] Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y.Z. (1996). Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14, S95-103.
- [44] de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52, 415-72.
- [45] Ichiki, T., Kambayashi, Y., and Inagami, T. (1996). Differential inducibility of angiotensin II AT2 receptor between SHR and WKY vascular smooth muscle cells. *Kidney Int Suppl* 55, S14-7.
- [46] Kambayashi, Y., Nagata, K., Ichiki, T., and Inagami, T. (1996). Insulin and insulin-like growth factors induce expression of angiotensin type-2 receptor in vascular-smooth-muscle cells. *Eur J Biochem* 239, 558-65.
- [47] Ichiki, T., Kambayashi, Y., and Inagami, T. (1995). Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res* 77, 1070-6.
- [48] Horiuchi, M., Koike, G., Yamada, T., Mukoyama, M., Nakajima, M., and Dzau, V.J. (1995). The growth-dependent expression of angiotensin II type 2 receptor is regulated by transcription factors interferon regulatory factor-1 and -2. *J Biol Chem* 270, 20225-30.
- [49] Csikos, T., Balmforth, A.J., Grojec, M., Gohlke, P., Culman, J., and Unger, T. (1998). Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 142-7.

- [50] Kang, J., Posner, P., and Summers, C. (1994). Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 267, C1389-97.
- [51] Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11, 1-6.
- [52] Akishita, M., Ito, M., Lehtonen, J.Y., Daviet, L., Dzau, V.J., and Horiuchi, M. (1999). Expression of the AT₂ receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth. *J Clin Invest* 103, 63-71.
- [53] Fischer, T.A., Singh, K., O'Hara, D.S., Kaye, D.M., and Kelly, R.A. (1998). Role of AT₁ and AT₂ receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol* 275, H906-16.
- [54] Stroth, U., Blume, A., Mielke, K., and Unger, T. (2000). Angiotensin AT₂ receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Brain Res Mol Brain Res* 78, 175-80.
- [55] Gendron, L., Oligny, J.F., Payet, M.D., and Gallo-Payet, N. (2003). Cyclic AMP-independent involvement of Rap1/B-Raf in the angiotensin II AT₂ receptor signaling pathway in NG108-15 cells. *J Biol Chem* 278, 3606-14.
- [56] Wiemer, G., Scholkens, B.A., Wagner, A., Heitsch, H., and Linz, W. (1993). The possible role of angiotensin II subtype AT₂ receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *J Hypertens Suppl* 11, S234-5.
- [57] Zhao, Y., Biermann, T., Luther, C., Unger, T., Culman, J., and Gohlke, P. (2003). Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT₂ receptor-mediated differentiation in PC12 W cells. *J Neurochem* 85, 759-67.
- [58] Gohlke, P., Pees, C., and Unger, T. (1998). AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31, 349-55.
- [59] Siragy, H.M., and Carey, R.M. (1999). Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33, 1237-42.
- [60] Nouet, S., Amzallag, N., Li, J.M., Louis, S., Seitz, I., Cui, T.X., Alleaume, A.M., Di Benedetto, M., Boden, C., Masson, M., Strosberg, A.D., Horiuchi, M., Couraud, P.O., and Nahmias, C. (2004). Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT₂ receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279, 28989-97.
- [61] Wruck, C.J., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Scheffe, J.H., Kruse, M.L., Stoll, M., and Unger, T. (2005). Regulation of transport of the angiotensin AT₂ receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 57-64.
- [62] Kohout, T.A., and Rogers, T.B. (1995). Angiotensin II activates the Na⁺/HCO₃⁻ symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells. *J Biol Chem* 270, 20432-8.
- [63] Siragy, H.M., Inagami, T., Ichiki, T., and Carey, R.M. (1999). Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6506-10.
- [64] Stoll, M., Steckelings, U.M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., and Unger, T. (1995). The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 651-7.
- [65] Nakajima, M., Hutchinson, H.G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1995). The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor:

- gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10663-7.
- [66] Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U.M., Bottari, S.P., and Unger, T. (1996). The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122, 59-67.
- [67] Stroth, U., Meffert, S., Gallinat, S., and Unger, T. (1998). Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT₂ receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 53, 187-95.
- [68] Miura, S., and Karnik, S.S. (2000). Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *Embo J* 19, 4026-35.
- [69] Tea, B.S., Der Sarkissian, S., Touyz, R.M., Hamet, P., and deBlois, D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 35, 1069-73.
- [70] Busche, S., Gallinat, S., Bohle, R.M., Reinecke, A., Seebeck, J., Franke, F., Fink, L., Zhu, M., Summers, C., and Unger, T. (2000). Expression of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 157, 605-11.
- [71] Adachi, Y., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Takahashi, N., Kawakami, R., Nakanishi, M., Nakagawa, Y., Tanimoto, K., Saitoh, Y., Yasuno, S., Usami, S., Iwai, M., Horiuchi, M., and Nakao, K. (2003). Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation* 107, 2406-8.
- [72] Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M., and Iwasaka, T. (1998). Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 83, 1035-46.
- [73] Matsumoto, T., Ozono, R., Oshima, T., Matsuura, H., Sueda, T., Kajiyama, G., and Kambe, M. (2000). Type 2 angiotensin II receptor is downregulated in cardiomyocytes of patients with heart failure. *Cardiovasc Res* 46, 73-81.
- [74] Bartunek, J., Weinberg, E.O., Tajima, M., Rohrbach, S., and Lorell, B.H. (1999). Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation* 99, 22-5.
- [75] Senbonmatsu, T., Ichihara, S., Price, E., Jr., Gaffney, F.A., and Inagami, T. (2000). Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 106, R25-9.
- [76] Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J., and Kobilka, B.K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744-7.
- [77] Herold, G., Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, Gerd Herold, Köln, 2010.
- [78] Silva, P.M. (2010). From endothelial dysfunction to vascular occlusion: role of the renin-angiotensin system. *Rev Port Cardiol* 29, 801-24.
- [79] Greten, H., and Andrassy, K., Innere Medizin verstehen - lernen - anwenden ; 360 Tabellen, Thieme, Stuttgart [u.a.], 2005.
- [80] Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D. (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144, 2179-83.

- [81] Cupples, L.A., Gagnon, D.R., Wong, N.D., Ostfeld, A.M., and Kannel, W.B. (1993). Preexisting cardiovascular conditions and long-term prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham Study. *Am Heart J* 125, 863-72.
- [82] Berry, C., Brosnan, M.J., Fennell, J., Hamilton, C.A., and Dominiczak, A.F. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 247-55.
- [83] Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., and Harrison, D.G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97, 1916-23.
- [84] Sadoshima, J., and Izumo, S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73, 413-23.
- [85] Williams, G.H. (1988). Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med* 319, 1517-25.
- [86] Lewis, E.J., Hunsicker, L.G., Bain, R.P., and Rohde, R.D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329, 1456-62.
- [87] Waeber, B., Burnier, M., Nussberger, J., and Brunner, H.R. (1996). Experience with angiotensin II antagonists in hypertensive patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 3, S142-6.
- [88] Brown, N.J., Gainer, J.V., Stein, C.M., and Vaughan, D.E. (1999). Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension* 33, 1431-5.
- [89] Bouillet, L., Boccon-Gibod, I., and Massot, C. (2011). Bradykinin mediated angioedema. *Rev Med Interne*.
- [90] Neal, B., MacMahon, S., and Chapman, N. (2000). Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet* 356, 1955-64.
- [91] Burnier, M., and Brunner, H.R. (2000). Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet* 355, 637-45.
- [92] Nakashima, M., Uematsu, T., Kosuge, K., and Kanamaru, M. (1992). Pilot study of the uricosuric effect of DuP-753, a new angiotensin II receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 42, 333-5.
- [93] Pitt, B., Zannad, F., Remme, W.J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., and Wittes, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341, 709-17.
- [94] Calhoun, D.A., Zaman, M.A., and Nishizaka, M.K. (2002). Resistant hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4, 221-8.
- [95] Burgess, E. (2004). Eplerenone in hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 5, 2573-81.
- [96] Riccioni, G., Vitulano, N., D'Orazio, N., and Bellocchi, F. (2009). Aliskiren, the first approved renin inhibitor: Clinical application and safety in the treatment of hypertension. *Adv Ther* 26, 700-10.
- [97] Palatini, P., Jung, W., Shlyakhto, E., Botha, J., Bush, C., and Keefe, D.L. (2010). Maintenance of blood-pressure-lowering effect following a missed dose of aliskiren, irbesartan or ramipril: results of a randomized, double-blind study. *J Hum Hypertens* 24, 93-103.

- [98] Berl, T. (2009). Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10, 1-8.
- [99] Geiger, H., Barranco, E., Gorostidi, M., Taylor, A., Zhang, X., Xiang, Z., and Zhang, J. (2009). Combination therapy with various combinations of aliskiren, valsartan, and hydrochlorothiazide in hypertensive patients not adequately responsive to hydrochlorothiazide alone. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 11, 324-32.
- [100] Doulton, T.W., and MacGregor, G.A. (2009). Combination renin-angiotensin system blockade with the renin inhibitor aliskiren in hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10, 185-9.
- [101] McMurray, J.J., Abraham, W.T., Dickstein, K., Kober, L., Massie, B.M., and Krum, H. (2012). Aliskiren, ALTITUDE, and the implications for ATMOSPHERE. *Eur J Heart Fail* 14, 341-3.
- [102] Novartis. (2012). Rote-Hand-Brief über potenzielle Risiken kardiovaskulärer oder renaler unerwünschter Ereignisse bei Patienten mit Typ-2-Diabetes und Nierenfunktionsstörungen und/oder kardiovaskulärer Erkrankungen, die mit Aliskiren-haltigen Arzneimitteln behandelt werden. *Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ)*
<http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2012/20120105.pdf>.
- [103] Novartis. (2011). Novartis announces termination of ALTITUDE study with Rasilez®/Tekturna® in high risk patients with diabetes and renal impairment. *Novartis Global [online]* <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2011/1572562.shtml>.
- [104] Novartis. (2012). Rote-Hand-Brief: Wichtige Informationen zu neuen Gegenanzeigen und Warnhinweisen bei der Anwendung Aliskiren-haltiger Arzneimittel in Kombination mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptor-Blockern. *Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ)*
<http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2012/20120227.pdf>.
- [105] Paulis, L., Steckelings, U.M., and Unger, T. (2012). Key advances in antihypertensive treatment. *Nat Rev Cardiol* 9, 276-85.
- [106] Reinhold, S.W., Vitzthum, H., Filbeck, T., Wolf, K., Lattas, C., Riegger, G.A., Kurtz, A., and Kramer, B.K. (2006). Gene expression of 5-, 12-, and 15-lipoxygenases and leukotriene receptors along the rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F864-72.
- [107] Reinhold, S.W., Kruger, B., Barner, C., Zoicas, F., Kammerl, M.C., Hoffmann, U., Bergler, T., Banas, B., and Kramer, B.K. (2012). Nephron-specific expression of components of the renin-angiotensin-aldosterone system in the mouse kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 13, 46-55.
- [108] Phillips, M.I., Speakman, E.A., and Kimura, B. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43, 1-20.
- [109] Moe, O.W., Ujiie, K., Star, R.A., Miller, R.T., Widell, J., Alpern, R.J., and Henrich, W.L. (1993). Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 91, 774-9.
- [110] Tank, J.E., Henrich, W.L., and Moe, O.W. (1997). Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl. *Am J Physiol* 273, F892-8.
- [111] Prieto-Carrasquero, M.C., Harrison-Bernard, L.M., Kobori, H., Ozawa, Y., Hering-Smith, K.S., Hamm, L.L., and Navar, L.G. (2004). Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension* 44, 223-9.

- [112] Gomez, R.A., Lynch, K.R., Chevalier, R.L., Everett, A.D., Johns, D.W., Wilfong, N., Peach, M.J., and Carey, R.M. (1988). Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 254, F900-6.
- [113] Chen, M., Harris, M.P., Rose, D., Smart, A., He, X.R., Kretzler, M., Briggs, J.P., and Schnermann, J. (1994). Renin and renin mRNA in proximal tubules of the rat kidney. *J Clin Invest* 94, 237-43.
- [114] Gonzalez-Villalobos, R.A., Satou, R., Ohashi, N., Semprun-Prieto, L.C., Katsurada, A., Kim, C., Upchurch, G.M., Prieto, M.C., Kobori, H., and Navar, L.G. (2010). Intrarenal mouse renin-angiotensin system during ANG II-induced hypertension and ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F150-7.
- [115] Lantelme, P., Rohrwasser, A., Gociman, B., Hillas, E., Cheng, T., Petty, G., Thomas, J., Xiao, S., Ishigami, T., Herrmann, T., Terreros, D.A., Ward, K., and Lalouel, J.M. (2002). Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and Renin in mouse. *Hypertension* 39, 1007-14.
- [116] Rohrwasser, A., Morgan, T., Dillon, H.F., Zhao, L., Callaway, C.W., Hillas, E., Zhang, S., Cheng, T., Inagami, T., Ward, K., Terreros, D.A., and Lalouel, J.M. (1999). Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 34, 1265-74.
- [117] Kang, J.J., Toma, I., Sipos, A., Meer, E.J., Vargas, S.L., and Peti-Peterdi, J. (2008). The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension* 51, 1597-604.
- [118] Kim, H.S., Kregge, J.H., Kluckman, K.D., Hagaman, J.R., Hodgin, J.B., Best, C.F., Jennette, J.C., Coffman, T.M., Maeda, N., and Smithies, O. (1995). Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2735-9.
- [119] Darby, I.A., and Sernia, C. (1995). In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res* 281, 197-206.
- [120] Kobori, H., Ozawa, Y., Suzuki, Y., Prieto-Carrasquero, M.C., Nishiyama, A., Shoji, T., Cohen, E.P., and Navar, L.G. (2006). Young Scholars Award Lecture: Intratubular angiotensinogen in hypertension and kidney diseases. *Am J Hypertens* 19, 541-50.
- [121] Ingelfinger, J.R., Schunkert, H., Ellison, K.E., Pivor, M., Zuo, W.M., Pratt, R., and Dzau, V.J. (1990). Intrarenal angiotensinogen: localization and regulation. *Pediatr Nephrol* 4, 424-8.
- [122] Ingelfinger, J.R., Pratt, R.E., Ellison, K., and Dzau, V.J. (1986). Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest* 78, 1311-5.
- [123] Ingelfinger, J.R., Zuo, W.M., Fon, E.A., Ellison, K.E., and Dzau, V.J. (1990). In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest* 85, 417-23.
- [124] Yamaguchi, S., Tamura, K., Nyui, N., Hibi, K., Ishigami, T., Kihara, M., Yabana, M., Sesoko, S., Ishii, M., and Umemura, S. (1998). Developmental changes in expression of angiotensinogen mRNA in rat nephron segments. *Hypertens Res* 21, 155-61.
- [125] Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., and Marumo, F. (1993). PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int* 43, 1251-9.

- [126] Schubert, B., Fassnacht, M., Beuschlein, F., Zenkert, S., Allolio, B., and Reincke, M. (2001). Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54, 627-32.
- [127] Li, X., Shams, M., Zhu, J., Khalig, A., Wilkes, M., Whittle, M., Barnes, N., and Ahmed, A. (1998). Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 101, 442-54.
- [128] AbdAlla, S., Lothar, H., el Massiery, A., and Quitterer, U. (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7, 1003-9.
- [129] Bataller, R., Gines, P., Nicolas, J.M., Gorbis, M.N., Garcia-Ramallo, E., Gasull, X., Bosch, J., Arroyo, V., and Rodes, J. (2000). Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 118, 1149-56.
- [130] Allen, A.M., Zhuo, J., and Mendelsohn, F.A. (2000). Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13, 31S-38S.
- [131] Mujais, S.K., Kauffman, S., and Katz, A.I. (1986). Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J Clin Invest* 77, 315-8.
- [132] Tsurumi, Y., Tamura, K., Tanaka, Y., Koide, Y., Sakai, M., Yabana, M., Noda, Y., Hashimoto, T., Kihara, M., Hirawa, N., Toya, Y., Kiuchi, Y., Iwai, M., Horiuchi, M., and Umemura, S. (2006). Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int* 69, 488-94.
- [133] Harrison-Bernard, L.M., Navar, L.G., Ho, M.M., Vinson, G.P., and el-Dahr, S.S. (1997). Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 273, F170-7.
- [134] Miyata, N., Park, F., Li, X.F., and Cowley, A.W., Jr. (1999). Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 277, F437-46.
- [135] Matsubara, H., Sugaya, T., Murasawa, S., Nozawa, Y., Mori, Y., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Shibasaki, Y., Moriguchi, Y., Tanaka, Y., Iwasaka, T., and Inada, M. (1998). Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron* 80, 25-34.
- [136] Inagami, T., Yamano, Y., Guo, D.F., Furuta, H., Ohyama, K., Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., and Ichiki, T. (1994). Angiotensin II receptors: cloning and expression. *Braz J Med Biol Res* 27, 1733-8.
- [137] Bouby, N., Hus-Citharel, A., Marchetti, J., Bankir, L., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1997). Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* 8, 1658-67.
- [138] Kakinuma, Y., Fogo, A., Inagami, T., and Ichikawa, I. (1993). Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* 43, 1229-35.
- [139] Schmid, C., Della Bruna, R., Schricker, K., Bachmann, S., and Kurtz, A. (1996). Zonal expression of angiotensin II-AT1-receptor genes in rat kidneys. *Exp Nephrol* 4, 322-9.

- [140] Gasc, J.M., Shanmugam, S., Sibony, M., and Corvol, P. (1994). Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 24, 531-7.
- [141] Gasc, J.M., Monnot, C., Clauser, E., and Corvol, P. (1993). Co-expression of type 1 angiotensin II receptor (AT1R) and renin mRNAs in juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Endocrinology* 132, 2723-5.
- [142] Chansel, D., Llorens-Cortes, C., Vandermeersch, S., Pham, P., and Ardaillou, R. (1996). Regulation of angiotensin II receptor subtypes by dexamethasone in rat mesangial cells. *Hypertension* 27, 867-74.
- [143] Tsutsumi, K., and Saavedra, J.M. (1991). Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 261, R209-16.
- [144] Sechi, L.A., Sechi, G., De Carli, S., Griffin, C.A., Schambelan, M., and Bartoli, E. (1993). Angiotensin receptors in the rat myocardium during pre- and postnatal development. *Cardiologia* 38, 471-6.
- [145] Correa, F.M., De Oliveira, A.M., Viswanathan, M., and Saavedra, J.M. (1994). Autoradiographic localization and characterization of angiotensin II receptor subtypes in the rat thymus. *Peptides* 15, 821-4.
- [146] Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., and Smith, R.D. (1993). New perspectives in angiotensin system control. *J Hum Hypertens* 7 Suppl 2, S19-31.
- [147] VanAtten, M.K., Ensinger, C.L., Chiu, A.T., McCall, D.E., Nguyen, T.T., Wexler, R.R., and Timmermans, P.B. (1993). A novel series of selective, non-peptide inhibitors of angiotensin II binding to the AT2 site. *J Med Chem* 36, 3985-92.
- [148] Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T., and Herdegen, T. (1998). Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 111-22.
- [149] Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J., and Unger, T. (1998). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188, 661-70.
- [150] Zhu, Y.Z., Chimon, G.N., Zhu, Y.C., Lu, Q., Li, B., Hu, H.Z., Yap, E.H., Lee, H.S., and Wong, P.T. (2000). Expression of angiotensin II AT2 receptor in the acute phase of stroke in rats. *Neuroreport* 11, 1191-4.
- [151] Viswanathan, M., de Oliveira, A.M., Correa, F.M., and Saavedra, J.M. (1994). Expression of a novel non-angiotensin II [125I]CGP 42112 binding site in healing wounds of the rat brain. *Brain Res* 658, 265-70.
- [152] Chung, O., Stoll, M., and Unger, T. (1996). Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Press Suppl* 2, 47-52.
- [153] Zhu, Y.Z., Zhu, Y.C., Li, J., Schafer, H., Schmidt, W., Yao, T., and Unger, T. (2000). Effects of losartan on haemodynamic parameters and angiotensin receptor mRNA levels in rat heart after myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 257-62.
- [154] Steckelings, U.M., Henz, B.M., Wiehstutz, S., Unger, T., and Artuc, M. (2005). Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 153, 887-93.
- [155] Chung, O., Kuhl, H., Stoll, M., and Unger, T. (1998). Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl* 67, S95-9.

- [156] Grady, E.F., Sechi, L.A., Griffin, C.A., Schambelan, M., and Kalinyak, J.E. (1991). Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88, 921-33.
- [157] Zhuo, J., Alcorn, D., Harris, P.J., and Mendelsohn, F.A. (1993). Localization and properties of angiotensin II receptors in rat kidney. *Kidney Int Suppl* 42, S40-6.
- [158] Zhuo, J., Song, K., Harris, P.J., and Mendelsohn, F.A. (1992). In vitro autoradiography reveals predominantly AT₁ angiotensin II receptors in rat kidney. *Ren Physiol Biochem* 15, 231-9.
- [159] Chung, O., and Unger, T. (1998). Unopposed stimulation of the angiotensin AT₂ receptor in the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 13, 537-40.
- [160] Chung, O., and Unger, T. (1998). Angiotensin II receptors in the kidney. *Kidney Blood Press Res* 21, 245-8.
- [161] Chansel, D., Czekalski, S., Pham, P., and Ardaillou, R. (1992). Characterization of angiotensin II receptor subtypes in human glomeruli and mesangial cells. *Am J Physiol* 262, F432-41.
- [162] Wang, Z.Q., Millatt, L.J., Heiderstadt, N.T., Siragy, H.M., Johns, R.A., and Carey, R.M. (1999). Differential regulation of renal angiotensin subtype AT_{1A} and AT₂ receptor protein in rats with angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 33, 96-101.
- [163] Joly, E., Nonclercq, D., Caron, N., Mertens, J., Flamion, B., Toubeau, G., Kramp, R., and Bouby, N. (2005). Differential regulation of angiotensin II receptors during renal injury and compensatory hypertrophy in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 241-8.
- [164] Ozono, R., Wang, Z.Q., Moore, A.F., Inagami, T., Siragy, H.M., and Carey, R.M. (1997). Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30, 1238-46.
- [165] Shanmugam, S., Llorens-Cortes, C., Clauser, E., Corvol, P., and Gasc, J.M. (1995). Expression of angiotensin II AT₂ receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 268, F922-30.
- [166] Inagami, T., Eguchi, S., Tsuzuki, S., and Ichiki, T. (1997). Angiotensin II receptors AT₁ and AT₂--new mechanisms of signaling and antagonistic effects of AT₁ and AT₂. *Jpn Circ J* 61, 807-13.
- [167] Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 23, 177-83.
- [168] Danilczyk, U., Eriksson, U., Crackower, M.A., and Penninger, J.M. (2003). A story of two ACEs. *J Mol Med* 81, 227-34.
- [169] Esther, C.R., Marino, E.M., Howard, T.E., Machaud, A., Corvol, P., Capecchi, M.R., and Bernstein, K.E. (1997). The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 99, 2375-85.
- [170] Bernstein, K.E. (1998). ACE knockout mice--lessons for adult nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 13, 2991-4.
- [171] Stec, D.E., and Sigmund, C.D. (2001). Physiological insights from genetic manipulation of the renin-angiotensin system. *News Physiol Sci* 16, 80-4.
- [172] Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S.Y., Allen, A.M., Ohishi, M., and Mendelsohn, F.A. (1998). Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT₁, AT₂ and AT₄ receptors. *J Hypertens* 16, 2027-37.
- [173] Muller, A.M., Gruhn, K., Lange, S., Franke, F.E., and Muller, K.M. (2004). Angiotensin converting enzyme (ACE, CD143) in the regular pulmonary vasculature. *Pathologe* 25, 141-6.

- [174] Bernstein, K.E., Xiao, H.D., Frenzel, K., Li, P., Shen, X.Z., Adams, J.W., and Fuchs, S. (2005). Six truisms concerning ACE and the renin-angiotensin system deduced from the genetic analysis of mice. *Circ Res* 96, 1135-44.
- [175] Marchetti, J., Roseau, S., and Alhenc-Gelas, F. (1987). Angiotensin I converting enzyme and kinin-hydrolyzing enzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int* 31, 744-51.
- [176] Mizuiri, S., Hemmi, H., Kumanomidou, H., Iwamoto, M., Miyagi, M., Sakai, K., Aikawa, A., Ohara, T., Yamada, K., Shimatake, H., and Hasegawa, A. (2001). Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int* 60, 1124-30.
- [177] Lai, K.N., Leung, J.C., Lai, K.B., To, W.Y., Yeung, V.T., and Lai, F.M. (1998). Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens* 16, 91-102.
- [178] Ye, M., Wysocki, J., William, J., Soler, M.J., Cokic, I., and Battle, D. (2006). Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 17, 3067-75.
- [179] Porsti, I., Fan, M., Koobi, P., Jolma, P., Kalliovalkama, J., Vehmas, T.I., Helin, H., Holthofer, H., Mervaala, E., Nyman, T., and Tikkanen, I. (2004). High calcium diet down-regulates kidney angiotensin-converting enzyme in experimental renal failure. *Kidney Int* 66, 2155-66.
- [180] Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G., and Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59, 251-87.
- [181] Metzger, R., Bohle, R.M., Pauls, K., Eichner, G., Alhenc-Gelas, F., Danilov, S.M., and Franke, F.E. (1999). Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int* 56, 1442-54.
- [182] Soler, M.J., Ye, M., Wysocki, J., William, J., Lloveras, J., and Battle, D. (2009). Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F398-405.
- [183] Navar, L.G., Harrison-Bernard, L.M., Imig, J.D., Cervenka, L., and Mitchell, K.D. (2000). Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am J Hypertens* 13, 45S-54S.
- [184] Taugner, R., Hackenthal, E., Inagami, T., Nobiling, R., and Poulsen, K. (1982). Vascular and tubular renin in the kidneys of mice. *Histochemistry* 75, 473-84.
- [185] Li, X.C., Hopfer, U., and Zhuo, J.L. (2009). AT1 receptor-mediated uptake of angiotensin II and NHE-3 expression in proximal tubule cells through a microtubule-dependent endocytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F1342-52.
- [186] Li, X.C., and Zhuo, J.L. (2008). In vivo regulation of AT1a receptor-mediated intracellular uptake of [¹²⁵I]Val⁵-ANG II in the kidneys and adrenals of AT1a receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F293-302.
- [187] Quan, A., and Baum, M. (1996). Endogenous production of angiotensin II modulates rat proximal tubule transport. *J Clin Invest* 97, 2878-82.
- [188] Schlatter, E., Haxelmans, S., Ankorina, I., and Kleita, R. (1995). Regulation of Na⁺/H⁺ exchange by diadenosine polyphosphates, angiotensin II, and vasopressin in rat cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 6, 1223-9.
- [189] Valles, P., Wysocki, J., and Battle, D. (2005). Angiotensin II and renal tubular ion transport. *ScientificWorldJournal* 5, 680-90.

7. Abkürzungsverzeichnis

Aa	Arteriae
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ACE2 (ACEH)	ACE-Homolog
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGTN	Angiotensinogen
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATB	<i>AT₂-receptor binding protein</i>
ATIP	<i>AT₂-interacting protein</i>
AT-R	Angiotensin-Rezeptor
ATRAP	<i>AT₁-receptor-associated protein</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>Cortical collecting duct</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CnT	<i>Connecting tubules</i>
cTAL	<i>Cortical thick ascending limb</i>
DAG	Diacylglycerol

DCT	<i>Distal convoluted tubule</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dTL	<i>Descending thin limb</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinasen
Glo-	Glomerulus ohne Arteriole
Glo+	Glomerulus mit Arteriole
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IMCD	<i>Inner medullary collecting duct</i>
IP3	Inositoltriphosphat
IRF	Interferon-regulierender-Faktor
IRS	<i>Insulin-response-sequence</i>
ISH	In situ Hybridisation
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
LDL	<i>Low density Lipoprotein</i>
LH	Luteinisierendes Hormon
MAP	Mitogenaktiviertes Protein
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>

MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MKP	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Phosphatase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTAL	<i>Medullary thick ascending limb</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Oligo-dT	<i>Oligodeoxythymidylic acid</i>
OMCD	<i>Outer medullary collecting duct</i>
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	<i>Proximal convolute tubule</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PKC	Poteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP	Protein-Phosphatase
PST	<i>Proximal straight tubule</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TAL	<i>Thick ascending limb</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TL	<i>Thin limb</i>

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
tPA	<i>Tissue-plasmiogen-activator</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Banas, Leiter des Bereichs Nephrologie an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universitätsklinik Regensburg, der mir freundlicherweise dieses sehr interessante Thema überließ und mich hervorragend betreute.

Herrn PD Dr. Karl-Peter Ittner, Leiter des Bereichs Notarztwagen an der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Regensburg, danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz, Leiter des Instituts für Physiologie der Universität Regensburg, danke ich für die Ermöglichung des Zugangs und der uneingeschränkten Nutzung der Laboreinrichtungen seines Instituts.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Stephan Reinhold, der mir durch seine freundliche, geduldige Art und seiner intensiven und unermüdlichen Unterstützung bei der Planung der Tierexperimente, sowie bei der Erlernung labortechnischer Methoden, kompetent zur Seite stand.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei allen Labormitarbeitern des Physiologischen Instituts bedanken, die mir stets freundlich und hilfreich zur Seite standen und mir das Gefühl gaben, ein vollwertiges Mitglied der Arbeitsgruppe zu sein. Allen voran danke ich Frau Veronika Kattler, die mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützte und für auftauchende Probleme immer eine gute Lösung parat hatte.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Freundin Iulia bedanken, die mich während meines Studiums und bei dieser Arbeit in jeglicher Art unterstützt haben.