

Inhibition der Rekrutierung reninbildender Zellen durch systemische Blockade von Stickstoffmonoxid

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZIN (DR. MED.)

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



Vorgelegt von

Ramona Kettl aus Wallersdorf

Im Jahr 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 27.11.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Armin Kurtz

FÜR MEINE TANTE GABI

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Volkskrankheit arterielle Hypertonie

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

1.3 Wirkungsweise antihypertensiver Medikamente

1.4 Reninproduktion und –sekretion

1.4.1 Der juxtaglomeruläre Apparat

1.4.2 Physiologische Regulationsfaktoren

1.4.3 Zelluläre Mechanismen der Reninsynthese und -freisetzung

1.5 NO als bedeutendster Mediator der Reninfreisetzung

1.5.1 Biosynthese und Wirkungsweise von NO

1.5.2 Isoformen der NO-Synthase

1.5.2.1 Neuronale NO-Synthase

1.5.2.2 Induzierbare NO-Synthase

1.5.2.3 Endotheliale NO-Synthase

1.6 Angiotensin II Rezeptortypen

1.6.1 Der AT₁-Rezeptor: Lokalisation und Signaltransduktion

1.6.2 Der AT₂-Rezeptor: Lokalisation und Signaltransduktion

1.7 Gap Junctions und die Connexin-Proteinfamilie

1.7.1 Aufbau und Funktion der Connexine

1.7.2 Renal lokalisierte Connexine

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

2. Material und Methoden

2.1 Material

- 2.1.1 Geräte
- 2.1.2 Verbrauchsmaterial
- 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits
- 2.1.4 Oligonukleotide
- 2.1.5 Antikörper
- 2.1.6 Puffer und Lösungen
- 2.1.7 Internetdienste und Software

2.2 Methoden

- 2.2.1 Histologische Methodik
 - 2.2.1.1 Versuchstiere
 - 2.2.1.2 Fixierung des Nierengewebes
 - 2.2.1.3 Paraffineinbettung
 - 2.2.1.4 Anfertigung von Paraffinschnittserien
 - 2.2.1.5 Immunhistochemische Färbung
- 2.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion
 - 2.2.2.1 Akquisition und Digitalisierung
 - 2.2.2.2 Datenverarbeitung mit Hilfe von ImageJ
 - 2.2.2.3 3D-Rekonstruktion mit Hilfe von Amira 4.1
- 2.2.3 Molekularbiologische Methoden
 - 2.2.3.1 Total-RNA-Isolierung
 - 2.2.3.2 Synthese komplementärer DNA
 - 2.2.3.3 Real-Time-PCR
- 2.2.4 Blutdruckmessungen

3. Ergebnisse

- 3.1 Reninexpressionsmuster des adulten unbehandelten Wildtyps**
- 3.2 Untersuchung des Einflusses von L-Name auf die Rekrutierung reninbildender Zellen mittels dreidimensionaler Rekonstruktionsverfahren und Renin-mRNA-Analysen**
 - 3.2.1 Untersuchungen an Wildtyp-Mausnieren
 - 3.2.2 Untersuchungen am eNOS-defizienten Mausmodell
 - 3.2.3 Untersuchungen am AT_{1a}-defizienten-Mausmodell
 - 3.2.4 Untersuchungen am Connexin40-defizienten Mausmodell
 - 3.2.5 Renin-mRNA-Analysen
 - 3.2.6 Blutdruckveränderungen unter dem Einfluss des NO-Inhibitors L-Name

4. Diskussion

- 4.1 Bedeutung von NO für die Rekrutierung reninbildender Zellen bei chronischer Stimulation des RAAS**
- 4.2 Bedeutung von NO bezüglich des Zusammenhangs zwischen Salzaufnahme und Blutdruckschwankungen**

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

- 7.1 Abbildungsverzeichnis**
- 7.2 Abkürzungsverzeichnis**
- 7.3 Danksagung**
- 7.4 Erklärung**

1. EINLEITUNG

1.1 Volkskrankheit arterielle Hypertonie

Klassifikation	Systolisch	Diastolisch
Optimal	< 120	<80
Normal	<130	<85
Hoch normal	130-139	85-89
Leichte Hypertonie (Grad I)	140-159	90-99
Mittelschwere Hypertonie (Grad II)	160-179	100-109
Schwere Hypertonie (Grad III)	>180	>110

Abb. 1.1: Definition und Klassifikation von Blutdruckbereichen in mmHg gemäß der Weltgesundheitsorganisation (Abb. aus WHO-Guidelines for the Management of Hypertension, 1999)

Die arterielle Hypertonie stellt in Deutschland sowie in den meisten Industrienationen eine der häufigsten Erkrankungen des Erwachsenenalters dar. Bei kontinuierlich hoher bis steigender Prävalenz kommt dem Vertrieb und der Entwicklung antihypertensiver Medikamente eine zunehmende medizinische sowie pharmakologische Bedeutung zu. Schätzungen zufolge weisen circa 90% der Bluthochdruckpatienten einen primären oder essentiellen Hypertonus auf, dessen Ätiologie letztlich ungewiss ist, so dass sich die Diagnose rein auf dem Fehlen sekundärer Ursachen begründet. Den restlichen 10% hingegen liegt eine sekundäre Hypertonie zugrunde, welche renaler, endokrinologischer, medikamentöser oder auch kardiovaskulärer Genese sein kann. Unabhängig von der Ursache des Bluthochdrucks kann jedoch aufgrund eines signifikant erhöhten kardiovaskulären und renalen Risikos eine medikamentöse Therapie bereits bei leichtgradiger Hypertonie (Abb. 1.1) indiziert sein. Der Beginn und die Art der antihypertensiven Therapie erfolgt dabei unter Berücksichtigung aller kardiovaskulären Risikofaktoren des jeweiligen Patienten und reicht - in Abhängigkeit vom Schweregrad - von alleiniger Umstellung des Lebensstils bezüglich Gewichtsnormalisierung, gesunder Ernährung oder regelmäßiger körperlicher Bewegung bis hin zur medikamentösen Dauertherapie. Reicht eine Veränderung des Lebensstils nicht aus, um den Blutdruck dauerhaft auf mindestens hoch normale Werte zu senken, so ist eine meist lebenslange medikamentöse Therapie unumgänglich, um hypertonieassoziierten kardiovaskulären und renalen Erkrankungen bestmöglich vorzubeugen (Vetter, 2004).

Zu den antihypertensiven Basistherapeutika rechnet man neben Diuretika, Betablockern und Calciumantagonisten heute vor allem ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Antagonisten, welche durch Einflussnahme auf das Renin-Angiotensin-System eine Blutdrucksenkung herbeiführen und Gegenstand intensiver und innovativer Forschung sind (Abb.1.2).

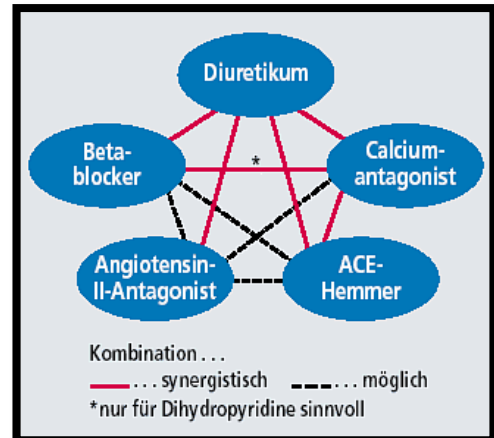


Abb. 1.2: Medikamentöses Pentagramm der deutschen Hochdruckgesellschaft zur Hypertoniebehandlung (Abb. aus Greten, 2005)

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

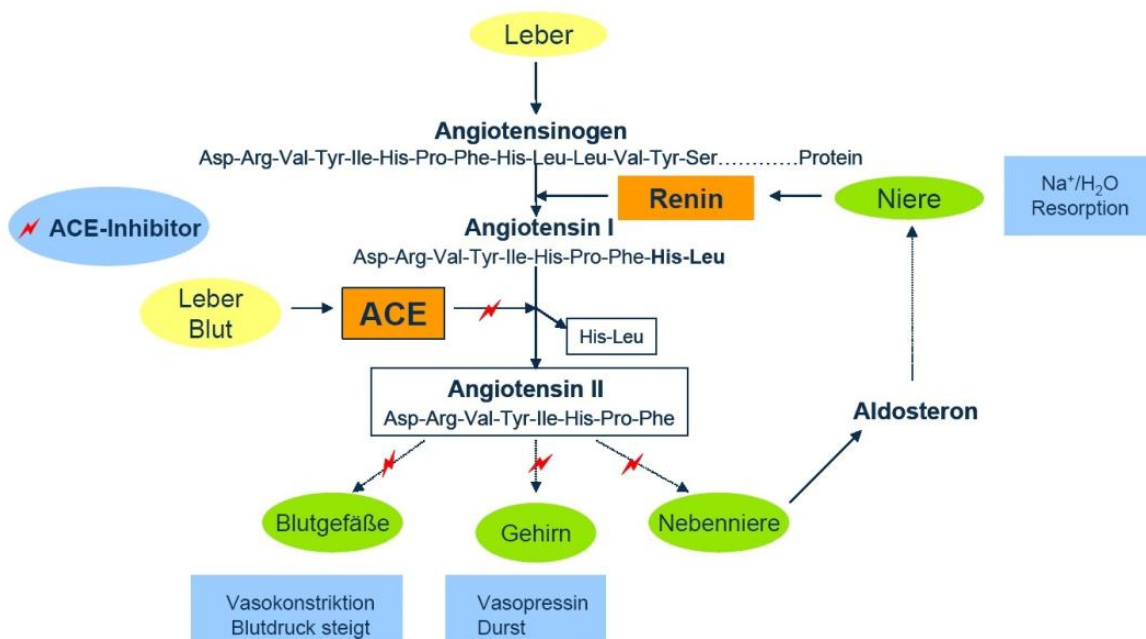


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS (Abb. aus Deußen et al., 2008)

Die Regulation des systemischen Blutdrucks sowie des Extrazellulärvolumens geschieht über eine komplexe enzymatische Kaskade, deren Ursprung in der Niere zu finden ist. Das zugrunde liegende System – das RAAS – entscheidet mit seiner Aktivität darüber, wie hoch die Menge an zirkulierendem Renin ist und damit letzten

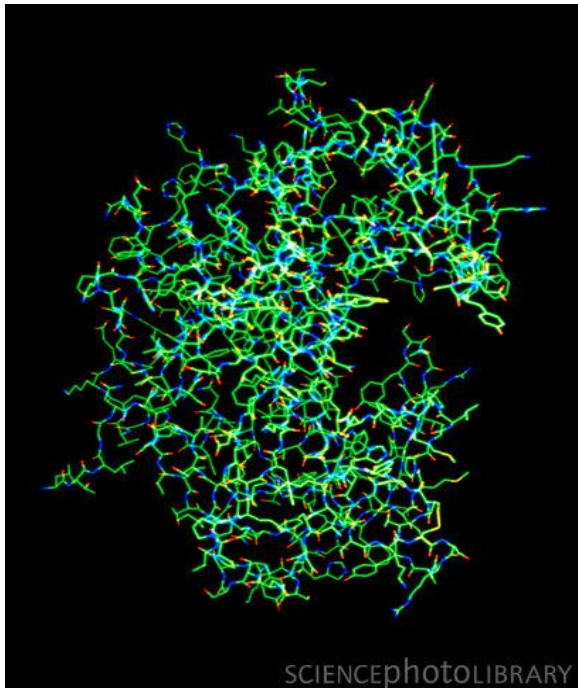


Abb.1.4: Molekulare Struktur des Renins
(Abb. Blundell, Science Photo Library)

Endes über die Höhe des Blutdrucks. Bei dem von den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildeten Renin handelt es sich um eine aus 340 Aminosäuren bestehende Endopeptidase (Abb. 1.4), welche durch Proteolyse unter Abspaltung eines 43 Aminosäure langen Propeptids aus seiner unmittelbaren Vorstufe – dem Prorenin – entsteht. Die Freisetzung dieses Hormons setzt die Signalkaskade in Gang, indem es die Hydrolyse eines aus der Leber stammenden Glykoproteins - dem Angiotensinogen – zu Angiotensin I (ANG I) katalysiert. Dieses biologisch inaktive Decapeptid wird erst durch ein

vom Lungenepithel exprimiertes Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in das Oktapeptid-Hormon Angiotensin II (ANG II), welches biologische Aktivität besitzt, umgewandelt. ANG II ist einer der stärksten bekannten vasokonstriktorisches Mediatoren des Körpers und bewirkt via Erhöhung des Gefäßwiderstandes eine Blutdrucksteigerung. Darüber hinaus dient es als Trigger des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises, indem es im Hinterlappen der Gehirnanhangdrüse eine Stimulation der Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) erreicht. Dieses auch als Vasopressin bezeichnete Hormon wird wiederum via Blutstrom in die Epithelzellen des renalen Sammelrohres transportiert und wirkt dort an membranständigen V₂-Rezeptoren. Die Rezeptorbindung erreicht über einen cAMP gesteuerten Mechanismus den Einbau von Aquaporinkanälen in die apikale Membran des Sammelrohrs, welche damit temporär für Wasser durchlässig wird, das – seinem osmotischen Gradienten folgend – verstärkt resorbiert wird, wodurch eine Erhöhung des Blutvolumens und auch des Blutdrucks erreicht wird. Auch eine Stimulation des Durstgefühls und somit eine verstärkte Flüssigkeitszufuhr gehört zu den Funktionen von ADH. Eine andere Zielstruktur des ANG II ist die Nebennierenrinde. Hier bewirkt es via AT₁-Rezeptoren die Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Zona glomerulosa. Dieses führt in Verbindungstübli sowie in den proximalen Sammel-

rohrabschnitten über Wirkung an Mineralokortikoidrezeptoren zum verstärkten Einbau und zu erhöhter Offenwahrscheinlichkeit von apikalen Natriumkanälen wie dem ENaC (epithelial Na⁺-Channel). Da die Schlussleisten des Sammelrohres für Kationen relativ dicht sind, depolarisiert das in die Zelle einströmende Natrium die luminale Membran und bewirkt so ein lumen negatives transzelluläres Potenzial, welches den Kaliumausstrom ins Lumen sowie die Chloridresorption aus demselben heraus fördert. Dies geschieht auch dadurch, dass Aldosteron den Einbau und die Offenwahrscheinlichkeit apikaler Kaliumkanäle ebenso wie basolateraler Natrium-Kalium-ATPasen fördert. Durch die darauf folgende natriumbedingte Wasserrückresorption kommt es letztlich ebenfalls zu einer bedeutenden Erhöhung von Blutvolumen und Blutdruck.

AT₁-Rezeptoren befinden sich darüber hinaus auch an den reninbildenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates, wo die ANG II-Bindung eine Hemmung der Reninsekretion bewirkt. Zu den inhibitorischen Einflüssen auf die Reninfreisetzung gehört also neben hoher Volumenbelastung, Salz sowie hohem Blutdruck auch das Ang II selbst, welches somit im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus seine eigene Synthese hemmt (*Hackenthal et al., 1990*).

1.3 Wirkungsweise antihypertensiver Medikamente

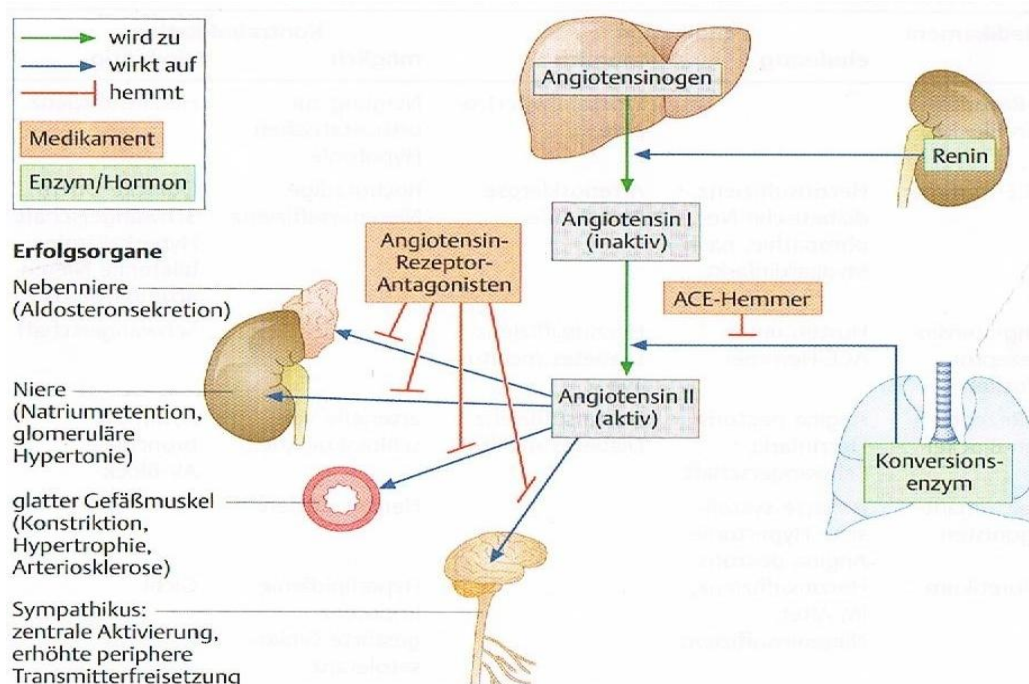


Abb.1.5: Hemmung der ANG II-Synthese durch ACE-Hemmer; selektiver Antagonismus am AT₁-Rezeptor durch Angiotensin-Rezeptor-Blocker

(Abb. aus Greten, 2005)

Erst das Verständnis des Renin-Angiotensin-Systems ermöglichte die Entwicklung neuer antihypertensiver Medikamente, welche ihre Wirkung durch Einflussnahme auf dieses System entfalten und heute zu den Basismedikamenten in der Bluthochdrucktherapie gehören (Abb. 1.5). Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, ist eine Kombination verschiedener Medikamentengruppen Goldstandard in der Behandlung der arteriellen Hypertonie (Vetter, 2004). Medikamente, die dabei mit am häufigsten zum Einsatz kommen – vor allem bei Patienten, welche zusätzlich an einer Herzinsuffizienz oder einem Typ2-Diabetes leiden - sind die ACE-Hemmer Enalapril, Captopril oder Ramipril. Diese verhindern durch Inhibition des Angiotensin-Converting-Enzyms die Bildung von ANG II und somit dessen vasokonstriktorische und blutdrucksteigernde Wirkung.

Aufgrund von Husten und anderen Nebenwirkungen, die bei manchen Patienten nach Einnahme von ACE-Hemmern beobachtet wurden, kommen mittlerweile verstärkt die Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan und Valsartan zum Einsatz, welche sich ebenso als Teil der antihypertensiven Standardmedikation etabliert haben. Durch selektiven Antagonismus am AT₁-Rezeptor hemmen sie die vasokonstriktorische Wirkung von ANG II, ohne dabei dessen Effekt an anderen Rezeptoren zu beeinflussen, wodurch eine Blutdrucksenkung ohne die zusätzlichen unerwünschten Wirkungen von ACE-Blockern erreicht werden kann. Da die Bildung von ANG II zwar zum größten Teil, jedoch nicht ausschließlich, via ACE geschieht, kann durch ACE-Hemmer die Bildung von ANG II nicht vollständig inhibiert werden. Um eine stärkere Hemmung des ANG II-Effekts und somit eine effektivere antihypertensive Wirkung zu erreichen, kann eine Kombination aus einem ACE-Hemmer mit einem Angiotensin-Rezeptor-Blocker sinnvoll sein.

1.4 Reninproduktion und –sekretion

1.4.1 Der juxtaglomeruläre Apparat

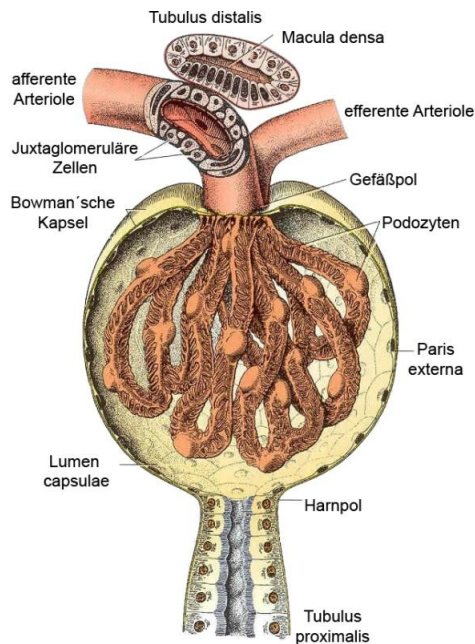


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines Glomerulums

Am oberen Ende liegt der Gefäßpol mit der afferenten sowie der efferenten Arteriole, welche zusammen mit der Macula Densa den renalen Juxtaglomerulären Apparat bilden.

Die juxtaglomerulären Zellen befinden sich in der Tunica media der afferenten Arteriole (Abb. aus Junqueira et al., 2002).

Das im Kreislauf zirkulierende Renin ist größtenteils, nicht aber ausschließlich, renaler Abstammung (*Peters und Clausmeyer, 2002*) und wird in der Niere überwiegend in den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) gebildet. Diese JG-Zellen sind in der Tunica media der afferenten Arteriole lokalisiert und liegen somit in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gefäßpol des Nierenkörperchens. Sie sind Teil des juxtaglomerulären Apparates (Abb. 1.6). Dieser setzt sich aus einer vaskulären Komponente, bestehend aus afferenter und efferenter Arteriole sowie dem extraglomerulärem Mesangium und einem tubulärem Anteil, der Macula Densa, zusammen. Hierbei handelt es sich um einen Verband dicht gestellter Zellen der distalen Tubuluswand, welche in ihrer Charakteristik von den übrigen Zellen des distalen Tubulus abweichen, wie etwa in der Lokalisation ihrer Zellkerne oder der Beschaffenheit ihrer meist weniger gefalteten Basalmembran (*Barajas, 1979*). Als Osmosensoren besitzen sie die Fähigkeit, die luminal Chloridkonzentration im distalen Tubulus via eines Natrium-Kalium-Chlorid-Transporters zu messen und abhängig von der bestehenden NaCl-Konzentration Einfluss auf die Reninfreisetzung der JG-Zellen zu nehmen. Kon beschrieb 1999 außerdem eine speziesabhängige Reninexpression der extraglomerulären Mesangialzellen in der Tunica media der efferenten Arteriole, was jedoch eher selten zu beobachten ist, da die Hauptlokalisation der JG-Zellen die afferente Arteriole ist. Die Abstammung dieser reninsynthetisierenden

den Zellen ist umstritten. Während 1979 von Barajas veröffentlichte Befunde eine Abstammung der JG-Zellen aus glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriole postulierten, legen neuere Studien von Sequeira Lopez et al. (2001) nahe, dass glatte Gefäßmuskelzellen und Renin-Vorläuferzellen von Mesenchymalzellen des Metanephrons abstammen. Jene Vorläuferzellen würden dann im Laufe ihrer Entwicklung entweder zu JG-Zellen oder zu glatten Gefäßmuskelzellen weiter differenzieren (Abb. 1.7). Zudem wird eine als Rekrutierung bezeichnete metaplastische Transformation dieser aus Renin-Vorläuferzellen hervorgehenden glatten Muskelzellen zu reninbildenden Zellen angenommen. Ein Mechanismus, welcher verschiedenen Einflüssen unterworfen ist und dessen Regulationsmechanismus bis heute nicht im Detail geklärt werden konnte (Cantin et al., 1977).

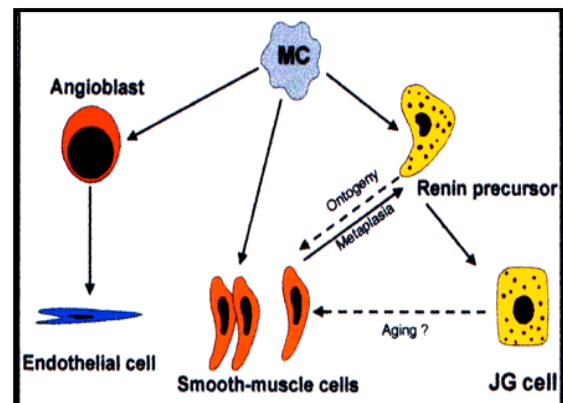


Abb. 1.7: Abstammung der JG-Zellen,
(Abb. aus Sequeira Lopez et al., 2001)

bezeichnete metaplastische Transformation dieser aus Renin-Vorläuferzellen hervorgehenden glatten Muskelzellen zu reninbildenden Zellen angenommen. Ein Mechanismus, welcher verschiedenen Einflüssen unterworfen ist und dessen Regulationsmechanismus bis heute nicht im Detail geklärt werden konnte (Cantin et al., 1977).

1.4.2 Physiologische Regulationsfaktoren

Die Reninsynthese und dessen Sekretion unterliegen sowohl lokaler, als auch systemischer Faktoren. Bei den humoralen Faktoren gilt es, solche mit stimulierendem und andere mit inhibitorischem Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von Renin zu unterscheiden. Während endotheliale Autacoide, wie Prostaglandin E₂, Prostazyklin oder NO, die Synthese antreiben, haben etwa Endotheline einen hemmenden Einfluss (Wagner et al., 1998; Kurtz und Wagner, 1999).

Zu den systemischen Regulationsmechanismen gehört unter anderem das sympathische Nervensystem. Über die Wirkung von Noradrenalin an β 1-Rezeptoren der JG-Zellen kommt es zur Aktivierung der Adenylatzyklase, welche AMP vermehrt in seine zyklische Form umwandelt. Diese Erhöhung der cAMP-Konzentration in den reninbildenden Zellen der afferenten Arteriole hat eine Stimulation der Reninfreisetzung zur Folge (Holmer et al., 1997, Hackenthal, 1986).

Als weiterer regulatorischer Mechanismus gilt der Salzhaushalt des Körpers. So hat eine erhöhte Kochsalzzufuhr einen hemmenden Einfluss auf die Reninbildung und -sekretion, wohingegen eine verminderte NaCl-Aufnahme den gegenteiligen Effekt aufweist. Verantwortlich hierfür sind die Zellen der Macula Densa (MD), welche in der Lage sind in Abhängigkeit der luminalen NaCl-Konzentration den glomerulären Ge-

fäßwiderstand sowie die Reninsynthese zu beeinflussen. Dieser tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus beruht auf einem Zusammenspiel verschiedener lokaler Mediatoren, welche unter anderem durch die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS, NOS I) oder die Cyclooxygenase (COX) gebildet werden (*Harris et al., 1994*). Die akute Inhibition der MD-nNOS verstärkt dieses Feedback, so dass anzunehmen ist, dass nNOS synthetisiertes NO vor allem als kurzfristiger Volumenmodulator eine Rolle spielt (*Ollerstam und Persson, 2002*). Auch Prostaglandine, welche COX-katalysiert in der Macula Densa gebildet werden, scheint bezüglich der Reninexpression eine gewisse Bedeutung zuzukommen, da sie mit einer Zunahme von Renin-mRNA-Konzentrationen assoziiert sind (*Schricker et al., 1995*).

Ein letzter überaus wichtiger Regulationsmechanismus der Reninfreisetzung ist der renale Perfusionsdruck, dessen Abfall mit einer Sekretionssteigerung einhergeht. Ein Anstieg des Blutdrucks hingegen hat eine Abnahme der Reninsekretion zur Folge (*Nafz et al., 1997*). Veränderungen der Druckverhältnisse werden über renale Barorezeptoren registriert. Durch Druckanstieg oder –abfall verändert sich auch die Wandspannung der renalen Gefäße, was im Falle einer Erhöhung des Perfusionsdrucks eine Dehnung der JG-Zellen und damit eine Änderung des Membranpotenzials zur Folge hat (*Taugner et al., 1984*).

1.4.3 Zelluläre Mechanismen der Reninsynthese und -freisetzung

Auf zellulärer Ebene gibt es verschiedene Mechanismen, welche Einfluss auf die Produktion sowie Sekretion des Renins nehmen. Das bereits früher untersuchte und 2006 von Grüneberg et al. erneut beschriebene „Calcium-Paradoxon“ erklärt einen zentralen Schritt des Signaltransduktionsweges der Reninfreisetzung. Anders als in den meisten sekretorischen Zellen des Körpers, in denen eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration mit einer Exozytose einhergeht, herrscht renal ein gegenteiliges Phänomen vor. In den JG-Zellen nämlich wirkt Calcium als Inhibitor der Reninfreisetzung. Da cAMP in der Niere den wichtigsten intrazellulären Stimulator der Reninsekretion darstellt, wird angenommen, dass Calcium seine hemmende Wirkung über eine Inhibition der via Calcium regulierten Adenylatzyklen AC5 und AC6 entfaltet. Untersuchungen diesbezüglich haben gezeigt, dass die calciumgetriggerte Inhibition der Reninfreisetzung – wie sie etwa durch Endothelin-1 oder ANG II geschieht - mit einer Verminderung intrazellulärer cAMP-Spiegel vergesellschaftet ist. Bei AC5- und/oder AC6-Knockouttieren hingegen konnte durch Calcium weder eine

Hemmung der Reninsekretion noch eine cAMP-Suppression beobachtet werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass der inhibitorische Effekt von Calcium auf die Reninfreisetzung über eine Hemmung der AC-Aktivität geschieht.

Auch der β -adrenerge Regulationsmechanismus bedient sich des Adenylatzyklase-Signalwegs. Die Bindung von sympathischen Transmittern sowie auch Prostaglandin E₂ und Prostazyklin bewirkt via Aktivierung des genannten Enzyms eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit eine Stimulation der Reninsynthese und –sekretion. Auf welche Art und Weise dies geschieht, ist noch unklar. Jedoch wird vermutet, dass ein Zusammenhang mit der Proteinkinase A (PKA) besteht, wie es auch in anderen Zellen des Körpers der Fall ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Hemmung dieses Enzyms auch einen inhibitorischen Einfluss auf den stimulatorischen β -adrenergen Effekt bezüglich der Reninsekretion ausübt (*Kurtz et al., 1998a*). Andere Theorien vermuten einen Zusammenhang zwischen der cAMP-Konzentration und dem intrazellulären Calciumspiegel durch Hemmung dessen inhibitorischer Wirkung (*Kurtz et al., 1989*) oder eine PKA-gesteuerte Aktivierung von Protonenpumpen in der Membran von Reninspeichervesikel der JG-Zellen (*Kind und Fray, 1994*). Auch ein cGMP-gesteuerter Signalweg wurde bereits beschrieben (*Wagner et al., 1998; Friies et al., 2002*), wobei die Rolle dieses Regulators noch weitgehend unklar ist.

1.5 NO als bedeutendster Mediator der Reninfreisetzung

NO ist ein kleines, zweiatomiges Molekül, welches aufgrund seiner Lipophilie frei über Membranen diffundieren kann und in verschiedenen Organsystemen des Körpers eine bedeutende Rolle spielt. Durch seine Wirkung auf das renale, das kardiovaskuläre sowie das zentrale Nervensystem ist NO ein wichtiger Mediator bezüglich der Blutdruckregulation (*Bachmann und Mundel, 1994*).

In der Niere steht NO im Zusammenhang mit Natriurese, Diurese, Wasserresorption sowie tubuloglomerulärem Feedback. Auf kardiovaskulärer Ebene vermag es durch seine vasodilatorische Wirkung eine Blutdrucksenkung zu bewirken und auf zentraler Ebene spielt es als Neurotransmitter eine entscheidende Rolle. Leukozyten produzieren NO als Bestandteil ihres bakteriellen Abwehrsystems. Auch auf pharmakologischer Ebene macht man sich den Effekt des Moleküls zu Nutze. So werden etwa akute Angina pectoris-Anfälle durch Nitroglycerin – ein Medikament, welches die Freisetzung von NO bewirkt – behandelt.

1.5.1 Biosynthese und Wirkungsweise von NO

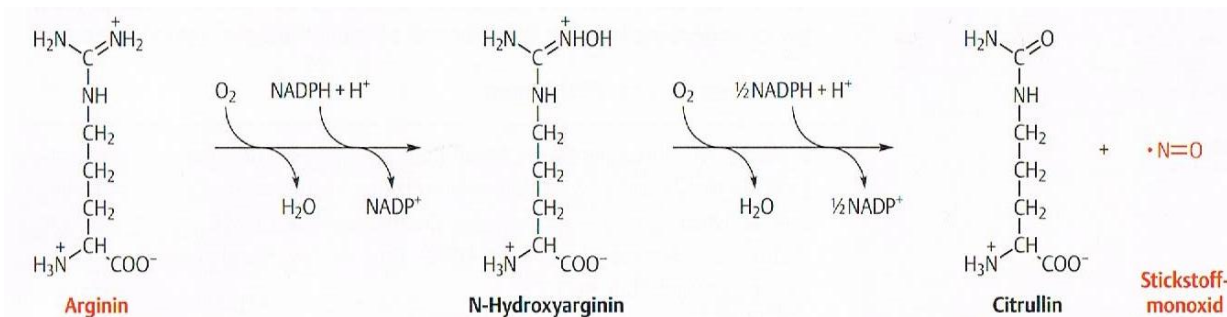


Abb. 1.8: Biosynthese von NO aus L-Arginin (Abb. aus Rassow et al., 2008)

NO entsteht mit Hilfe verschiedener Cofaktoren aus der Aminosäure Arginin (Abb. 1.8). Mit Hilfe des katalytischen Effekts einer NO-Synthase wird die Guanidingruppe des Arginins oxidiert und anschließend jenes Hydroxyarginin oxidativ in Citrullin und NO gespalten, wobei beide Schritte auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen sind (Kurtz und Wagner, 1998). In Abhängigkeit von Konzentration und Lokalisation besitzt NO sowohl direkten als auch indirekten Einfluss auf das umgebende Gewebe und die in Gang tretenden Signalkaskaden. Seine direkte Wirkung zeigt sich etwa an folgendem Beispiel: Als Radikal ist NO hochgradig toxisch und wird deshalb von Makrophagen zusammen mit Sauerstoffradikalen verwendet, um phagozytierte Mikroorganismen, wie Bakterien oder Viren, abzutöten.

Eine weitaus größere Rolle jedoch spielen Mechanismen, welche via NO auf cGMP-vermittelten Signalwegen in Gang gesetzt werden. Dazu bindet NO an eine lösliche Guanylatcyclase (sGC), welche in Folge dessen aktiviert wird und die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in den second messenger cyclisches Guanodinmonophosphat (cGMP) katalysiert. Zu den cGMP-vermittelten Wirkungen gehören neben der Förderung der Signalübertragung zerebraler Synapsen - was eine essenzielle Grundlage von Lernprozessen darstellt -, auch die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit die Veränderung des systemischen Blutdrucks.

In der Niere umfassen die Aufgaben von NO die Regulation des basalen Gefäßtonus, des tubulären Feedback-Mechanismus sowie der glomerulären Filtration. Aus Studien von Kurtz und Wagner 1998 geht hervor, dass NO einen stimulatorischen Einfluss auf die Sekretion sowie auf die Genexpression des Renins hat, was indirekt über eine Veränderung des systemischen Blutdrucks passieren könnte, aber auch durch einen direkten cGMP-vermittelten Einfluss auf die JG-Zellen zu erklären wäre.

Aus derselben Studie geht zudem ein möglicher Einfluss von NO auf den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus der Macula Densa-Zellen hervor, welcher ebenso an der Reninsekretion beteiligt ist.

1.5.2 Isoformen der NO-Synthase

Wie bereits beschrieben, wird die NO-Synthese von speziellen Enzymen – den NO-Synthasen (NOS) – katalysiert. Man kennt bisher drei verschiedene Isoformen, welche in unterschiedlichen Bereichen des Körpers eine Rolle spielen (*Kon, 2004*).

1.5.2.1 Neuronale NO-Synthase

Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I) wird überwiegend im Nervensystem exprimiert, wo NO als Neurotransmitter große Bedeutung zukommt. Eine Erhöhung des Calciumspiegels ist dabei Voraussetzung für dessen Expression.

Eine 1999 von Grasmann et al. veröffentlichte Studie zeigte darüber hinaus einen Zusammenhang von NOS I-Genvarianten mit dem Risiko, an Asthma zu erkranken, was auf eine Funktion von nNOS hinsichtlich bronchomotorischer Regulationsmechanismen schließen lässt. In der Niere lassen sich alle drei NOS-Isoformen nachweisen, wobei sich die Lokalisation von nNOS überwiegend auf die tubulären Macula Densa-Zellen zu beschränken scheint. Kurtz und Wagner stellten 1998, basierend auf einer diesbezüglichen Studie, die Vermutung auf, dass NO in diesem Zusammenhang Einfluss auf den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus der Macula Densa haben könnte und auf diese Art und Weise sowohl eine Rolle im Hinblick auf die Regulation des Gefäßtonus der afferenten Arteriole als auch auf die Reninfreisetzung spielen könnte.

1.5.2.2 Induzierbare NO-Synthase

Im Gegensatz zur nNOS, welche im Körper konstitutiv exprimiert und via Calcium aktiviert wird, zeigt die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) ein anderes Verhalten. Dieser Isotyp wird vorwiegend auf Transkriptionsebene gesteuert und katalysiert die NO-Bildung in großen Mengen unabhängig von Calcium (*Michel und Feron, 1997*). Man findet sie unter anderem in Abwehrzellen, wie Makrophagen und Granulozyten, aber auch in Muskel- und Endothelzellen. Zu den Induktoren der iNOS zählen Cytokine, wie Interleukine oder der Tumornekrosefaktor. Eine wesentliche

Rolle in diesem Zusammenhang scheint der sowohl durch Cytokine als auch durch oxidativen Stress aktivierbare Transkriptionsfaktor NF- κ B zu spielen. Im Gegensatz zu den anderen NOS-Formen kann die iNOS in kurzer Zeit große Mengen an NO produzieren, was vor allem bei Infektionen und im Rahmen von Entzündungen eine maßgebliche Rolle spielt. Die Bedeutung von NO bezüglich der Immunabwehr konnte an iNOS-Knockoutmäusen gezeigt werden, welche nur eingeschränkt in der Lage waren, parasitären und bakteriellen Infektionen Widerstand zu leisten (*MacMicking et al., 1995; Wei et al., 1995*). Auch in der Niere konnte iNOS bereits nachgewiesen werden, wobei weitgehend unklar ist, welche Aufgaben ihr in diesem Zusammenhang zukommen.

1.5.2.3 Endotheliale NO-Synthase

Wie die nNOS, wird auch die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III) konstitutiv und calciumabhängig exprimiert und stellt einen entscheidenden Faktor der Kontrolle des Gefäßtonus dar. Die zuvor beschriebenen cGMP-abhängigen Effekte von NO – also die Vasodilatation und die Inhibition der Plättchenaggregation – sind vor allem auf die endotheliale NO-Synthase zurückzuführen. Auch die bedarfsabhängige Mikrozirkulation im Gehirn sowie in anderen Organen gehört zu den Aufgaben der eNOS. Die Tatsache, dass eNOS-Knockoutmäuse – im Gegensatz zu nNOS-defizienten Tieren - eine verringerte Reninsekretion aufweisen, gibt zudem Anlass zur Vermutung, dass eNOS die entscheidende Isoform bezüglich des NO-Einflusses auf das RAAS darstellt (*Wagner et al., 2000*). Auch die zugrunde liegende Arbeit befasst sich mit der Annahme, dass vor allem die endotheliale NO-Synthase das Auftreten reninproduzierender Zellen beeinflusst, wenn auch Kompensationsmechanismen seitens anderer Isoformen denkbar sind. Mit Hilfe von L-Name, welches als unspezifischer NOS-Inhibitor blockierend auf alle drei Isotypen wirkt, soll das Rekrutierungsmuster reninbildender Zellen in Folge systemischer NO-Blockade an Hand verschiedener Genotypen untersucht werden.

1.6 Angiotensin II Rezeptortypen

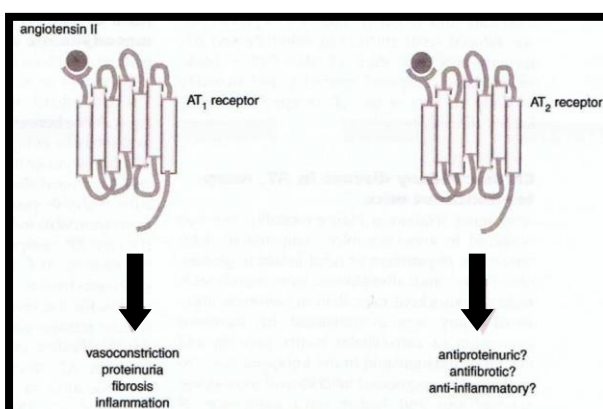
Die Angiotensin-Rezeptoren finden sich an vielen Stellen des Körpers und vermitteln die Wirkung von ANG II durch verschiedene Signalwege. Der ANG II-Rezeptor lässt sich in Subtypen klassifizieren, von denen AT₁ und AT₂ die wichtigsten darstellen

(Ardailou, 1999). Ob darüber hinaus noch weitere Rezeptortypen – AT_3 und AT_4 – existieren, ist derzeit noch Bestandteil kontroverser Diskussionen (Unger et al., 1996). Die Expression der verschiedenen Subtypen geschieht auf ungleiche Art und Weise und zeigt darüber hinaus organspezifische Unterschiede.

1.6.1 Der AT_1 -Rezeptor: Lokalisation und Signaltransduktion

Fast alle klassischen ANG II-assoziierten Funktionen werden über den AT_1 -Rezeptor vermittelt, dem im adulten Organismus die größte Bedeutung zuzukommen scheint. Vorherrschend ist dieser Subtyp im Gefäßsystem, im Gehirn, im Herzen, in den Nieren und Nebennieren sowie in Leber und Darm. Zu den Effekten, welche vom AT_1 -Rezeptor ausgehen, gehören neben der Vasokonstriktion der arteriellen Widerstandsgefäße auch die glomeruläre Filtration sowie die Aldosteron- und ADH-Freisetzung. An glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Mesangiumszellen zeigt sich zudem eine indirekte, über Wachstumsfaktoren gesteuerte Beteiligung an Zellwachstumsprozessen und fibrotischem Umbau in verschiedenen Organen (Ardailou, 1999; Ardailou et al., 1999; Wenzel et al., 2010; Abb. 1.9). Auch die proinflammatorische Wirkung des ANG II wird über den AT_1 -Rezeptor vermittelt. Dieser ist ein aus sieben Transmembrandomänen bestehender, G-Protein gekoppelter Rezeptor, von welchem mittlerweile zwei Subtypen – AT_{1A} und AT_{1B} – bekannt sind. Die Signalübertragung geschieht über viele verschiedene Wege, von denen die Aktivierung der Phospholipase C, der Phospholipase A2 und die Hemmung der Adenylatzyklase die größte Rolle spielen. Darüber hinaus sind auch Signalwege bekannt, bei denen die ANG II-Wirkung durch die Öffnung von Calciumkanälen oder Aktivierung von Tyrosinkinase vermittelt wird.

1.6.2 Der AT_2 -Rezeptor: Lokalisation und Signaltransduktion



Der AT_2 -Rezeptor findet sich im Gegensatz zum AT_1 -Rezeptortyp überwiegend im fetalen Gewebe und zeigt am Ende der Embryonalentwicklung seine stärkste Expression, was auf eine Beteiligung an embryonalen Entwicklungsprozessen hinweist (Grady et al., 2003). Im adulten

Abb. 1.9: AT_1 -, AT_2 -Rezeptorfunktion in der Niere

(Abb. aus Wenzel et al., 2010)

Organismus jedoch überwiegt die Expression des AT₁-Rezeptors. Dennoch kann der AT₂-Rezeptor in verschiedenen Geweben – unter anderem im Gehirn und in den Nennieren – in geringer Dichte nachgewiesen werden. Im Falle einer Gewebeschädigung, wie etwa in Folge eines Myokardinfarktes oder eines Schlaganfalls, scheint darüber hinaus eine Reexpression des AT₂-Rezeptors auch im Adulten möglich zu sein. Die exakte Funktion des AT₂-Rezeptors adäquat zu erforschen, stellte bisher aufgrund fehlender Stimulanzen eine Herausforderung dar.

Mit Hilfe des kürzlich entwickelten AT₂-Rezeptor-Agonisten Compound 21 kann nun jedoch eine direkte Stimulation gewährleistet und so der Rezeptor-Effekt besser untersucht werden (*Steckelings et al., 2010*). Obwohl die Aufgaben des AT₂-Rezeptors noch weitgehend unbekannt sind, scheint dessen physiologische Funktion darin zu bestehen, die Effekte des AT₁-Rezeptors in vielen Fällen zu antagonisieren und so eine Kontrolle des ANG II im Sinne eines negativen Feedbacks zu gewährleisten (Abb. 1.9). So vermutet man beispielsweise einen blutdrucksenkenden, antiinflammatorischen und antifibrotischen Effekt des AT₂-Rezeptors (*Patterson, 2003*). Des Weiteren zählt man die Hemmung des Zellwachstums, die Induktion von Zelldifferenzierungsprozessen sowie auch proapoptische Effekte zu dessen Funktionen, welche er via G-Protein-abhängige und -unabhängige Aktivierung von Serin-/Threonin- sowie Tyrosinphosphatasen zu vermitteln scheint (*Wenzel et al., 2010*). Der AT₂-Rezeptor würde somit eine Dephosphorylierung derjenigen Enzyme bewirken, welche durch die AT₁-Rezeptor-abhängigen Kinasen phosphoryliert werden (Abb. 1.10). All diese Eigenschaften und vermeintlichen Funktionen des AT₂-Rezeptors sind jedoch immer noch Bestandteil kontroverser Diskussionen.

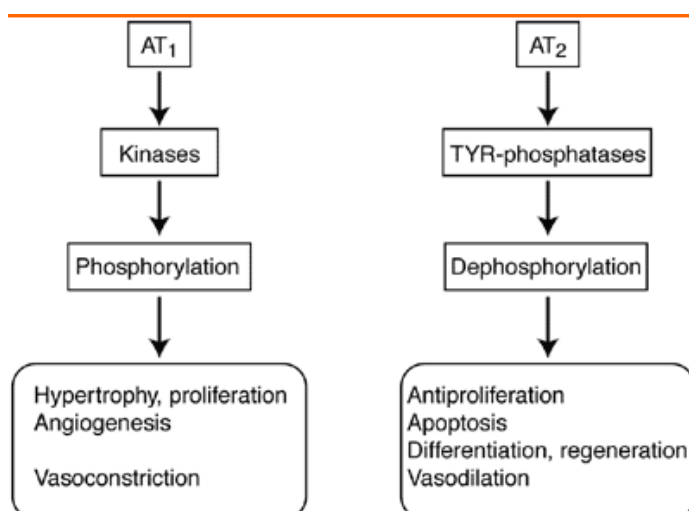


Abb. 1.10: Signalkaskade der ANG II-Rezeptortypen AT₁ und AT₂

Die Aktivierung der Phosphatasen durch den AT₂-Rezeptor bewirkt eine Dephosphorylierung derjenigen Enzyme, welche durch die AT₁-Rezeptor abhängigen Kinasen phosphoryliert werden. So werden die AT₁ vermittelten Effekte durch den AT₂-Rezeptor antagonisiert (*Abb. aus Patterson, 2003*).

1.7 Gap Junctions und die Connexin-Proteinfamilie

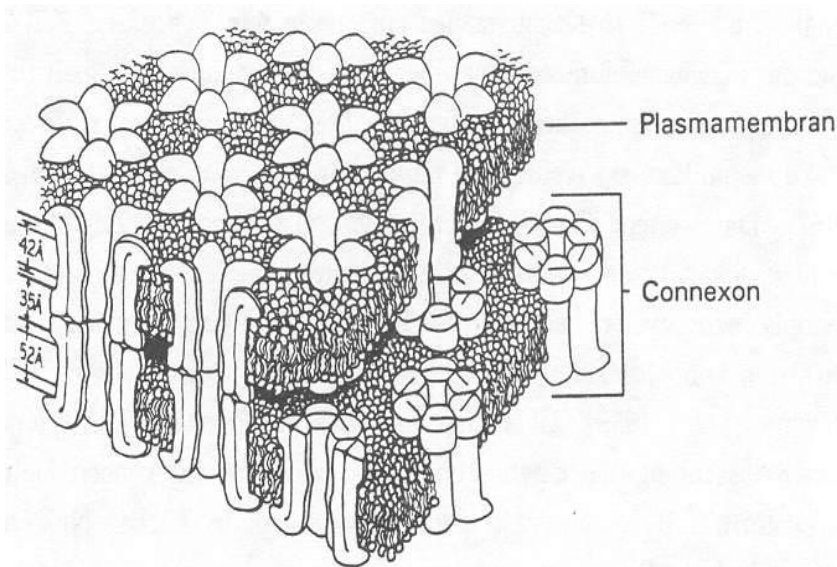


Abb. 1.11: Schematische Darstellung von Gap Junctions:

Sechs Connexine bilden einen Hemikanal mit zentraler Kanalpore: Das Connexon. Zwei gegenüberliegende Connexone bilden wiederum eine weitgehend selektive Transportverbindung: Die Gap Junction (Abb. aus Makowski et al., 1977).

Bei den Connexinen handelt es sich um eine Familie von Transmembranproteinen, welche einen schnellen Transport von Ionen, Metaboliten oder second messengers zwischen benachbarten Zellen und somit eine interzelluläre Signalübertragung ermöglichen. Lagern sich sechs Connexin-Untereinheiten röhrenförmig zu einem funktionellen Hemikanal zusammen, so spricht man von einem Connexon. Zwei sich an benachbarten Zellen gegenüberliegende Connexone bilden wiederum eine transportfähige Zell-Zell-Verbindung (Abb. 1.11). Diese Gap Junction entsteht unter anderem durch verschiedene zelluläre Adhäsionsmoleküle und gewährleistet im Gegensatz zu anderen Zellverbindungsmodellen, wie etwa Desmosomen oder Tight Junctions, eine direkte Kommunikation innerhalb der Zellnachbarschaft (Söhl und Willecke, 2003).

1.7.1 Aufbau und Funktion der Connexine

Eine Connexin-Untereinheit besteht aus vier transmembranären Domänen, welche zwei extrazelluläre und eine zytoplasmatische Schleife sowie eine N- und C-terminale zytoplasmatische Region aufweisen (Abb. 1.12 B). Die Konfiguration der einzelnen Connexine zueinander entscheidet darüber, ob ein Kanal geöffnet oder geschlossen ist (Abb. 1.12 A). Den Connexinen werden grundlegende biologische Funktionen in praktisch allen Bereichen des Organismus zugesprochen. So konnte etwa nachgewiesen werden, dass Cx43 im Myokard für die Koordination des Calciumstroms verantwortlich und damit maßgeblich an der atrioventrikulären Reizüberleitung beteiligt ist (Suadiconi et al., 2000).

Bisher war es möglich, im Mausgenom 20, im humanen Erbgut sogar 21 verschiedene Connexin-Subtypen zu identifizieren, welche sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts sowie ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Die Nomenklatur der Connexine richtet sich dabei nach deren Molekulargewicht, das laut Bayer et al., 1990 aus der cDNA des jeweiligen Moleküls errechnet werden kann.

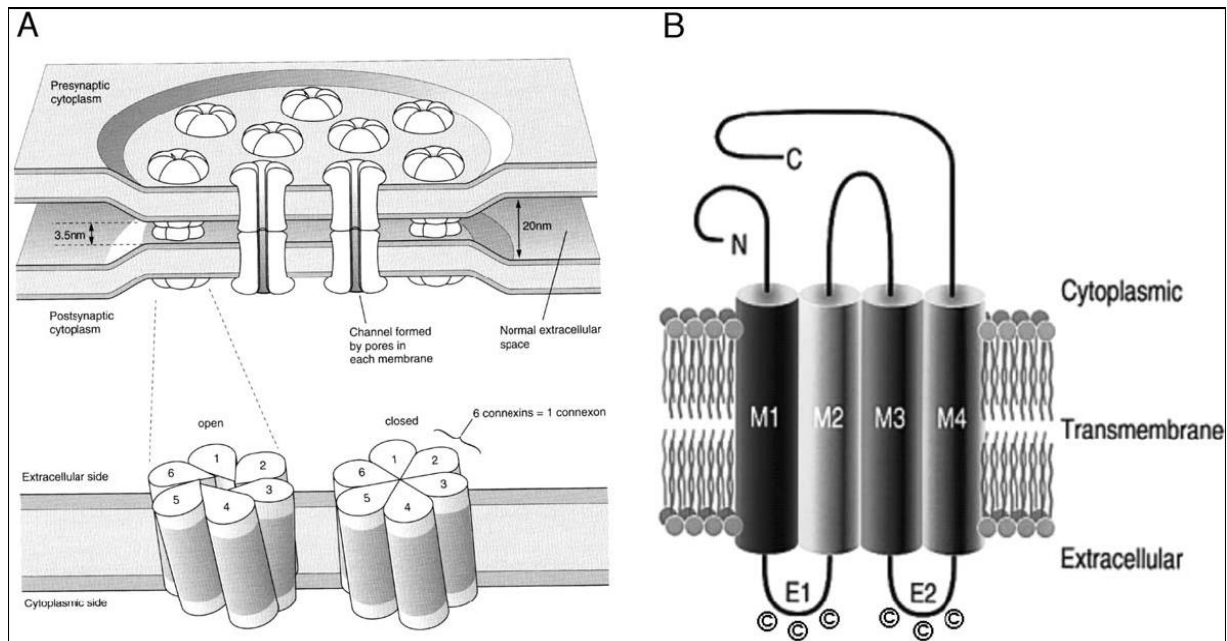


Abb. 1.12: A: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Gab Junctions: Die sechs Connexine, welche als Connexon eine funktionelle Einheit darstellen, sind in der Lage durch Variation ihrer Konfiguration eine Öffnung oder den Schluss des Kanals zu bewirken

B: Schematische Darstellung eines Connexin-Moleküls, welches sich aus vier Transmembrandomänen zusammensetzt. Extrazellulär erkennt man zwei Schleifen (E1, E2), auf zytoplasmatischer Seite findet sich eine weitere Schleife, sowie eine N- und C-terminale Region (Abb. aus Söhl und Willecke, 2003).

In den meisten Organen lassen sich mehrere Connexin-Subtypen parallel identifizieren. So finden sich beispielsweise in der Leber überwiegend die Typen Cx26 und Cx32, in der Niere hingegen spielen vor allem Cx37, Cx40, Cx43 sowie Cx45 eine wesentliche Rolle (Söhl und Willecke, 2003; Kurtz et al., 2010). Diese Coexpression verschiedener Subtypen im gleichen Zelltyp lässt vermuten, dass bei Ausfall oder Mutation des einen Typs eine Kompensation durch den anderen möglich ist, was an anderen Stellen, wie beispielsweise im Innenohr, wo Cx26 solitär exprimiert wird, nicht möglich ist. So konnten Kelsell et al. im Jahr 1997 nachweisen, dass Menschen, die eine Mutation des Cx26-Gens aufweisen, zwar taub sind, jedoch keine Erkrankung oder Veränderung im Bereich des hepatischen Gewebes aufweisen, wo aufgrund einer gleichzeitigen Expression von Cx32 eine Kompensation des mutierten Subtypen möglich ist.

1.7.2 Renal lokalisierte Connexine

In der Niere scheinen die Gap Junctions eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Kontrolle reninproduzierender Zellen zu spielen. Die Zellen des renalen Gefäßsystems stehen miteinander in Verbindung und exprimieren Connexine auf Basis eines zellspezifischen Expressionsmusters. Diese Erkenntnis lässt den Schluss zu, dass Connexinproteinen eine entscheidende Rolle hinsichtlich autoregulatorischer sowie vasomotorischer Prozesse in der Niere zukommt. So konnte bei Cx40- und Cx43 defizienten Mäusen ein verändertes Verhalten der reninbildenden Zellen vorgefunden werden, was eine Beteiligung dieser Subtypen an der Synthese und Freisetzung des Renins vermuten lässt (*Wagner, 2008*). Vor allem an Cx40-Knockoutmäusen zeigen sich Besonderheiten bezüglich der Lokalisation reninproduzierender Zellen. Diese finden sich nicht mehr in der Tunica media der afferenten Arteriole, sondern nur noch im extrazellulären Interstitium. Takenaka et al. beschäftigten sich 2008 mit der Lokalisation verschiedener Connexine im renalen System von Ratten. Sie konnten mittels immunhistochemischer Methoden die Expression von Cx37 und Cx40 in endothelialen und reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole nachweisen, wobei Cx40 zusätzlich im Bereich extra- und intraglomerulärer Mesangiumszellen vorgefunden wurde. Cx43 hingegen wurde an diesen Stellen nur in geringen Konzentrationen exprimiert. Aus der Hemmung spezifischer Gap Junctions mittels spezieller Proteine – (Cx37,43)GAP27 oder (Cx40)GAP27 – resultierte eine Blutdrucksteigerung, eine verstärkte Plasma-Reninaktivität sowie erhöhte ANG II-Spiegel, wohingegen der renale Plasmastrom ohne signifikante Veränderung der glomerulären Filtrationsrate vermindert war. Eine anschließende Normalisierung des Blutdrucks führte sowohl zu einer Verminderung des renalen Plasmastroms als auch der Filtrationsrate. Im Gegensatz dazu war nach einer solitären Inhibition von Cx43 via (Cx43)GAP26 nur eine alleinige Verminderung der glomerulären Filtrationsrate ohne Einfluss auf die übrigen Parameter zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass vor allem Cx37 und Cx40 im Juxtaglomerulären Apparat der Ratte exprimiert werden und an dieser Stelle maßgebliche Kontrolle über das Renin-Angiotensin-System und über autoregulatorische Prozesse ausüben. Die Bedeutung von Cx37 und Cx40 sowie von Cx43 wurde auch mit Hilfe von Untersuchungen an humanen Nieren belegt, wobei zusätzlich Cx45 an glatten Muskelzellen des Gefäßsystems identifiziert werden konn-

te. Die Expression aller vier Subtypen konnte zusätzlich in den Glomeruli nachgewiesen werden (*Kurtz et al., 2010*).

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Es ist bekannt, dass die Einflussnahme auf das RAAS an unterschiedlichen Stellen ein verändertes Reninexpressionsmuster zur Folge hat. So führt etwa eine verminderte Salzaufnahme zu einer Stimulation der Reninsekretion, eine gesteigerte Salzzufuhr hingegen zu deren Suppression. Dieses Expressionsmuster lässt sich auf eine veränderte Anzahl reninbildender Zellen zurückführen, welche in Folge unterschiedlicher Stimuli entlang der afferenten Arteriole in retrograder Richtung rekrutiert werden. Grundlage dieses Rekrutierungsvorgangs ist eine metaplastische Transformation von präglomerulär lokalisierten glatten Gefäßmuskelzellen zu reninbildenden Zellen. In Einzelfällen – wie etwa beim AT_{1a} -Knockout – kann die Rekrutierung bis in die Interlobulararterien reichen. Der genaue Regulationsmechanismus, welcher die Transformation glatter Muskelzellen zu reninbildenden Zellen triggert, ist jedoch bisweilen noch weitgehend unentschlüsselt.

Da die Bedeutung von NO für den Vorgang der Reninfreisetzung bereits vielfach untersucht und beschrieben wurde, scheint es wahrscheinlich, dass auch der Rekrutierungsmechanismus der reninbildenden Zellen im Zusammenhang mit dem zweiatomigen Molekül stehen könnte. Grundlage und Ziel dieser Arbeit ist demzufolge, die Rolle von NO für den Transformationsvorgang als Grundlage der Reninzellrekrutierung zu untersuchen und herauszuarbeiten welcher der drei Isotypen der NO-Synthase für diesen Vorgang die größte Bedeutung zukommt.

Zu diesem Zweck wurden alle Versuchstiere im Vorfeld mit einer Nierdrigsalz-Diät (LS) ernährt und zusätzlich mit dem ACE-Inhibitor Enalapril (E) behandelt. Beide Maßnahmen dienen der chronischen Stimulation des RAAS sowie des Rekrutierungsverhaltens reninbildender Zellen. Um die Rolle von NO für eine auf diese Art und Weise hervorgerufene Reninzellrekrutierung herauszuarbeiten, wurde bei einer Hälfte der untersuchten Tiere der NO-Signalweg mittels des unspezifischen NOS-Inhibitors N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name) außer Kraft gesetzt. Besonderes Interesse liegt hierbei auf den Konsequenzen dieser Maßnahme für das eNOS-defiziente Versuchstier. Des Weiteren sollen die Folgen der LS/E-getriggerten

Stimulation sowie des NO-Blocks an Wildtypen, AT_{1a}-Knockout-Tieren sowie Cx40-defizienten Mausnieren untersucht und mit den eNOS-Knockout-Tieren verglichen werden.

Die Nieren der Versuchstiere wurden zu diesem Zweck zunächst in Paraffin gebettet, um anschließend 5µm dicke Schnitte anfertigen zu können. Zur dreidimensionalen computergesteuerten Aufarbeitung wurden zwischen 60 und 100 Serienschnitte benötigt, welche immunhistochemisch gefärbt, mikroskopiert und im Anschluss digitalisiert wurden. Neben Renin spielte dabei vor allem das Glattmuskelaktin (α -SMA) als Bestandteil der Gefäßwand eine entscheidende Rolle, da es mit der Lokalisation des Renins assoziiert ist. Aus diesem Grund wurden beide Proteine fluoreszenzgefärbt. Die so erhaltenen histologischen Bilder dienen der zweidimensionalen Interpretation, die 3D-Rekonstruktion erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms Amira, welches Aussagen über die Gefäßbaumorphologie sowie die Reninkonzentration und -lokalisierung im dreidimensionalen Raum erlaubt und damit vor allem im Hinblick auf die Betrachtung und Untersuchung der Reninzellrekrutierung der zweidimensionalen Darstellung überlegen ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Filtersets	
TRITC-Filter:	Filter set 43, Zeiss, Jena Anregung 533-558nm Emission 570-640nm
Cy2-Filter:	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Anregung 450-490nm Emission 500-550nm
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Kanada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena AxioStar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen

Gerät	Hersteller
	Lightcycler, Roche, Mannheim
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
	Transferpette P10, P100, P250, P1000, Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen
	LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen
	Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumpzentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
	REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen
	Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen
	Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/l
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe
	1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau
	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
	Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Lightcycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen:	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Fran furt am Main
Ethanol p.a.	Merck, Darmstad
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

Produkt	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/μl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5ml Ampullen	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
nuclease free water	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5μg/μl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
QuantiTect [™] SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen, Düsseldorf
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane [®]	Abbott, Wiesbaden
TRIZOL	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Oligonukleotide

Die Firma Biomers.net hat die Oligonukleotide in geforderter Nukleotidreihenfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser konnte eine Konzentration von 100pmol/µl erreicht werden.

GAPDH 5´-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3´
 5´-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3´

Renin 5´-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3´
 5´-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3´

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller
Chicken-Anti-Renin-IgG	Primärantikörper	Dauids Biotech., Regensburg
Mouse-Anti-Glattmuskel- aktin-IgG	Primärantikörper	Beckman Coulter Immuno- tech., Marseille, Frankreich
Donkey-Anti-Chicken-IgY	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg
Donkey-Anti-Mouse-IgG	Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg

2.1.6 Puffer und Lösungen

Sofern es nicht anders beschrieben wird, wurden die Chemikalien für sämtliche Puffer und Lösungen in H₂O bidest. gelöst.

Immunhistochemie

Fixierlösung für Perfusion

PBS	
Paraformaldehyd	3%

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

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%
HS	10%

Molekularbiologie

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	50 mg/ml
----------------	----------

10x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer

Tris Base	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM

DEPC-H₂O

1/1000 V DEPC in H₂O bidest., schütteln, üN geöffnet unterm Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

2.1.7 Internetdienste und Software

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office XP* angefertigt. Die Bildbearbeitung geschah mit *Adobe Photoshop 9.0* und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA) und die eingefügten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 3* erstellt. Bei der Literaturrecherche wurde auf *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zurückgegriffen.

Außerdem wurde für die Mikroskopie *AxioVision Rel.4.5.* von Zeiss und für die 3D-Rekonstruktion *Amira 4.1* sowie *5.0 visualization software* (Mercury Computer Systems, Inc., USA) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Methodik

2.2.1.1 Versuchstiere

Für die zugrundeliegende Arbeit wurden neun bis zwölf Wochen alte Mäuse verschiedener Genotypen verwendet.

Nach abgeschlossener Perfusion wurde jeweils eine Niere pro Tier für die histologische Bearbeitung verwendet, während die andere, nach Schockfrost in N₂, bis zur RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt wurde.

Alle Versuchstiere wurden gemäß dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Zudem wurde stets auf für Mäuse optimale Haltungparameter geachtet (Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Folgende Tierstämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Generiert von	Zur Verfügung gestellt von
AT _{1a} ^{-/-}	129Sv	Ito et al., 1995	Coffmann (med. Institut, Duke Universität Durham)
Cx40 ^{-/-}	C57/B16	Kirchhoff et al., 1998	Willecke (Institut für Genetik, Abt. Molekulargenetik, Universität Bonn)
eNOS ^{-/-}	C57/B16	Gödecke et al., 1998	Gödecke (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Für die zugrundeliegende Versuchsreihe wurden des Weiteren besondere Behandlungen bezüglich der Ernährung durchgeführt. Um eine Stimulation des RAAS zu erreichen, wurden die Mäuse drei Wochen lang basierend auf einer Niedrigsalz-Diät (0,02% NaCl, Sniff) ernährt. Ab dem dritten Tag wurde den Tieren zudem der ACE-Hemmer Enalapril (10mg/kg/d) verabreicht. Ein Teil der zu untersuchenden Tiere erhielt zum Zwecke der systemischen NO-Blockade zusätzlich zur LS/E- Gabe eine dreiwöchige Behandlung mit dem NOS-Inhibitor L-Name (80mg/kg/d).

2.2.1.2 Fixierung des Nierengewebes

Ziel der Fixierung ist es, autokatalytische Vorgänge zu verhindern und die Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand zu erhalten. Zudem soll eine Härtung des Materials und damit eine bessere Handhabung an der Schneidemaschine erreicht werden. Die Fixierung beinhaltet Reaktionen zur Stabilisierung der Eiweiße unter Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Proteinmolekülen (*Hess und Sinowatz, 2000*).

Retrograde arterielle Perfusion

Die Fixierung der Nieren erfolgte durch eine retrograde arterielle Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS. Dazu wurden die Mäuse zunächst narkotisiert. Als Anästhetikum diente eine Kombination aus Ketamin und Xylazin (80mg/kg KG i.p.). Nach Eröffnung des Abdomens und Freilegung der Bauchaorta wurde diese infrarenal abgeklemmt, um eine Beeinträchtigung der Nierendurchblutung zu verhindern. Distal der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und dort fixiert. Die Eröffnung der unteren Hohlvene ermöglichte es, einen Druckausgleich zu erreichen. Nach Entfernen der oberen Klemme wurden über diesen Katheter 10ml isotone Kochsalzlösung und 10 I.E. Heparin retrograd perfundiert, wobei der Erfolg dieses Vorgehens an einer raschen Entfärbung der Abdominalorgane zu erkennen ist. Danach erfolgte die Fixierung mit frisch angesetztem 3% Paraformaldehyd in PBS mit konstantem Fluss von 40ml/3 min. Die entnommenen perfundierten Nieren wurden bis zur Einbettung in Paraffin in 70% Methanol aufbewahrt.

2.2.1.3 Paraffineinbettung

Als Vorbereitung zur Einbettung wurde das Nierengewebe nach vorangegangener Fixierung in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Methanolreihe zunehmender Kon-

zentration (2x70%, 2x80%, 2x90%, 2x100%; jeweils mindestens 30min) geführt und dabei schrittweise dehydriert. Anschließend wurde 3 x 30min in 100% Isopropanol gespült, wobei das letzte Isopropanolbad auf eine Temperatur von 45°C erwärmt wurde. Im Folgenden wurden die Präparate in ein auf 55°C erhitztes Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) überführt.

Nach weiteren 30min wurde das Gewebe 2x für mindestens 24h in 60°C warmem Paraffin inkubiert. Erst nachdem das Präparat völlig mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, wurde es in Silikon-Kautschuk-Einbettformen in 60°C warmes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und damit verbundene Härtung erfolgte bei RT.

2.2.1.4 Anfertigung von Paraffinschnittserien

Zur Erstellung der Schnittreihen wurden die eingebetteten Präparate auf einen Holzblock aufgeklebt und im Anschluss mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5µm dicke Serienschritte angefertigt, welche in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf superfrost plus Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40°C getrocknet und für die anschließenden Färbungen entparaffiniert. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte zunächst zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol getaucht und anschließend für jeweils 5 Minuten einer absteigenden Alkoholreihe (96%iges Isoprop., 80%iges Isoprop., 70%iges Isoprop.) zugeführt.

2.2.1.5 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie umfasst den Nachweis sowie die Identifikation antigener Strukturen in Zellen und Geweben mit Hilfe von Antikörpern, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind (*Romeis, 1989*). Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem sekundären, fluoreszierenden Antikörper, welcher sich gegen den F_c-Teil des 1. unmarkierten Antikörpers richtet, inkubiert, mit dem Ziel, den Antigen-Antikörper-Komplex zu detektieren. Sichtbar wird dieser Komplex durch die Anregung des Fluorophors mit Hilfe von Licht entsprechender Wellenlänge. Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung zunächst 3x für jeweils 5 min in PBS-Puffer auf dem

Schüttler geschwenkt. Um unspezifische Bindungen möglichst zu verhindern, wurden die Präparate mit 10% Horse Serum [2ml Horse-Serum + 18ml Stammlösung (50ml PBS-Otto-Puffer + 0,5g BSA)] 20 min lang auf dem Schüttler blockiert. Nach Absaugen der Blockierlösungen wurden die Schnitte mit Chicken-Anti-Renin-IgG (Verdünnung 1:400) und Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG (Verdünnung 1:50; beide in Blockierlösung) beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer geschlossenen, feuchten Kammer bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3x5 min in Stammlösung (= 1% BSA/PBS-Otto) gewaschen und dabei auf den Schüttler gestellt, um im Anschluss einen sekundären Cy2-konjugierten Donkey-Anti-Chicken-IgY (Verdünnung 1:400) sowie einen sekundären Rhodamin-(TRITC)-konjugierten Donkey-Anti-Mouse-IgG (Verdünnung 1:400; beide in 1%BSA/PBS-Otto) aufzutragen und 90 min im Dunkeln bei Raumtemperatur zu inkubieren. Im Anschluss wurden die Schnitte - weiterhin unter Lichtausschluss - 3x5 min in PBS-Otto gewaschen und schließlich mit Deckgläschen beklebt. Nach mindestens 10 minütiger Kühlung können die immunhistochemisch gefärbten Serienschnitte im Mikroskop begutachtet werden.

2.2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.2.2.1 Akquisition und Digitalisierung

Die histologischen Serienschnitte der zu untersuchenden Nieren wurden, wie oben beschrieben, angefertigt und gegen Renin und Glattmuskelaktin doppelimmunfluoreszent gefärbt. Die Digitalisierung der Serienschnitte geschah mittels eines Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektaufgabe, einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und der Software *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss.

Die Objektträger mit den aufgebrauchten Schnitten wurden bei 10facher Vergrößerung schrittweise aufgenommen. Da die Nierenschnitte nicht vollständig abgebildet werden konnten, mussten alle Schnitte quadrantenweise akquiriert und die Teilbilder mittels *AxioVision* wieder zusammengefügt werden. Dabei ist eine Überlappung der Einzelbilder von ca. 15% nötig.

Unter Verwendung des Fluoreszenzfilters für Cy2 wurde die Fluoreszenz für Glattmuskelaktin mit einer Wellenlänge von 450-490nm angeregt und damit die glatte Gefäßmuskulatur bei einer Emission von 500-550nm in grün sichtbar gemacht. Nach Wechsel auf den TRITC-Filter mit einer Anregungswellenlänge von 533-558nm ist

das Fluoreszenzsignal der reninreichen Areale mit einer Emission von 570-640nm in rot zu sehen. Wichtige Parameter wie Belichtungszeit, Kontrast und Gammakorrektur wurden in Abhängigkeit des Färbeerfolgs zunächst manuell für die beiden Kanäle anhand mehrerer Schnitte aus verschiedenen Bereichen der Niere festgelegt, gespeichert und für die Akquisition der gesamten Schnittserie angewandt. Um für die beiden Kanäle eine einzige Bilddatei pro Nierenschnitt zu erzeugen, wurde dem Bild für das Glattmuskelaktin ein grüner, dem für das Renin ein roter Farbanteil zugewiesen. Das so entstandene Overlay-Bild wurde im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum gespeichert. Für die weitere Bearbeitung der Daten war eine Konvertierung auf 8 Bit notwendig. Um einen Qualitätsverlust zu vermeiden, wurde das Grafikformat TIFF verwendet.

2.2.2.2 Datenverarbeitung mit Hilfe von *ImageJ*

Bildstapelgenerierung

Da die Anzahl der Pixel der einzelnen RGB-Bilder in Länge und Breite nicht konstant war, dies jedoch als Voraussetzung, die Daten in die Rekonstruktionssoftware portieren zu können, unbedingt notwendig war, wurden die RGB-Bilder zunächst mittels der Graphiksoftware *ImageJ* zu einem Bildstapel (Stack) zusammengefasst. Dabei erhielt man durch Anfügen schwarzer Ränder an die kleineren Bilder einen Stack aller Nierenschnitte mit gleich großen Dateien (Abb.2.1).

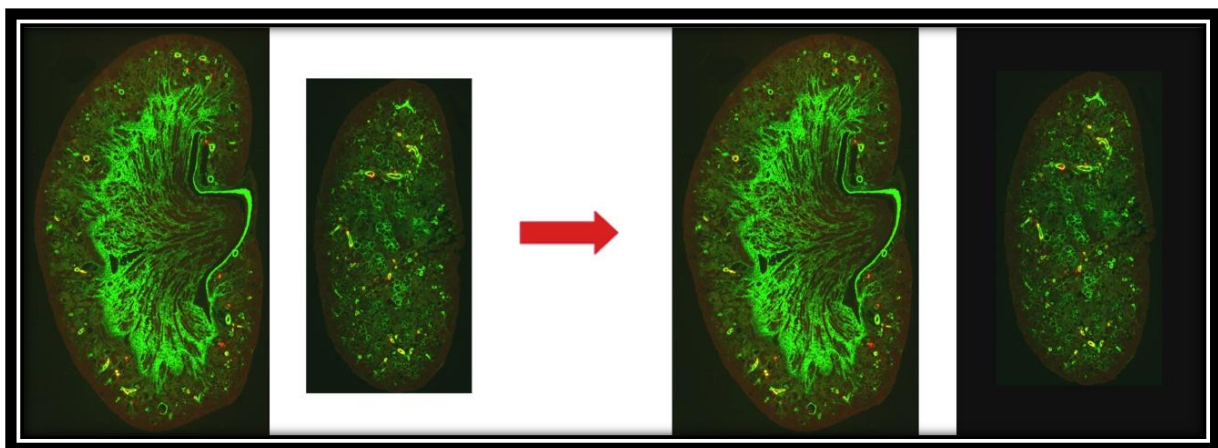


Abb. 2.1: Bildstapelgenerierung

2.2.2.3 3D-Rekonstruktion mit Hilfe von *Amira 4.1*

Um eine weitere Bearbeitung der Bildstapel sicherzustellen, wurden die Daten nun in die *Amira 4.1* Visualization Software auf eine Grafik-Workstation importiert. Eine kor-

rekte Skalierung der Daten wurde dadurch gewährleistet, indem zunächst das Verhältnis von Pixel zur Schnittdicke ($5\mu\text{m}$) berücksichtigt wurde. Dies ist eine objektiv- und kameraabhängige Größe (bei einer Verwendung des 5x Objektivs: $1\text{Pixel} = 2 \times 2\mu\text{m}$). Bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y) und die Gesamtzahl der Schnitte sowie der Schnittdicke (z) wird die sogenannte *boundingbox* definiert, welche die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt. Da im Folgenden in der Dreidimensionalität gearbeitet wurde, wird der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel ersetzt, welcher der Geometrie des Raumes entsprechend eine quaderförmige Zelle darstellt. Ein Voxel hat somit $2 \times 2 \times 5\mu\text{m}$.

Farbkanaltrennung

Um der Rekonstruktionssoftware zu ermöglichen, die Fluoreszenzmarkierungen anhand der Grauwerte der Pixel von jedem aufgenommenen Bild zu erkennen, wurde der nun gleichgroße RGB-Bildstapel mittels *ImageJ* wieder in seine einzelnen Kanäle aufgetrennt, um später eine separate Datensegmentierung durchführen zu können. Da für den blauen Farbkanal keine Daten definiert waren, konnte man diesen direkt verwerfen, so dass ausschließlich rote und grüne Anteile erhalten blieben. Für die Glattmuskelaktin- sowie die Renin-Bilder wurde jeweils ein separater Stack, der nun wieder monochrom dargestellt werden konnte, angelegt (Abb. 2.2).

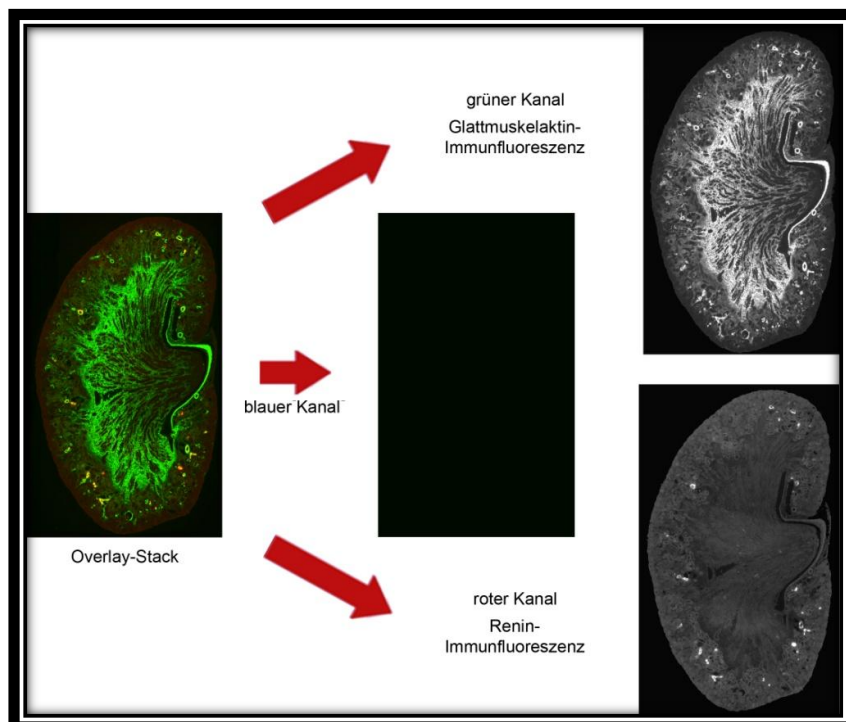


Abb. 2.2: Farbkanaltrennung

Alignment

Da die histologischen Serienschritte variabel auf den Objektträgern angeordnet waren, ist es nötig, die Renin- und Glattmuskelaktin-Kanäle zu alignen. Dies bedeutet, dass via Rotations- und Verschiebewebewegungen jeweils zwei aufeinander folgende Schnitte möglichst zur Deckungsgleichheit gebracht werden. Angewendet auf alle Schnitte entsteht so ein bestmöglich ausgerichteter Nierenausschnitt. Zunächst empfiehlt es sich, die Glattmuskelaktin-Daten zur Deckung zu bringen, weil aufgrund zahlreicherer Immunreaktionen ein besseres Alignment gewährleistet wird. Die Renin-Daten können dann - unter Verwendung des Glattmuskelaktin-Stapels als Referenzdatei - auf dieselben Positionen gedreht und somit ebenfalls zur Deckung gebracht werden. Theoretisch wäre ein automatisches Alignment möglich. Da aber durch die beim Schneiden entstehenden Scherkräfte, die Objekte teilweise verzerrt werden, resultieren aus dem automatischen Alignment häufig Fehler bei der Überlagerung. Es ist daher unbedingt notwendig, die Dateien manuell zu überprüfen und gegebenenfalls nachzukorrigieren.

Datensegmentierung

Bei der Datensegmentierung werden diejenigen Strukturen, welche zur Rekonstruktion des Gefäßbaumes herangezogen werden sollen, markiert, wobei es sich um den zeitaufwendigsten Teil der Arbeit handelt. Die Markierungen müssen hierbei einem definierten Material zugeordnet werden, um eine anschließende Oberflächenberechnung zu ermöglichen. Für dieses sogenannte Labeln der Immunreaktionen bietet das Programm die verschiedensten Werkzeuge an. Zu den wichtigsten Segmentierungsfunktionen gehören hierbei unter anderem das BRUSH- und das LASSO-Tool, mit deren Hilfe Fluoreszenzsignale im Freihandmodus umfahren werden können. Eher von Vorteil ist die MAGIC WAND-Funktion, welche es erlaubt, sich die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0=schwarz bis 254=weiß) zunutze zu machen. Auf diese Art und Weise ist es möglich, Immunfluoreszenzsignale durch die Festlegung einer Grauwert-Schwelle zu markieren. Da die Fluoreszenzfärbung niemals vollkommen konstant ist und in jedem Fall mit Artefakten einhergeht, ist eine manuelle Korrektur essentiell. Weitere wichtige Werkzeuge sind darüber hinaus FILL HOLES, REMOVE ISLANDS sowie SMOOTH LABELS. Die FILL HOLES-Funktion ermöglicht es dem Benutzer, Aussparungen im Material zu füllen. Möchte man kleine Material-Inseln (Artefakte) automatisch entfernen lassen, steht REMOVE ISLANDS zur Verfü-

gung. Erscheinen die Ränder der Materialien zu kantig und erfordern eine Glättung, kann SMOOTH LABELS zu diesem Zweck eingesetzt werden. Das Tool THRESHOLD ermöglicht, gleichermaßen wie der MAGIC WAND, eine Selektion aller Voxels in einem definierten Grauwertbereich. Der Unterschied liegt darin, dass THRESHOLD sich auf den ganzen Schnitt auswirkt, während sich der MAGIC WAND nur auf den mit dem ausgewählten Voxel verbundenen Bereich bezieht. Sämtliche Segmentierungsfunktionen lassen sich dabei sowohl auf alle Schnitte als auch nur auf den aktuellen Schnitt anwenden. Gelegentlich kommt es vor, dass benötigte Strukturen auf einem einzelnen Schnitt schlecht von der Immunfluoreszenz erfasst wurden oder sogar komplett fehlen. Markiert man die fehlende Struktur auf dem vorherigen sowie dem nachfolgenden Schnitt, lässt sich durch die Funktion INTERPOLATE eine Interpolation für die fehlenden Strukturen oder Schnitte erreichen und somit Aussparungen in der Rekonstruktion verhindern.

Das Ziel der Segmentierung ist es, basierend auf dem Stapel für das Glattmuskelaktin, anhand der Fluoreszenzsignale den gewählten Ausschnitt des Gefäßbaumes darzustellen. Im Reninstapel ist eine Markierung der reninpositiven Zellen durchzuführen. Die Strukturen der Kapsel und der Glomeruli können aufgrund der Eigenfluoreszenz der sekundären Antikörper erkannt und ebenfalls gelabelt werden.

Oberflächengenerierung

Die erstellten Label-Dateien dienen als Grundlage für die Berechnung der 3D-Modelle. Aus jedem Material wird eine separate Oberfläche generiert und räumlich dargestellt. Je komplexer die Modelle, das heißt je mehr Polygone für die Oberfläche berechnet werden, desto stärker wird die Leistungsfähigkeit des Rechners (RAM-Kapazität) beansprucht. Aus diesem Grund müssen die Parameter so gewählt werden, dass ein Kompromiss zwischen dem Verlust an Detailinformationen und der Darstellungsgeschwindigkeit gefunden wird. Beispielsweise kann durch Simplifizieren die Anzahl der Dreiecke und somit die Datenmenge reduziert werden. Außerdem kann die Oberfläche geglättet werden.

Die zugrunde liegenden Rekonstruktionen dieser Arbeit wurden alle auf eine Million Dreiecke simplifiziert, und es wurde eine Glättung der Oberfläche durchgeführt. Nach Oberflächenberechnung besteht nun die Möglichkeit, den rekonstruierten Nierenausschnitt zu drehen und dadurch eine räumliche Analyse durchführen zu können. Dazu kann man sämtliche surface-Dateien, also die Oberfläche von Kapsel, Gefäßbaum,

Glomeruli sowie Renin einzeln oder auch zusammen darstellen. Darüber hinaus können die Schnittbilder durch den Datensatz angezeigt werden. Neben der reinen Betrachtung der 3D-Modelle können zudem Strecken und Winkel gemessen sowie Volumina und Flächen der einzelnen Modelle berechnet werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Total-RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit TRIZOL (GibcoBRL) nach den dazugehörigen Protokollen des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987), wobei bei sämtlichen Vorgängen Latexhandschuhe zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen getragen sowie RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet wurden. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180°C RNase-frei gemacht, benötigte Puffer und Lösungen mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Darüber hinaus wurden sämtliche Vorgänge auf Eis durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die nach der Präparation eingefrorenen Organe mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1ml TRIZOL homogenisiert und fünf Minuten bei RT inkubiert. Zum Homogenat wurden 200µl Chloroform je ml TRIZOL hinzugefügt und das Gemisch für 15 Sekunden lang stark geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT und folgender Zentrifugation (4°C, 12000g 15min) der Proben war es möglich, drei Phasen zu separieren. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde dasselbe Volumen 100%iges Isopropanol zugegeben, die Ansätze 10x geschwenkt und im Anschluss 10 Minuten bei RT inkubiert. Durch die folgende 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000g wurde die RNA pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets mit 75%iger Ethanollösung (v/v) gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 7500g wurde der Überstand erneut abgesaugt, die Pellets in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der RNA wurden die Pellets 1-3 min bei 55°C inkubiert.

Die isolierte RNA wurde photometrisch vermessen, um deren Konzentration und Qualität zu bestimmen. Eine A260/A280 - Ratio von 1,6-2,0 wird dabei als qualitativ gut beurteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.2 Synthese komplementärer DNA

Die isolierte RNA wurde nun mittels Reverser Transkription in cDNA (komplementäre DNA) überschrieben. Um selektiv die mRNA-Moleküle (ca. 2-4% der Gesamt-RNA) umzuschreiben, wurden Oligo(dT)₁₅ Primer verwendet, welche mit dem 3'-Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisieren. Die erhaltene cDNA diente als Matrize für die spätere quantitative PCR.

Ausgegangen wurde von 1µg Gesamt-RNA, die mit 0,5µg/µl Oligo-(dT)₁₅ Primer gemischt und für 5min auf 65°C erhitzt wurde, um anschließend sofort auf Eis gestellt zu werden. Zu dem Reaktionsgemisch (20µl) wurden zusätzlich 100U M-MLV Reverse Transkriptase, 4µl 2,5mM je dNTP und 4µl 5x First Strand Buffer zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 1h bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz anschließend 2min auf 94°C erhitzt. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit nukleasefreiem Wasser 1:3 verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Real-Time-PCR

Der quantitativen Polymerasekettenreaktion liegt eine photometrische Bestimmung der DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus zugrunde. Auf diese Art und Weise ist es möglich, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet, wobei gebundenes SYBR Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies. Die dabei nachzuweisende Signalintensität ist proportional zur entstehenden DNA-Menge. Die PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit an einem Light-Cycler durchgeführt. Der 20µl-Reaktionsansatz setzte sich dabei zusammen aus 10µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Mastermix, je 1µl sense und antisense Primer (10pmol/µl), 6µl RNase-freies H₂O und 2µl cDNA. Das Amplifikationsprotokoll bestand - nach der Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase von 15min bei 95°C - aus 40 Zyklen mit 15s Denaturierungsphase bei 95°C, 20s Annealingphase bei 58°C und 20s Elongationsphase bei 72°C. Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde diese langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und währenddessen die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als „housekeeping gene“ diente dabei GAPDH. Der Renin-mRNA

Gehalt pro Niere wurde berechnet aus der Gesamtausbeute an extrahierter RNA und des Renin-mRNA Levels. So konnten alle Renin mRNA Levels in der sich entwickelnden Niere relativ zu den Levels in der adulten Niere miteinander verglichen werden.

2.2.4 Blutdruckmessungen

Geräte:

Produkt	Hersteller
Blutdruckmessgerät	Blood Pressure Measuring Monitor, 9001-series; TSE Systems, Bad Homburg

Blutdruckmessung:

Vor Beginn der Blutdruckmessung wurden die Mäuse für zehn Minuten in die bereits aufgewärmte Kammer (37 °C) gesetzt. Daraufhin wurden sie in eine Haltevorrichtung gebracht, an welche sie bereits Tage im Voraus gewöhnt wurden. An den aus der Haltevorrichtung herausragenden Mausschwanz wurde zunächst eine Druckmanschette und dahinter eine zweite Manschette, die einen photoelektrischen Pulsdetektor beinhaltet, angebracht. Anschließend erfolgte die Messung des systolischen Blutdrucks, welcher auf dem Monitor aufgezeichnet wurde.

Es ist zu berücksichtigen, dass diese Methode äußeren Störfaktoren unterworfen ist, worunter der Agitiertheit der Mäuse während des Messvorgangs die größte Bedeutung zukommt. Durch Adaption der Tiere an die Umgebung wurde dabei versucht, jenen Faktoren bestmöglich entgegenzuwirken, um auf diese Art und Weise möglichst aussagekräftige Resultate zu erzielen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Reninexpressionsmuster des adulten unbehandelten Wildtyps

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels des NO-Inhibitors L-Name die Rolle des – insbesondere endothelialen - Stickstoffmonoxids für die Reninzellrekrutierung und die Blutdruckregulation herauszuarbeiten. Als Referenz für die nachfolgenden Rekonstruktionen wurde zunächst eine Serienschmittfolge einer unbehandelten adulten Wildtyp-Mausniere angefertigt. Anschließend sollte die Expression von Renin und Glattmuskelaktin, welches als Marker für den arteriellen Gefäßbaum dient, mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden.

Mittels des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira konnte aus der so entstandenen Schnittbildserie eine räumliche Darstellung des Gefäßsystems sowie der reninbildenden Zellen erreicht werden.

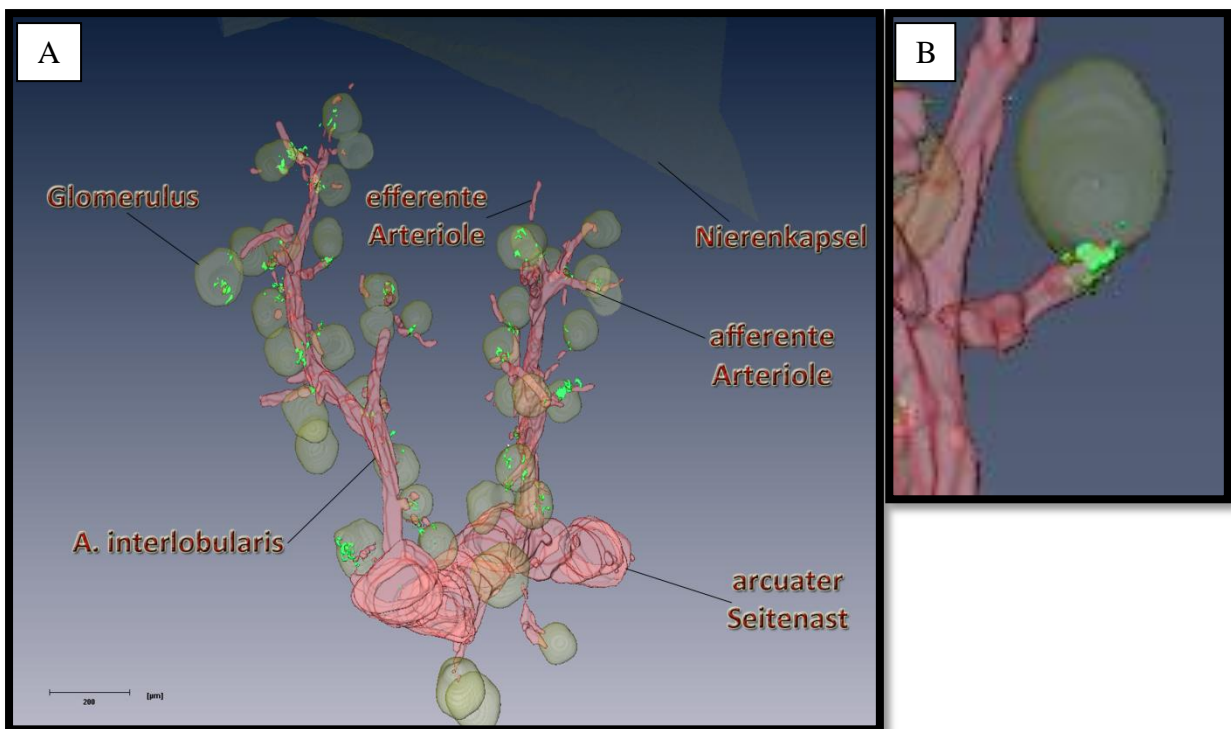


Abb. 3.1: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität im ausgewählten Gefäßbaumabschnitt des adulten unbehandelten Wildtyps mit Glomeruli und Nierenkapsel (gelb).

A: [Gesamtansicht]

B: [Detailansicht]: Renin-Immunreaktivität findet sich ausschließlich präglomerulär, am distalen Ende der afferenten Arteriole.

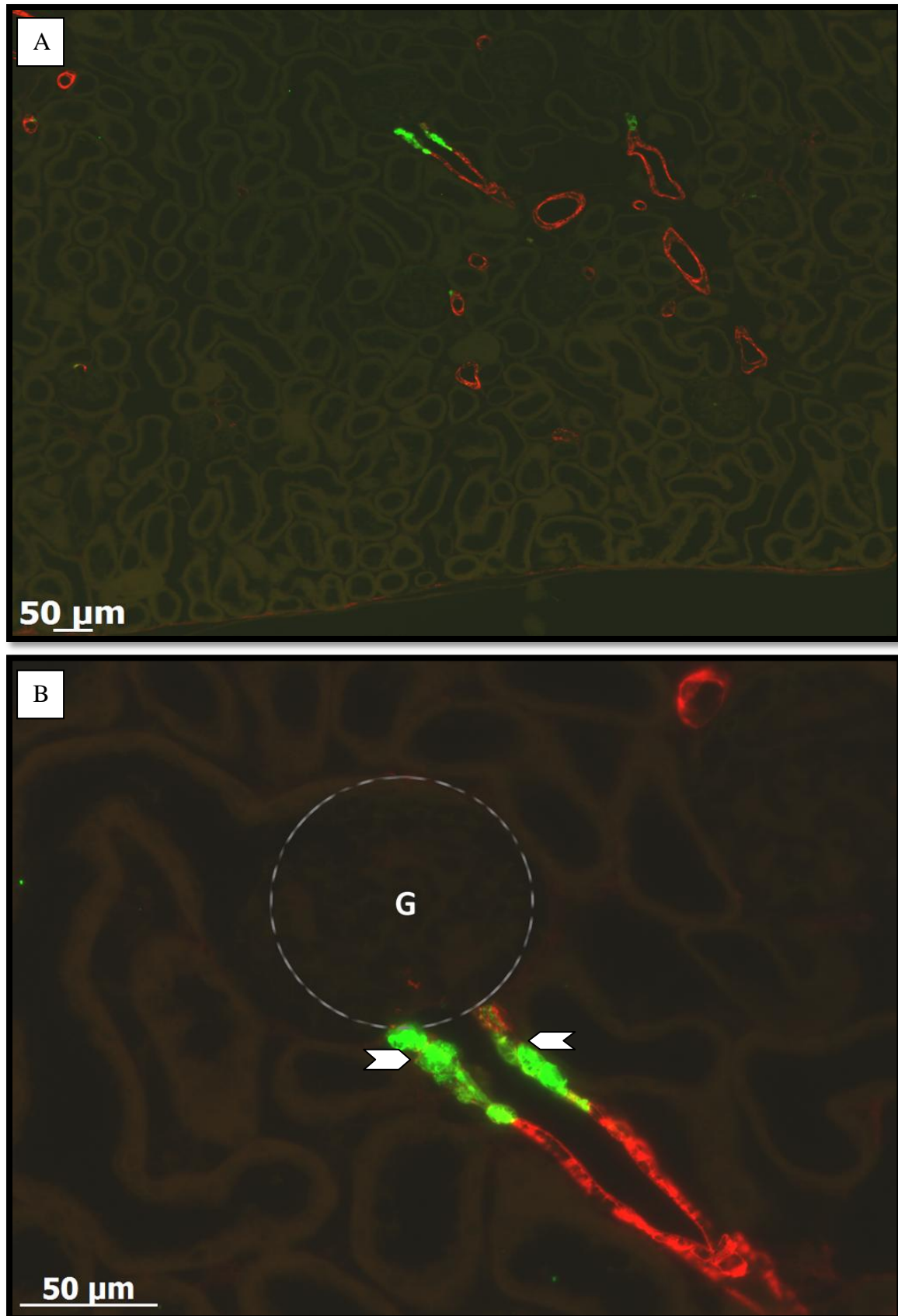


Abb. 3.2: Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten einer adulten Wildtyp-Niere. **A**: Übersichtsbild in 100facher Vergrößerung; **B**: 400fache Vergrößerung. Renin ist immer grün dargestellt; Glattmuskelaktin rot. Gelbe Bereiche spiegeln die Kolokalisation beider Proteine wider. G: Glomerulum.

Sowohl die 3D-Rekonstruktion als auch die histologische Darstellung zeigt deutlich, dass Renin im adulten, unbehandelten Wildtypen lediglich an seiner typischen juxtaglomerulären Position am Ende der afferenten Arteriole zu finden ist. Alle anderen Abschnitte des Gefäßbaums, einschließlich der efferenten Arteriolen, weisen keine Reninexpression auf (Abb. 3.1 und 3.2).

3.2 Untersuchung des Einflusses von L-Name auf die Rekrutierung reninbildender Zellen mittels dreidimensionaler Rekonstruktionsverfahren und Renin-mRNA-Analysen

Um den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Rekrutierung reninbildender Zellen zu untersuchen, wurden alle Versuchstiere mit dem ACE-Hemmer Enalapril (E) behandelt und auf der Grundlage einer Low-Salt-Diät (LS) ernährt. Beides führt zu einer Stimulation der Reninfreisetzung, basierend auf unterschiedlichen Mechanismen. Durch Inhibition des Angiotensin-Converting-Enzyms wird die Umwandlung von ANG I zu ANG II blockiert und somit die ANG II-Konzentration im Blut vermindert. Dadurch fehlt dessen vasokonstriktorisches Effekt sowie das negative Feedback, welches ANG II auf die Reninfreisetzung ausübt, so dass es zu einer Stimulation der Reninsekretion kommt. Durch die geringe Salzzufuhr wird gleichzeitig via Macula Densa-vermittelter Regulationsverfahren eine Stimulation der Reninfreisetzung erreicht.

Die eine Hälfte der Versuchstiere wurde zusätzlich mit dem unspezifischen NO-Synthase-Inhibitor Nitro-L-arginine methyl ester (L-Name) behandelt und die Ergebnisse wurden im Anschluss mit der Kontrollgruppe verglichen.

3.2.1 Untersuchungen an Wildtyp-Mausnieren

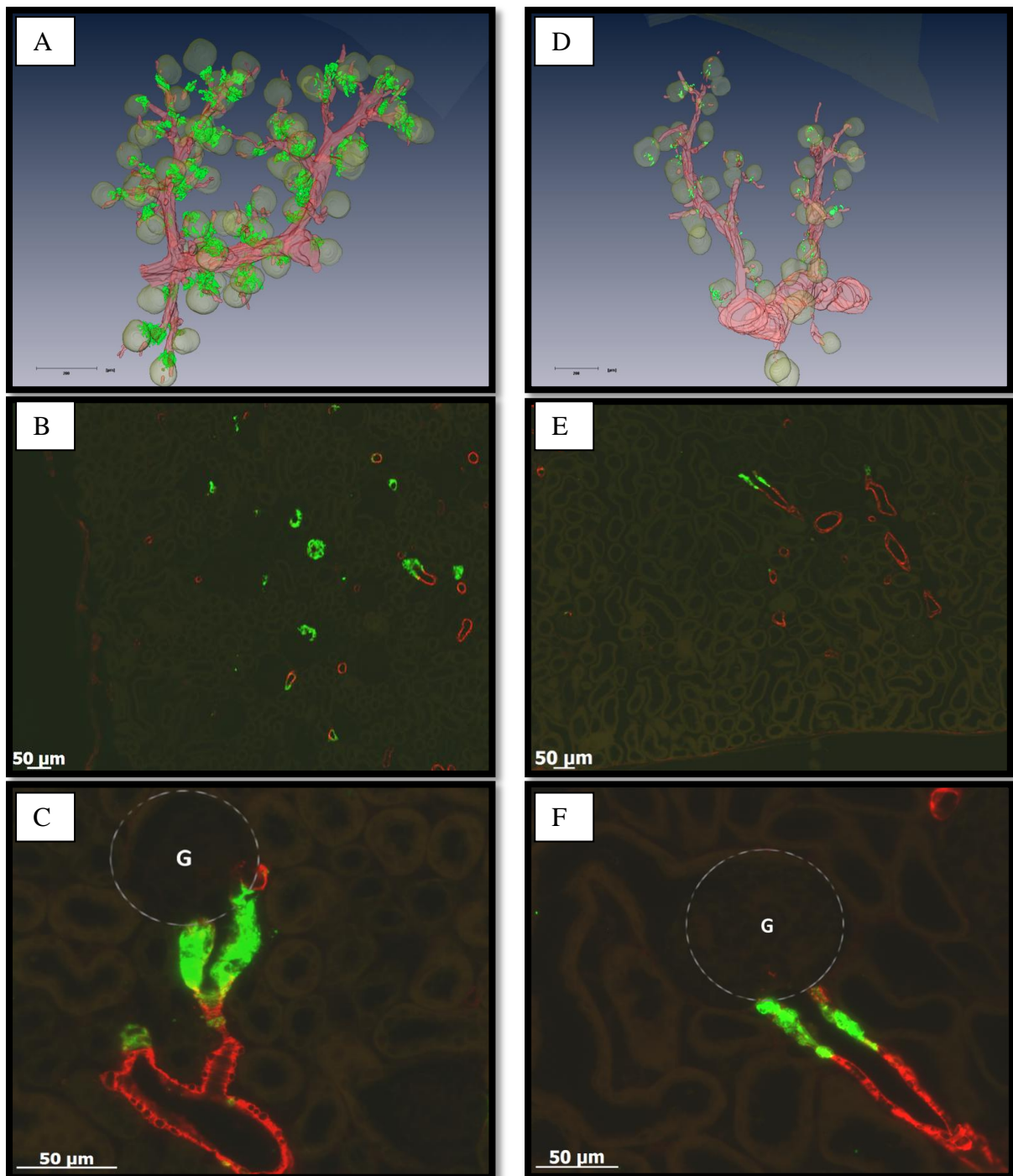


Abb. 3.3: **A:** 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Gefäßbaumausschnitts Wildtyp + E/LS.
B: [Übersichtsbild]: Histologische immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung Wildtyp + E/LS in 100facher Vergrößerung.
C: [Detailansicht]: Histologische immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung Wildtyp + E/LS in 400facher Vergrößerung (Renin: grün; Aktin: rot; Kolokalisation: gelb).
D: 3D-Rekonstruktion Wildtyp unstimuliert
E: [Übersichtsbild]: histologische Darstellung Wildtyp unstimuliert in 100facher Vergrößerung
F: [Detailansicht]: histologische Darstellung Wildtyp unstimuliert in 400facher Vergrößerung

Aus der Behandlung der Versuchstiere mit Enalapril und einer Nidrigsalz-Diät resultiert eine deutliche Zunahme der Reninkonzentration im Vergleich zum unstimulierten Wildtypen (Abb. 3.3). Im Bereich des glomerulären Gefäßpols ergibt sich in Folge von Rekrutierungsvorgängen eine Mehrschichtigkeit, welche besonders deutlich mit Hilfe der histologischen Darstellungen zu erkennen ist. Darüber hinaus ist eine Rekrutierung reninbildender Zellen entlang der afferenten Arteriole in retrograder Richtung eindeutig festzustellen (Abb. 3.4B). Wie im unbehandelten Vergleichstier, zeigt sich in den übrigen Abschnitten des Gefäßbaumes (arcuate Seitenäste, Arteriae interlobulares, efferente Arteriolen) jedoch keine fluoreszenzmikroskopische Reaktion, welche auf das Vorhandensein reninbildender Zellen schließen lassen würde. Die histologischen Übersichts- und Detailaufnahmen (Abb. 3.3B, C, E, F) unterstreichen die beschriebene Reninzellrekrutierung entlang der afferenten Arteriole in Folge einer Stimulation des RAAS mittels E/LS. Da sich keine Koloalisation von Renin und Aktin am Gefäßpol des Glomerulums beobachten lässt, ist davon auszugehen, dass die reninbildenden Zellen auch nach Stimulation die Glattmuskelaktinzellen der Media im Bereich der terminalen afferenten Arteriole ersetzen, so wie dies auch beim unbehandelten Wildtypen der Fall ist, jedoch in weitaus geringerer Zahl.

Hinsichtlich der Struktur und des Verzweigungsmusters des Gefäßbaumes lässt sich kein signifikanter Unterschied herausarbeiten.

Diejenigen Versuchstiere, die zusätzlich zum ACE-Inhibitor und der Nidrigsalz-Diät noch den NO-Synthase-Hemmer L-Name erhalten haben, weisen ihrerseits eine erneute Veränderung hinsichtlich des Renin-Expressionsmusters auf. Basierend auf einer systemischen Blockade von NO, kommt es – wie es in den Abbildungen 3.4 und 3.5 zu erkennen ist - zu einer verminderten Rekrutierung der reninbildenden Zellen am vaskulären Pol und in Folge dessen zu einer signifikanten Abnahme der Reninkonzentration, welche jedoch noch immer höher zu sein scheint, als es beim unbehandelten Referenztier der Fall ist.

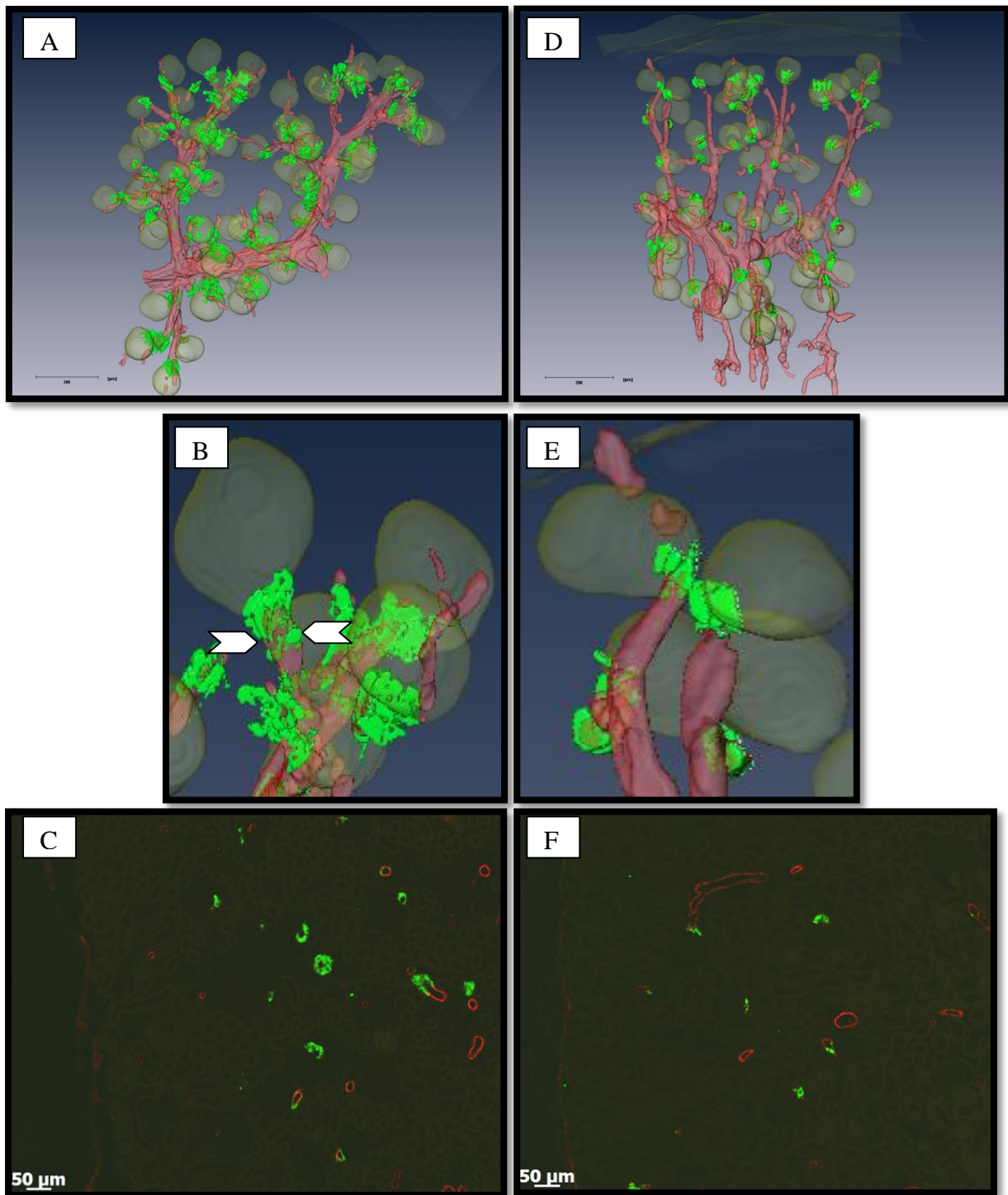


Abb. 3.4: **A**: [Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität Wildtyp + E/LS (3 Wochen), mit Glomeruli (gelb)
B: Detailansicht eines repräsentativen Gefäßbaumausschnitts aus [A]
C: histologisches Übersichtsbild Wildtyp + E/LS in 100facher Vergrößerung
D: [Gesamtansicht]: 3D-Rekonstruktion der Renin- (grün) und Glattmuskelaktin- (rot) Immunreaktivität Wildtyp + E/LS (3 Wochen) + L-Name, mit Glomeruli (gelb)
E: Detailansicht eines repräsentativen Gefäßbaumausschnitts aus [D]
F: histologisches Übersichtsbild Wildtyp + E/LS + L-Name in 100facher Vergrößerung

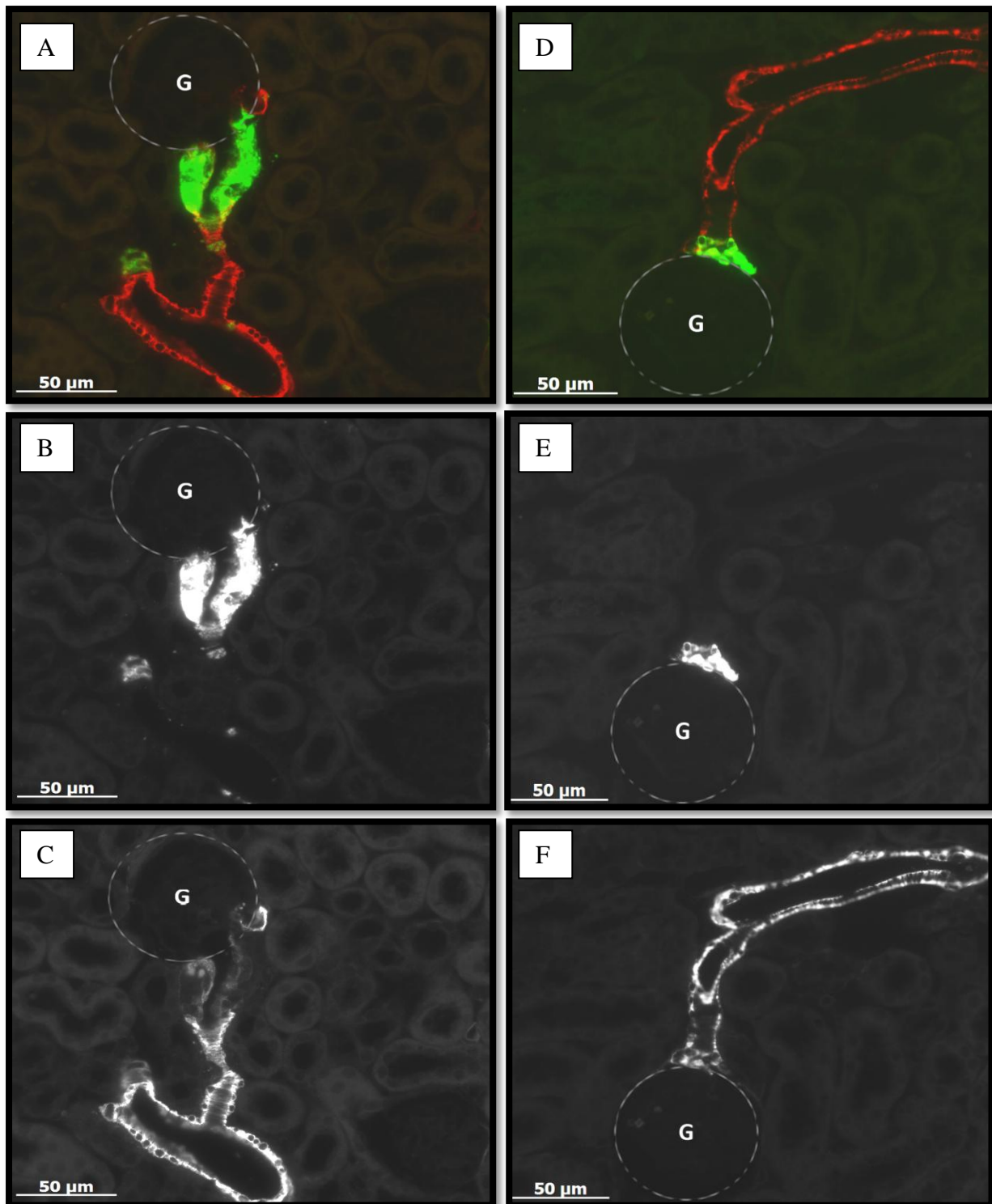


Abb. 3.5: histologische immunfluoreszenzmikroskopische Detaildarstellungen in 400facher Vergrößerung

- A:** Darstellung der Renin- und Aktin-Immunfluoreszenz Wildtyp stimuliert mit E/LS
- B:** Renin-Reaktion Wildtyp + E/LS
- C:** Aktin-Reaktion Wildtyp + E/LS
- D:** Darstellung der Renin und Aktin-Immunfluoreszenz Wildtyp stimuliert mit E/LS + L-Name
- E:** Renin-Reaktion Wildtyp + E/LS + L-Name
- F:** Aktin-Reaktion Wildtyp + E/LS + L-Name

Auch die Einzeldarstellungen der Renin- und Aktin-Reaktionen im Fluoreszenzmikroskop verdeutlichen die differenzierte Lokalisation der Glattmuskelaktin- sowie der reninbildenden Zellen (Abb. 3.5).

Während also eine deutlich gesteigerte Reninzellrekrutierung nach Stimulation der Versuchstiere mittels E/LS beobachtet werden kann, geht die zusätzliche Gabe des NOS-Inhibitors L-Name mit einer signifikant geringeren Rekrutierung einher, was die Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Reninzellrekrutierung und damit die Reninsynthese und Blutdruckregulation erahnen lässt. Die juxtaglomeruläre Lokalisation der reninbildenden Zellen bleibt bei NO-Inhibition erhalten, ebenso wie die Morphologie des renalen Gefäßbaums.

3.2.2 Untersuchungen am eNOS-defizienten Mausmodell

Im Folgenden wurde der gleiche Versuchsansatz an eNOS-Knockoutmäusen durchgeführt, um differenziert die Bedeutung des endothelialen Stickstoffmonoxids für die Rekrutierung reninbildender Zellen herauszuarbeiten.

Auch hier zeigt sich in der 3D-Rekonstruktion eine Zunahme der Reninkonzentration durch Stimulation mit E/LS im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Niere. Diese Stimulation der eNOS-defizienten Tiere scheint jedoch mit einem geringeren Reningehalt einherzugehen, als es bei Stimulation der wildtypischen Tiere der Fall ist (Abb. 3.6). Darüber hinaus zeigt das eNOS-defiziente Mausmodell kein klassisches retrogrades Rekrutierungsverhalten entlang der afferenten Arteriole. Vielmehr ist die Erhöhung der Reninkonzentration, als Folge der Stimulation, auf eine präglomeruläre punktuelle Zunahme der reninbildenden Zellen im Sinne eines Clusters zurückzuführen. Hieraus resultiert eine Mehrschichtigkeit im Bereich des glomerulären Gefäßpols.

Reninfluoreszenz findet sich also bei den eNOS-Knockouttieren ausschließlich am terminalen Ende der afferenten Arteriole unter Aussparung aller übrigen Gefäßbaumabschnitte. Auch die Struktur sowie das Verzweigungsmuster des Gefäßbaums lassen keine Auffälligkeiten erkennen.

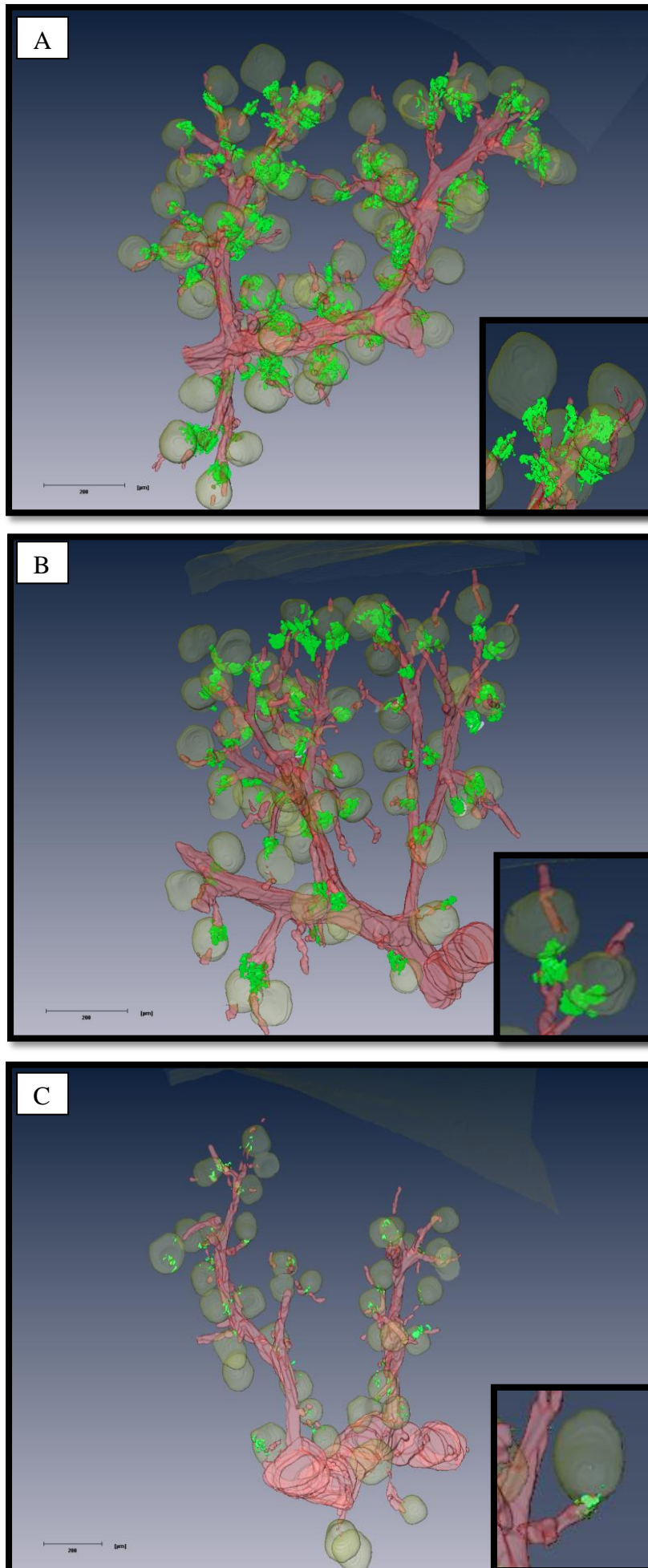


Abb. 3.6:
3D-Rekonstruktionen
repräsentativer
Gefäßbaumausschnitte
(Gesamt- + Detailansicht).
A: eNOS-Wildtyp + LS/E
B: eNOS-Knockout + LS/E
C: unstimulierter Wildtyp

LS/E bewirkt eine Zunahme der Reninkonzentration sowohl im eNOS-Wildtypen als auch im eNOS-Knockout.

Vergleicht man die beiden stimulierten Modelle miteinander, so zeigt sich beim Wildtypen eine präglomeruläre Zunahme reninbildender Zellen sowie darüber hinaus eine erkennbare retrograde Reninzellrekrutierung entlang der afferenten Arteriole. Das eNOS-Knockoutmodell hingegen lässt zwar auch eine präglomeruläre Clusterbildung erkennen, ein deutlicher Rekrutierungsvorgang entlang der afferenten Arteriole ist jedoch nicht zu beobachten.

Nach systemischer Blockade von NO mittels L-Name zeigt sich in der 3D-Rekonstruktion der eNOS-defizienten Tiere - im Gegensatz zur Wildtypmaus - keine erkennbare Veränderung bezüglich des Reninexpressionsmusters (Abb. 3.7).

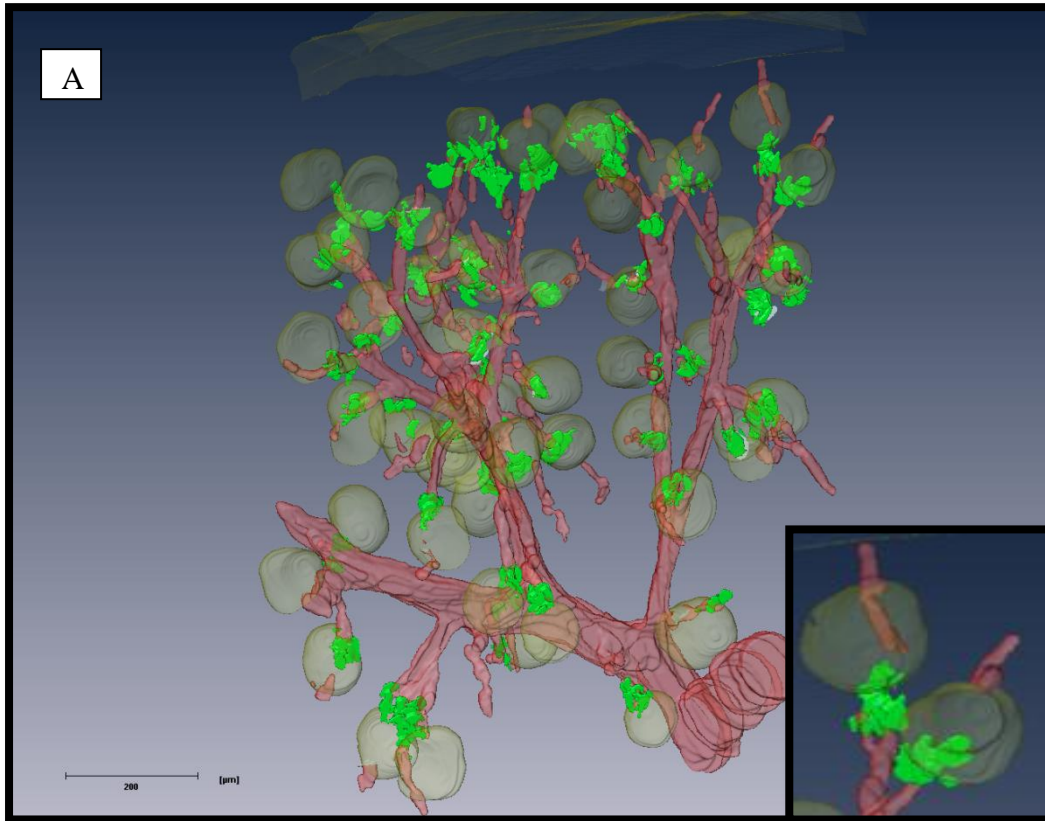
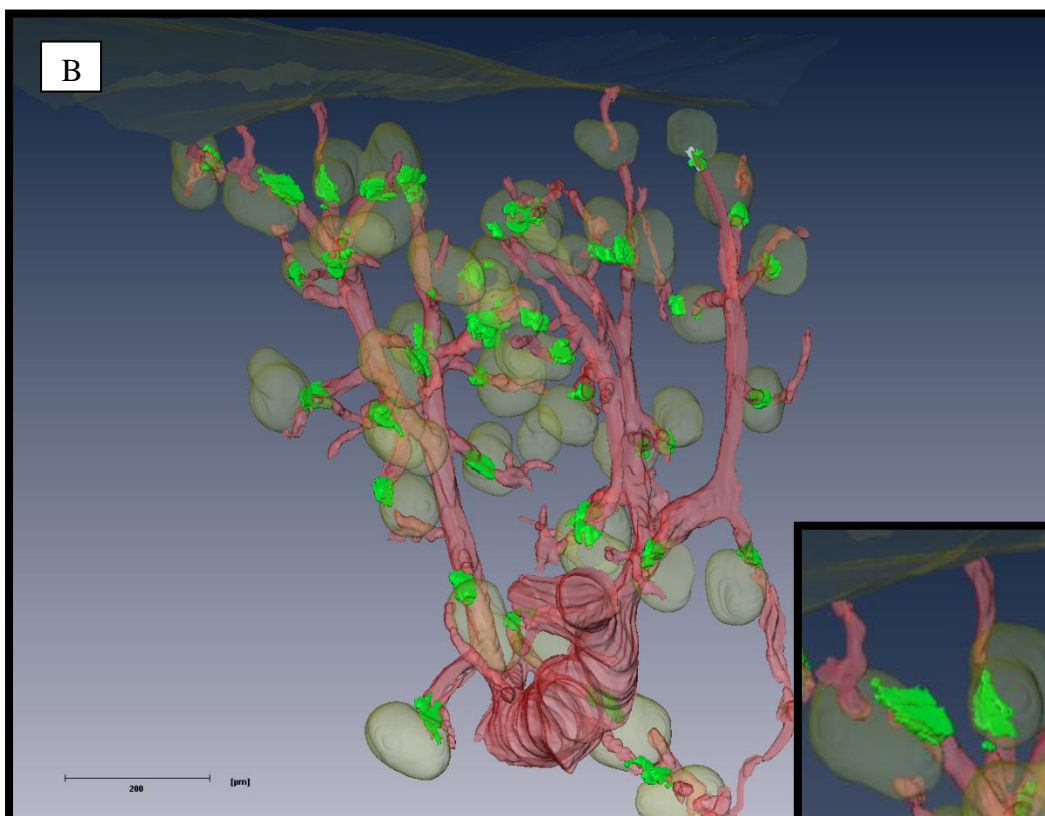


Abb. 3.7: 3D-Rekonstruktionen repräsentativer Gefäßbaumabschnitte (Gesamt- +Detailsansicht)

A: eNOS-Knockout + E/LS

B: eNOS-Knockout + E/LS + L-Name



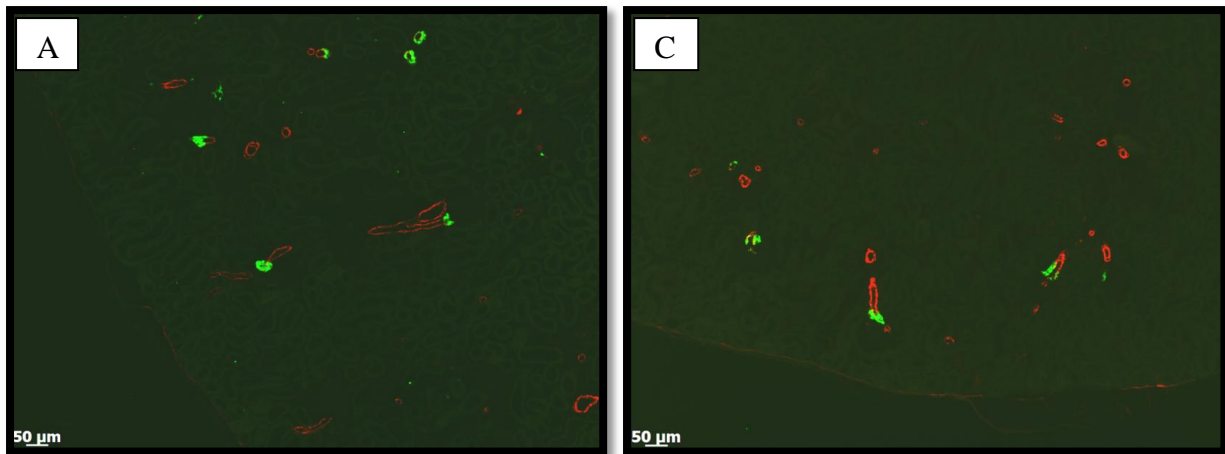


Abb. 3.8: Histologische Aufnahmen von Paraffinschnittserien eNOS-defizienter Mauseieren.

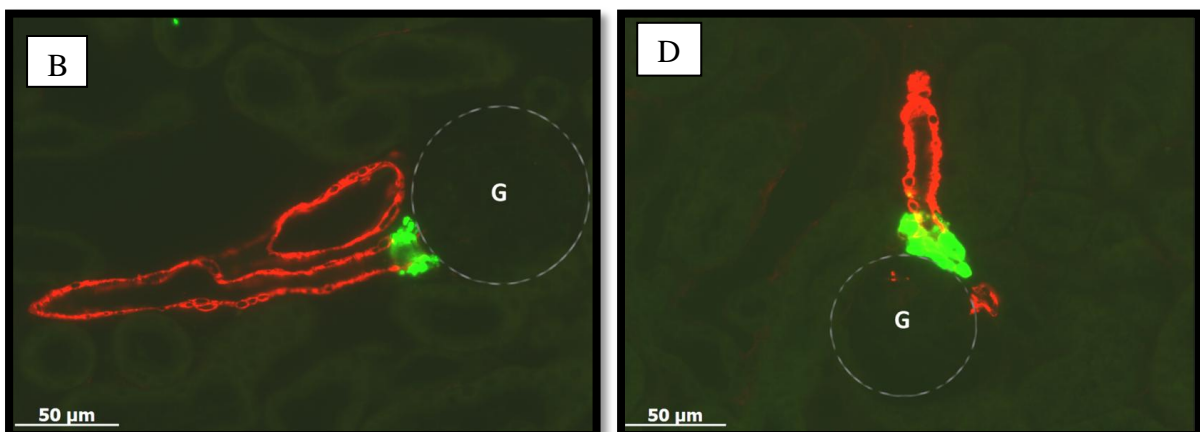
A: Übersichtsaufnahme: eNOS-Knockout + E/LS in 100facher Vergrößerung

B: Detailaufnahme: eNOS-Knockout + E/LS in 400facher Vergrößerung

C: Übersichtsaufnahme: eNOS-Knockout + E/LS + L-Name in 100facher Vergrößerung

D: Detailaufnahme: eNOS-Knockout + E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung

Die Reninexpression findet unverändert am vaskulären Pol der Glomeruli statt, wobei L-Name im eNOS-Knockout keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl oder Lokalisation der reninbildenden Zellen hat.



Vergleicht man die 3D-Rekonstruktionen sowie die histologischen Darstellungen der eNOS-Knockouttiere mit und ohne L-Name, so zeigt sich in beiden Fällen keine klassische Rekrutierung reninbildender Zellen entlang der afferenten Arteriole, wie es etwa beim Wildtypen beobachtet werden kann. Zwar führt die Gabe von E/LS zu einer Steigerung des Reningehaltes im Vergleich zum unbehandelten wildtypischen Versuchstier, dies ist jedoch auf eine Clusterbildung, also eine punktuelle präglomeruläre Zunahme der reninsynthetisierenden Zellen, und nicht auf einen retrograden Rekrutierungsvorgang zurückzuführen. Beide Mausmodelle weisen also - unabhängig von einer L-Name Substitution - das gleiche Reninexpressionsmuster auf, welches auch nach unspezifischer NOS-Blockade keine wesentliche Veränderung - weder hinsichtlich der Anzahl, noch der Lokalisation der renin-

bildenden Zellen - erkennen lässt. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung von endothelial gebildetem NO für den Rekrutierungsprozess bei chronischer Stimulation des RAAS.

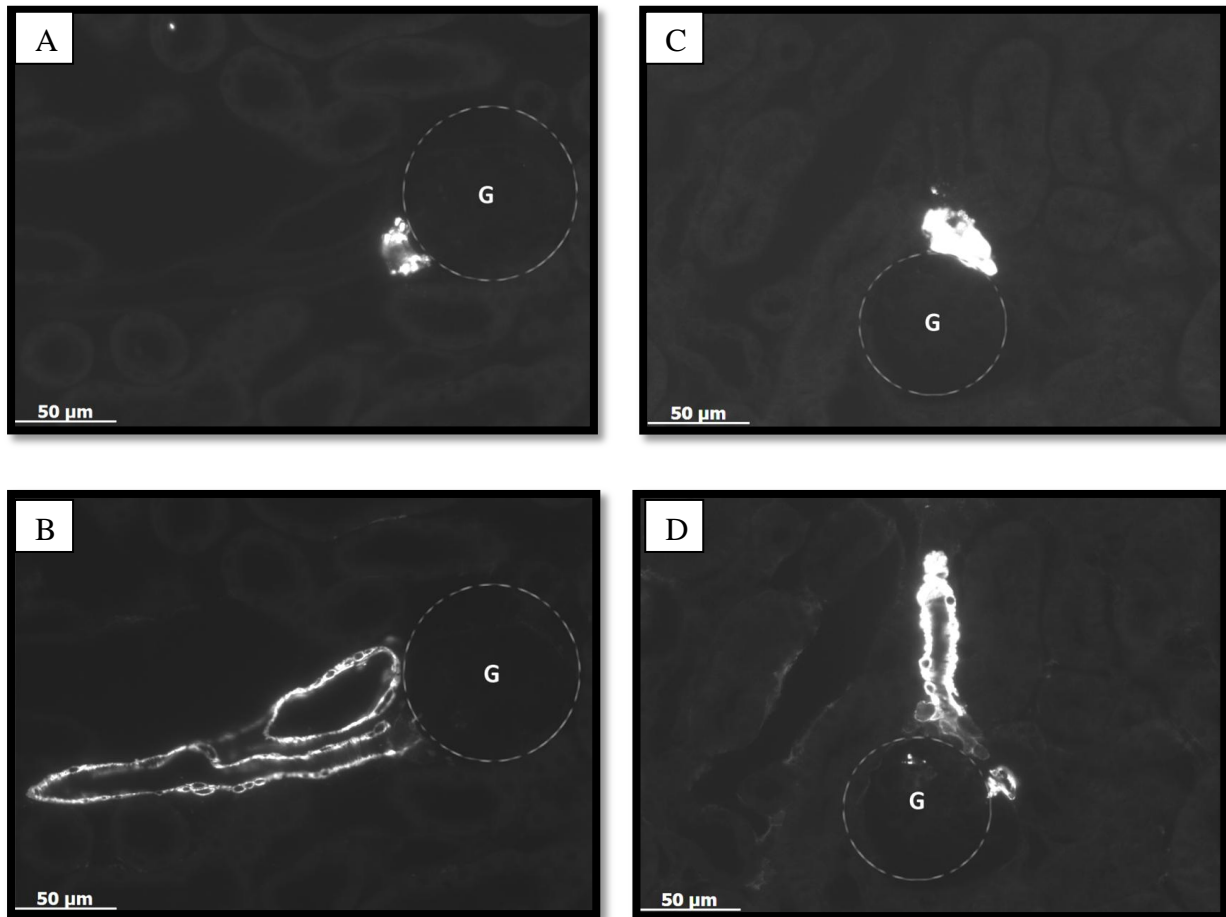


Abb. 3.9: histologische Aufnahmen der Renin- bzw. Aktin-Reaktionen in eNOS-Knockoutmäusen

A: Renin-Reaktion im eNOS-Knockout + E/LS

B: Aktin-Reaktion im eNOS-Knockout + E/LS

C: Renin-Reaktion im eNOS-Knockout + E/LS + L-Name

D: Aktin-Reaktion im eNOS-Knockout + E/LS + L-Name

Vor allem in den histologischen Darstellungen der eNOS-Knockout-Mäuse fällt auf, dass es unter dem Einfluss von L-Name zu keiner Verminderung der reninbildenden Zellen kommt. Man meint im mit L-Name-behandelten Tier sogar eine leichte Zunahme des Reningehaltes zu erkennen (Abb. 3.8 und 3.9). Die fluoreszenzmikroskopischen Renin- und Aktin-Einzelreaktionen zeigen außerdem, dass auch im eNOS-Knockout kaum Kolo-kation von Gefäßmuskelaktin- und reninbildenden Zellen stattfindet. Die mehrschichtig anmutende Tunica media besteht in der terminalen afferenten Arteriole aus den reninbildenden Zellen des Juxtaglomerulären Apparates.

3.2.3 Untersuchungen am AT_{1a}-defizienten-Mausmodell

Im AT_{1a} –Knockout fehlt die Anlage zur Bildung der AT_{1a}-Rezeptoren, über die der Großteil der ANG II-Effekte vermittelt wird. Zu diesen Effekten zählt neben der Vasokonstriktion unter anderem auch die Hemmung der Reninfreisetzung als Teil der negativen Rückkopplungsschleife des RAAS. Mangels dieser Wirkungen und durch die Folgen einer Nidrigsalz-Diät kommt es zu einer enormen Rekrutierungssteigerung reninbildender Zellen und einer damit einhergehenden Zunahme der Reninexpression. Da aufgrund des AT_{1a} –Knockouts die ANG II Wirkung an jenen Rezeptoren ohnehin ausgeschaltet ist, wurde im folgenden Versuchsablauf auf die Zugabe eines ACE-Inhibitors verzichtet.

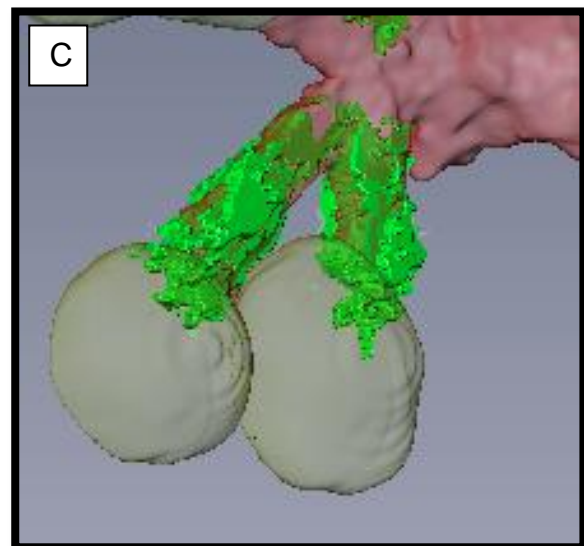
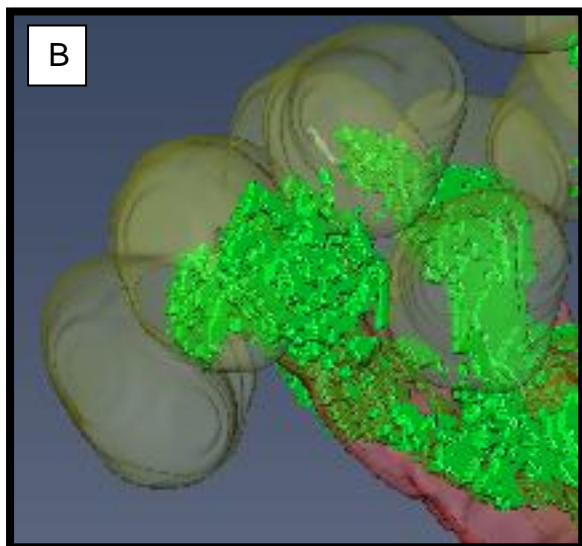
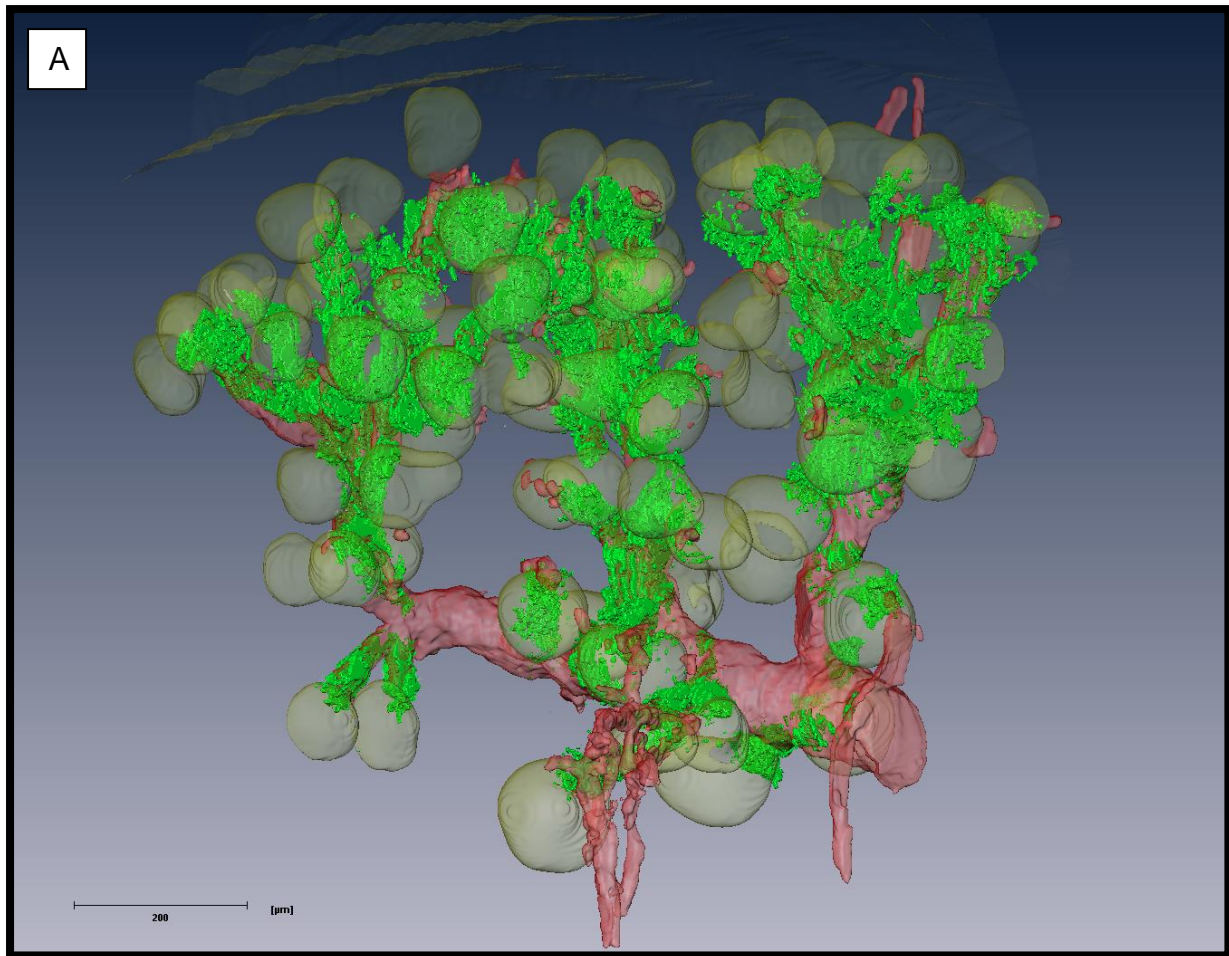


Abb. 3.10: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Gefäßbaumausschnitts AT_{1a} -Knockout + LS
A: [Gesamtansicht]
B+C: [Detailansicht]

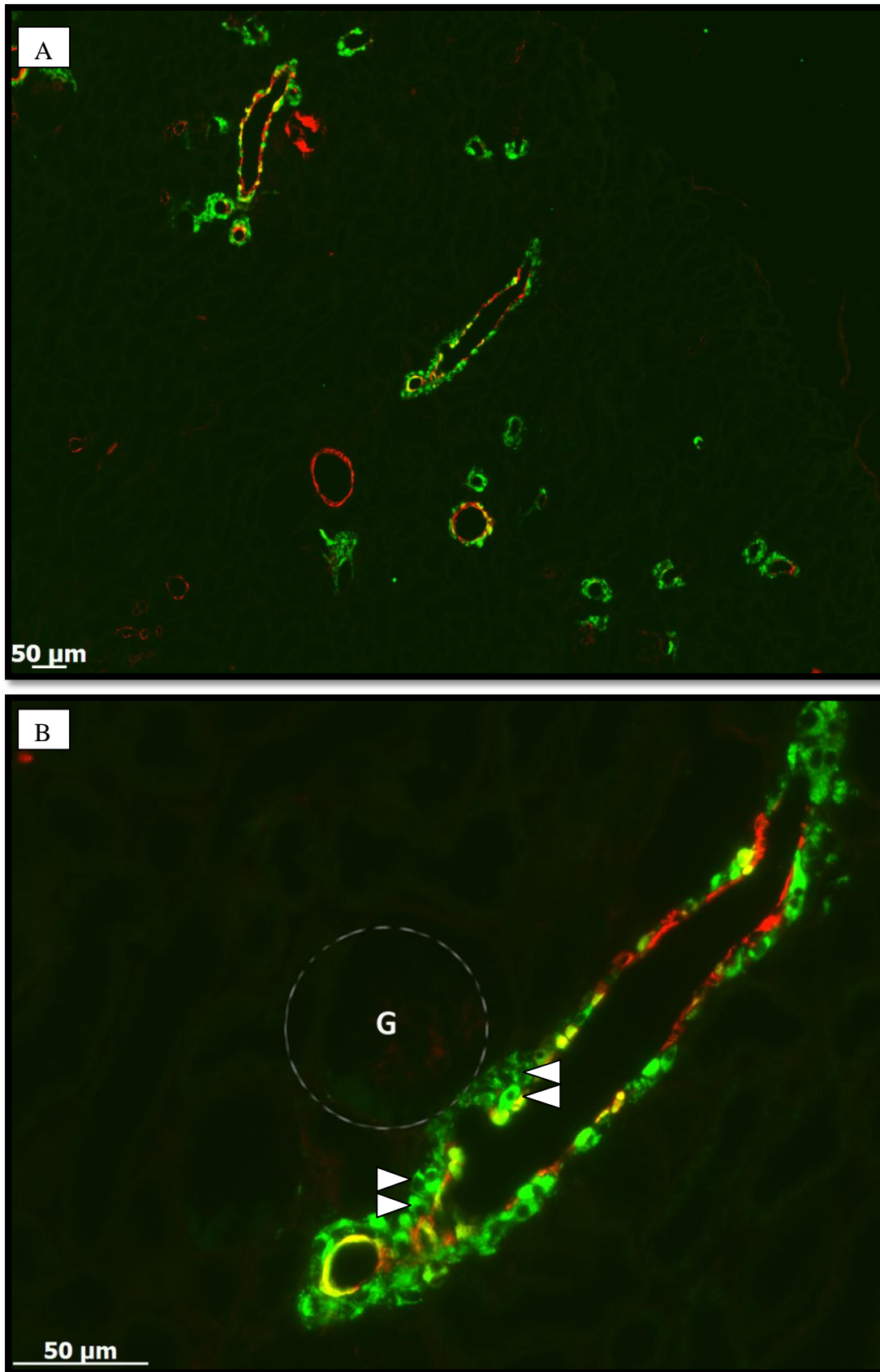


Abb. 3.11: histologische Darstellung der Renin- (grün) und Gefäßmuskelaktin- (rot) Immunfluoreszenz; Kolokalisation beider Proteine erscheint gelb; G = Glomerulum

- A: Übersichtsbild in 100facher Vergrößerung
- B: Detailansicht in 400facher Vergrößerung

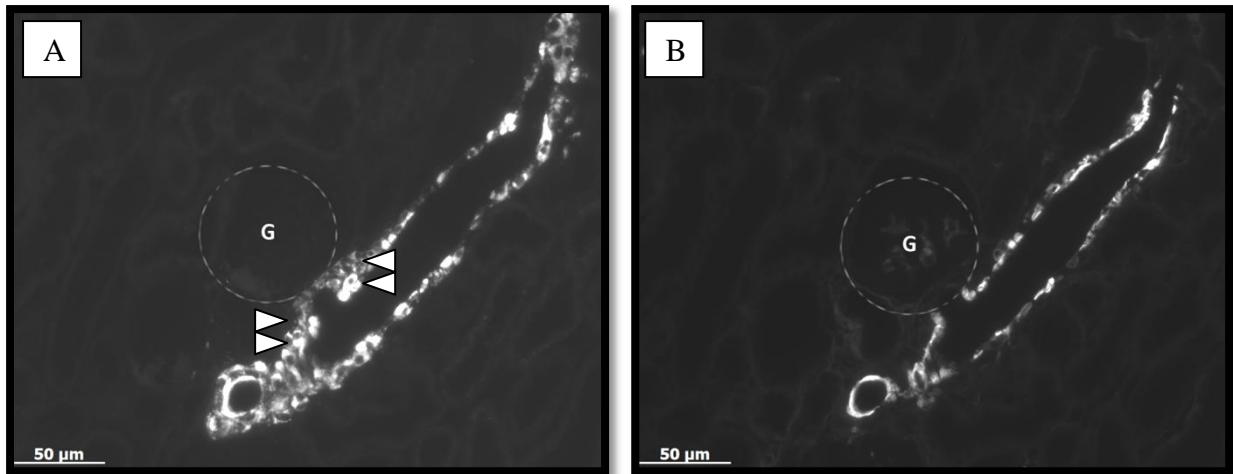


Abb. 3.12: **A:** histologische Darstellung der Renin-Immunfluoreszenz in 400facher Vergrößerung
B: histologische Darstellung der Aktin-Immunfluoreszenz in 400facher Vergrößerung

Der mittels Low-Salt-Diät stimulierte AT_{1a} -Knockout zeigt eine – im Vergleich zum Wildtypen – auffallend hohe Reninzellrekrutierung. Sowohl die 3D-Rekonstruktion des Gefäßbaumes (Abb. 3.10) als auch die histologischen Darstellungen (Abb. 3.11 und 3.12) veranschaulichen, dass die Reninsynthese nicht nur am distalen Ende der Vasa afferentia geschieht, sondern entlang der gesamten afferenten Arteriole sowie bisweilen auch in den Arteriae interlobulares. Der arcuate Seitenast hingegen weist, ebenso wie die efferenten Arteriolen, keinerlei Reninbildung auf.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchsergebnissen, zeigt sich darüber hinaus eine deutliche Kolo-kalisation von Renin und Gefäßmuskelaktin in den histologischen Bildern, was sich gelb fluoreszierend darstellt. Eine klare Trennung der kubischen grün fluoreszierenden reninbildenden Zellen von den länglichen Aktinzellen ist somit nicht mehr möglich. Auffallend ist des Weiteren, dass sich neben den typischen reninbildenden Zellen, welche innerhalb der afferenten Arteriole lokalisiert sind, auch atypische Zellen finden, welche dem Gefäßmuskelaktin aufsitzen und vermutlich aufgrund der Stimulation rekrutiert wurden (\blacktriangleleft in Abb. 3.11 und 3.12).

In der Zusammenschau zeigt sich demnach eine hoch signifikant gesteigerte Reninexpression, welche über die gesamte Länge der Vasa afferentia sowie teilweise auch der Arteriae interlobulares beobachtet werden kann. Darüber hinaus weist der AT_{1a} -Knockout keine einschichtige afferente Arteriole auf, so wie es etwa beim Wildtypen zu eruieren war, sondern eine - durch dem Gefäß aufsitzende, atypische reninbildende Zellen - mehrschichtige Gefäßstruktur.

Nicht nur das Reninexpressionsmuster variiert deutlich von demjenigen der wildtypischen Niere, auch die Morphologie des Gefäßbaumes zeigt signifikante Unterschiede. Dieser erscheint vergleichsweise verdickt, was sich sowohl auf Ebene der Vasa afferentia und efferentia als auch auf Ebene der Interlobulararterien und des arcuaten Seitenastes beobachten lässt. Die afferenten Arteriolen zeigen sich zudem verkürzt (Abb. 3.10).

Auch der Gefäßbaum der mit L-Name behandelten AT_{1a} -Knockouttiere weist die bereits beobachtete veränderte Morphologie auf. Demnach sind auch hier die Gefäße verdickt und verkürzt (Abb. 3.13).

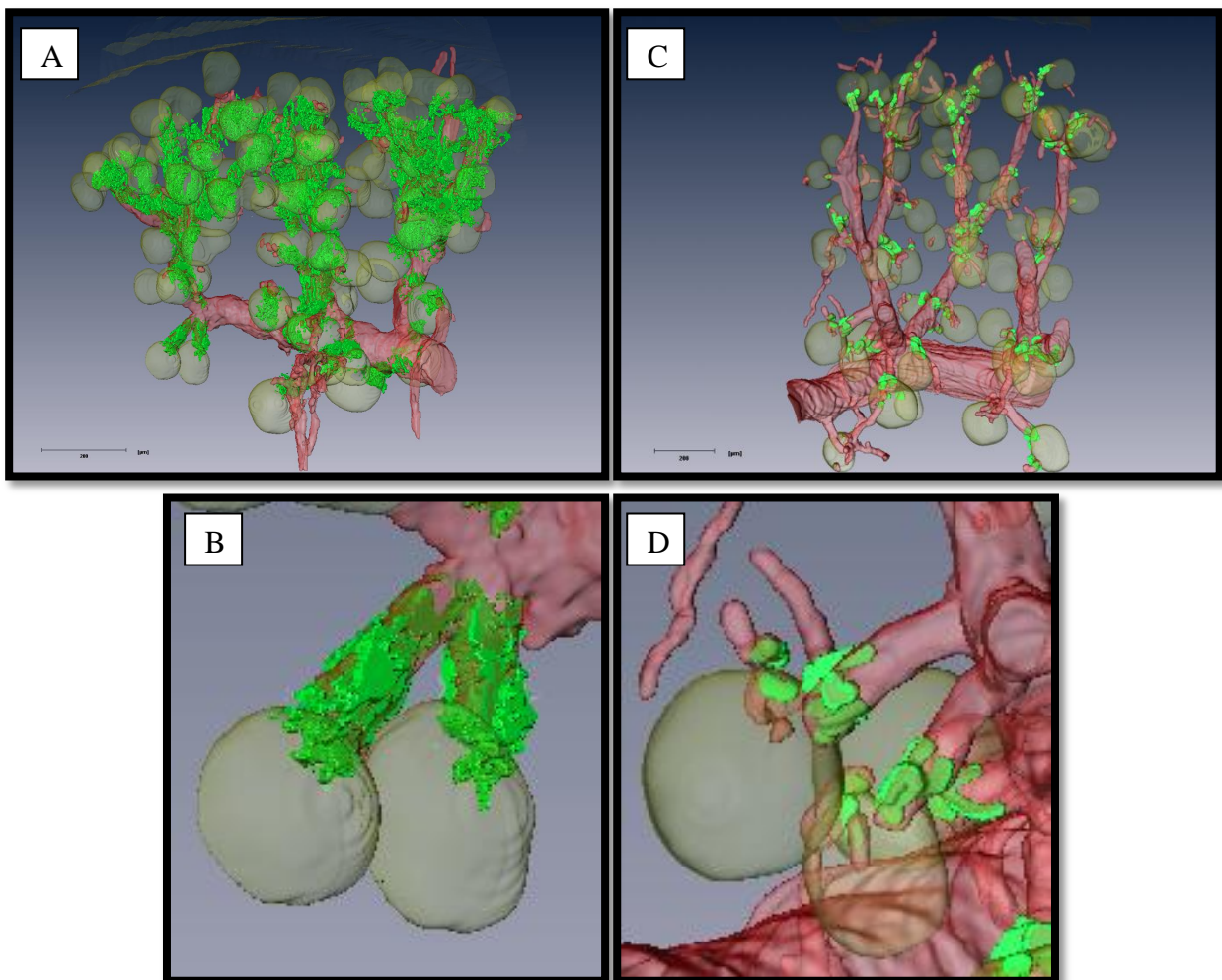


Abb. 3.13: Vergleich der dreidimensionalen Rekonstrukte des stimulierten AT_{1a} -Knockouts mit und ohne L-Name

- | | | |
|------------------|-------------------------|----------------------------------------------------|
| <u>A</u>: | [Gesamtansicht]: | AT_{1a}-Knockout + LS |
| <u>B</u>: | [Detailansicht]: | AT_{1a}-Knockout + LS |
| <u>C</u>: | [Gesamtansicht]: | AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name |
| <u>D</u>: | [Detailansicht]: | AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name |

Deutlich zu erkennen ist darüber hinaus eine hoch signifikante Verminderung der Reninkonzentration nach systemischer Blockade der NO-Wirkung durch L-Name. Basierend auf der hohen Ausgangskonzentration zeigt der AT_{1a}-Knockout somit ein deutliches Ansprechen auf die Gabe des NOS-Inhibitors.

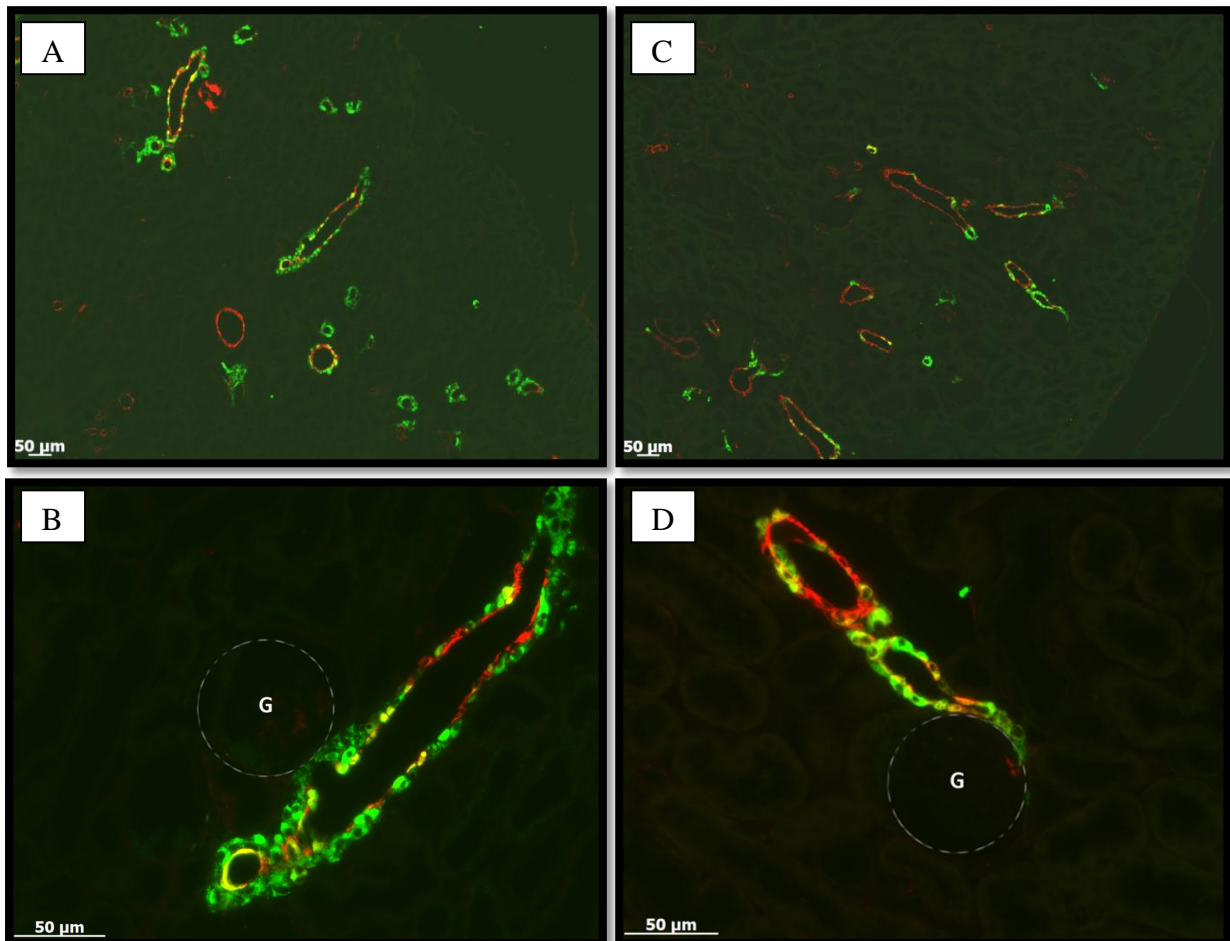
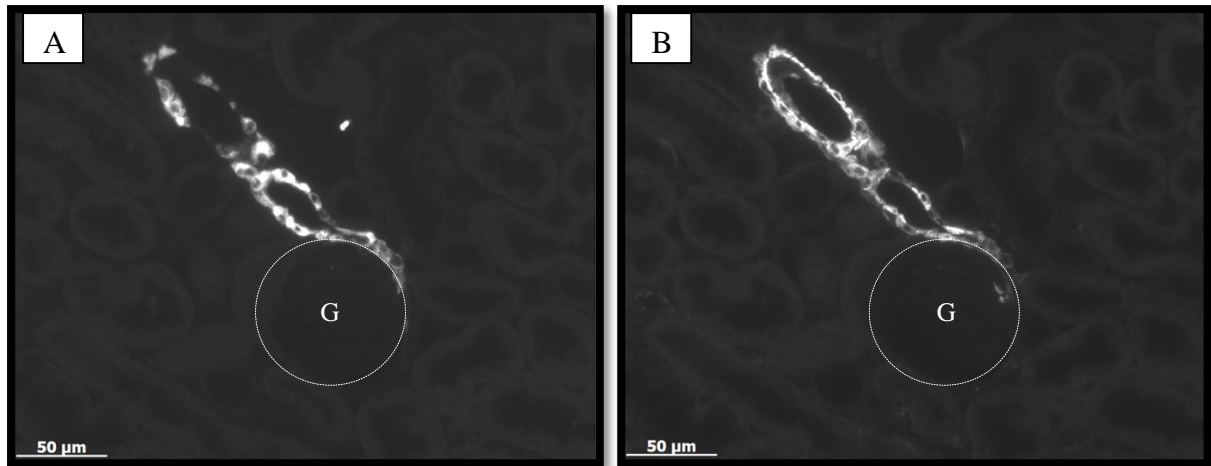


Abb. 3.14: Histologische Darstellungen des stimulierten AT_{1a}-Knockouts mit und ohne L-Name

- A: [Übersichtsbild]: AT_{1a}-Knockout + LS in 100facher Vergrößerung
- B: [Detailansicht]: AT_{1a}-Knockout + LS in 400facher Vergrößerung
- C: [Übersichtsbild]: AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name in 100facher Vergrößerung
- D: [Detailansicht]: AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name in 400facher Vergrößerung

Obwohl eine eindeutig verminderte Rekrutierung reninbildender Zellen nach L-Name-Gabe zu beobachten ist, zeigt sich weiterhin, dass reninbildende Zellen nicht nur an ihrer typischen präglomerulären Position in Erscheinung treten. Vielmehr findet die Reninsynthese im AT_{1a}-Knockout auch nach NOS-Blockade entlang der gesamten afferenten Arteriole statt. Die Interlobulararterien hingegen sind weitgehend reninfrei. Teilweise lassen sich zudem den Gefäßmuskulaktinzellen außen aufliegende reninbildende Zellen ausfindig machen (Abb. 3.14).



**Abb. 3.15: A: AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name in 100facher Vergrößerung; Renin-Reaktion
B: AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name in 100facher Vergrößerung; Aktin-Reaktion**

Ein Vergleich der Renin- und Aktin-Einzelreaktionen mittels Immunfluoreszenzmikroskop verdeutlicht die Kolo-kalisation beider Proteine im Vas afferens (Abb. 3.15).

Mit dem Ziel, herauszuarbeiten, ob im AT_{1a}-Knockout auch ohne vorherige Stimulation des RAAS reninbildende Zellen nicht nur präglomerulär, sondern entlang der gesamten afferenten Arteriole, lokalisiert sind, wurden weitere AT_{1a}-Knockouttiere der Versuchsreihe zugefügt. Diese wurden ohne vorherige LS-Stimulation mit L-Name behandelt, bevor deren Nieren in Paraffin gebettet wurden, um im Anschluss Serienschnitte zu erstellen, welche ebenso wie alle vorherigen Nieren immunhistochemisch gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Des Weiteren fand auch in diesem Fall eine 3D-Rekonstruktion statt.

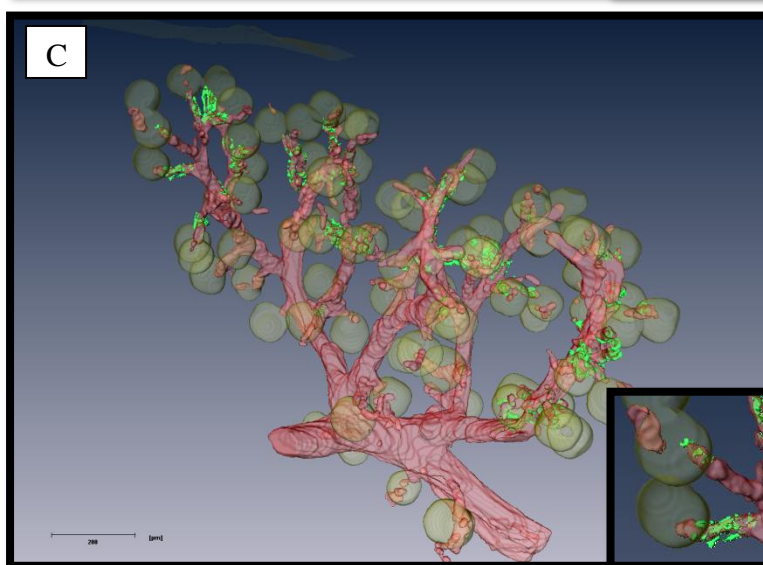
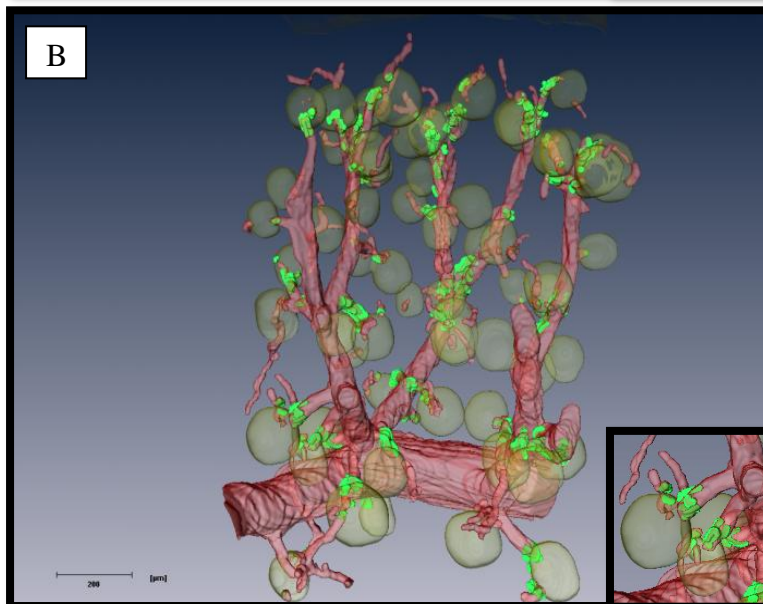
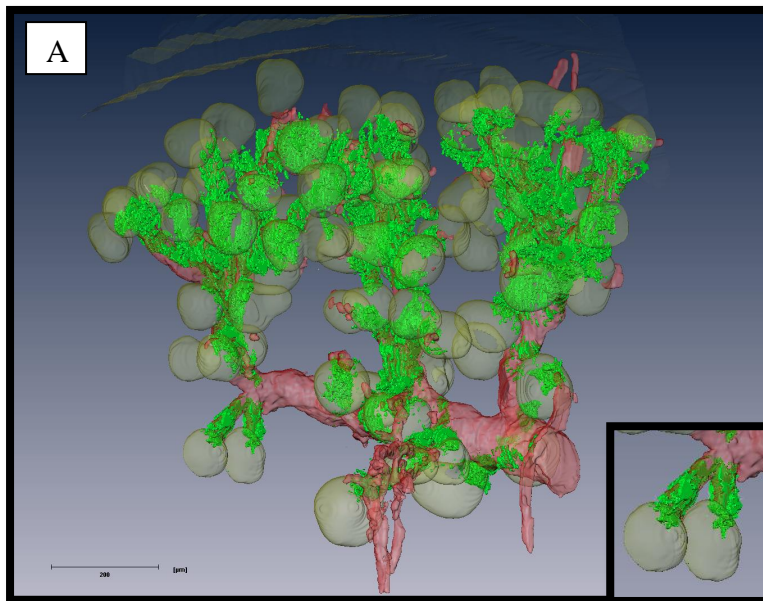


Abb. 3.16: 3D-Rekonstruktionen von drei verschiedenen AT_{1a}-Knockout-Modellen.

Gesamt- + Detailansicht.

A: AT_{1a}-Knockout + LS

B: AT_{1a}-Knockout + LS + L-Name

C: AT_{1a}-Knockout + L-Name

Vergleicht man die Gefäßbäume der AT_{1a} -Knockout-Mäuse im 3D-Modell, so weisen sie alle die bereits beschriebene veränderte Morphologie auf. Darüber hinaus zeigt sich, dass eine alleinige Behandlung der Versuchstiere mit L-Name, ohne vorherige Stimulation, eine geringgradig niedrigere Reninkonzentration zur Folge hat, als es bei jenen Tieren der Fall ist, die zusätzlich eine Low-Salt-Diät erhalten haben (Abb. 3.16).

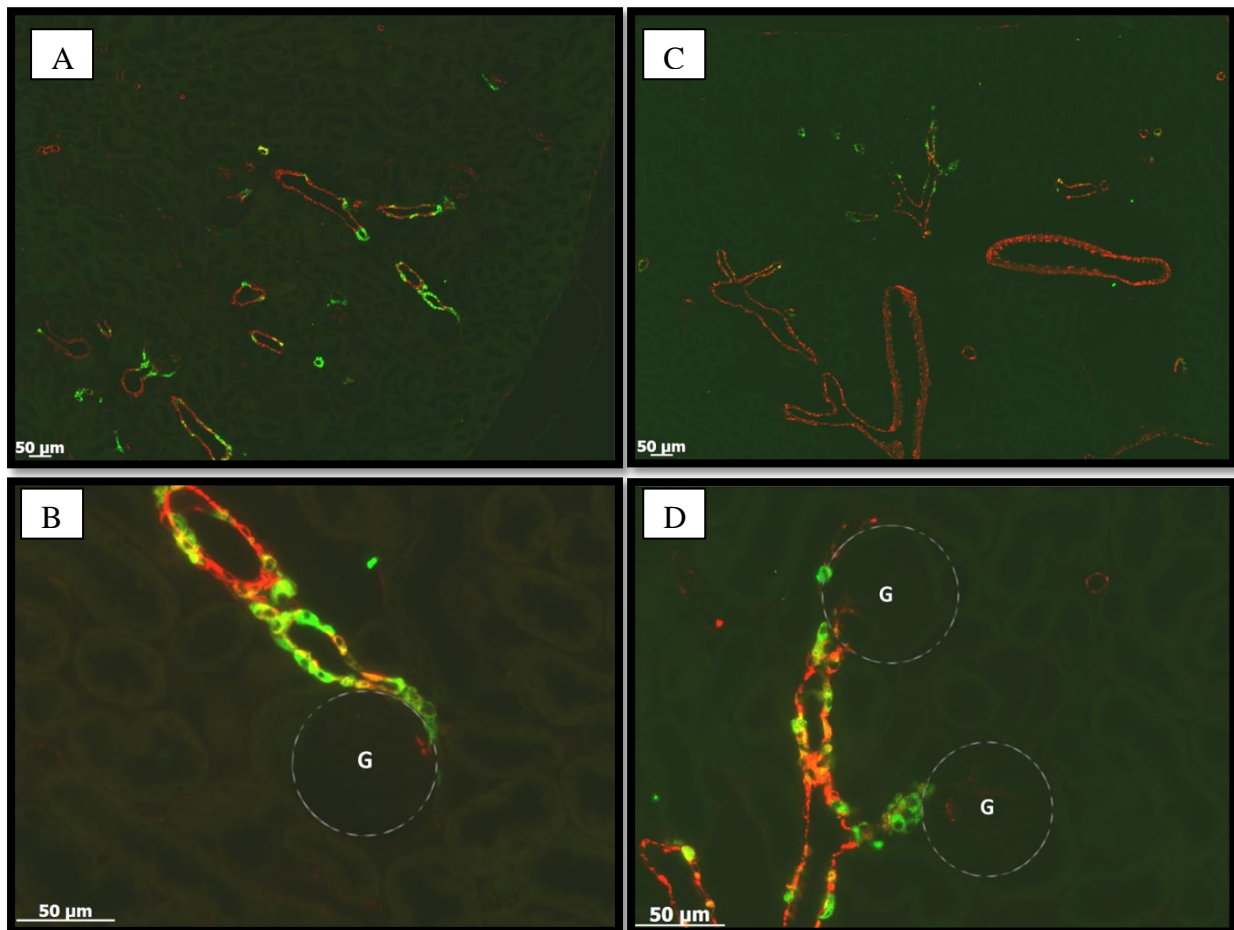


Abb. 3.17: histologische Darstellungen verschiedener AT_{1a} -Knockout-Mäuse

- A:** [Übersichtsbild]: AT_{1a} -Knockout + LS + L-Name in 100facher Vergrößerung
- B:** [Detailansicht]: AT_{1a} -Knockout + LS + L-Name in 400facher Vergrößerung
- C:** [Übersichtsbild]: AT_{1a} -Knockout + L-Name in 100facher Vergrößerung
- D:** [Detailansicht]: AT_{1a} -Knockout + L-Name in 400facher Vergrößerung

Vergleicht man die histologischen Darstellungen der AT_{1a} -Knockout-Mäuse, so zeigt sich eine geringgradig stärkere Renin-Immunfluoreszenz in demjenigen Tier, welches neben L-Name zusätzlich eine Low-Salt-Diät erhalten hatte. Die alleinige Gabe des NOS-Inhibitors ohne vorherige Stimulation führt demnach zu einer niedrigeren Reninkonzentration als die simultane Behandlung mit LS und L-Name (Abb. 3.17).

Nichtsdestotrotz lässt sich auch in denjenigen AT_{1a} -Knockouts, welche ausschließlich mit L-Name behandelt wurden, beobachten, dass reninbildende Zellen entlang der gesamten afferenten Arteriole in Erscheinung treten, also nicht nur präglomerulär. Die restlichen Gefäßbaumabschnitte hingegen präsentieren sich frei von reninbildenden Zellen.

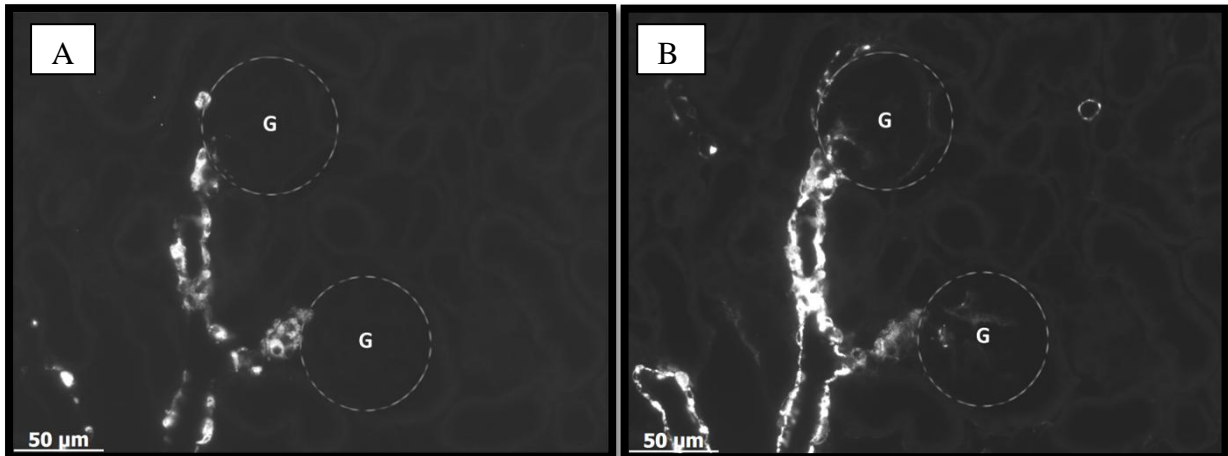


Abb. 3.18: histologische Darstellung des AT_{1a} -Knockout + L-Name in 400facher Vergrößerung

- A:** Renin-Reaktion
- B:** Aktin-Reaktion

Auch in diesen AT_{1a} -Knockout-Modellen zeigt sich eine Kolokalisation von Gefäßmuskelaktin und Renin (Abb.3.18). Dennoch finden sich auch hier vereinzelt reninbildende Zellen, welche den Aktinzellen außen anliegen.

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass der AT_{1a} -Knockout - unabhängig von zugeführten Stimulantien oder Inhibitoren - eine atypische Lokalisation reninbildender Zellen aufweist, welche sich nicht nur am terminalen Ende der afferenten Arteriole finden, sondern entlang des gesamten Vas afferens, teilweise sogar in den Arteriae interlobulares. Darüber hinaus findet man reninbildende Zellen nicht nur in der Media der Gefäße, wo sie die Gefäßmuskelaktinzellen ersetzen, sondern zudem dem Gefäß außen aufsitzend, woraus sich eine Mehrschichtigkeit ergibt. Diese atypisch lokalisierten reninbildenden Zellen werden vermutlich in Folge von Rekrutierungsvorgängen - basierend auf einer metaplastischen Transformation von Renin-Vorläuferzellen - gebildet, mit dem Ziel die Reninkonzentration zu steigern. Des Weiteren lässt sich beim AT_{1a} -Knockout eine deutlich veränderte Gefäßbaummorphologie im Hinblick auf die Dicke und Länge der einzelnen Äste beobachten.

3.2.4 Untersuchungen am Connexin40-defizienten Mausmodell

Frühere und auch aktuelle Studien weisen immer wieder auf die Bedeutung von Connexin40 als entscheidendes Protein bezüglich der Zell-Zell-Verbindungen zwischen reninbildenden Zellen hin. Neben Connexin37 spielt Cx40 somit die größte Rolle als junctionales Protein hinsichtlich der Entwicklung und Funktion renaler reninbildender Zellen.

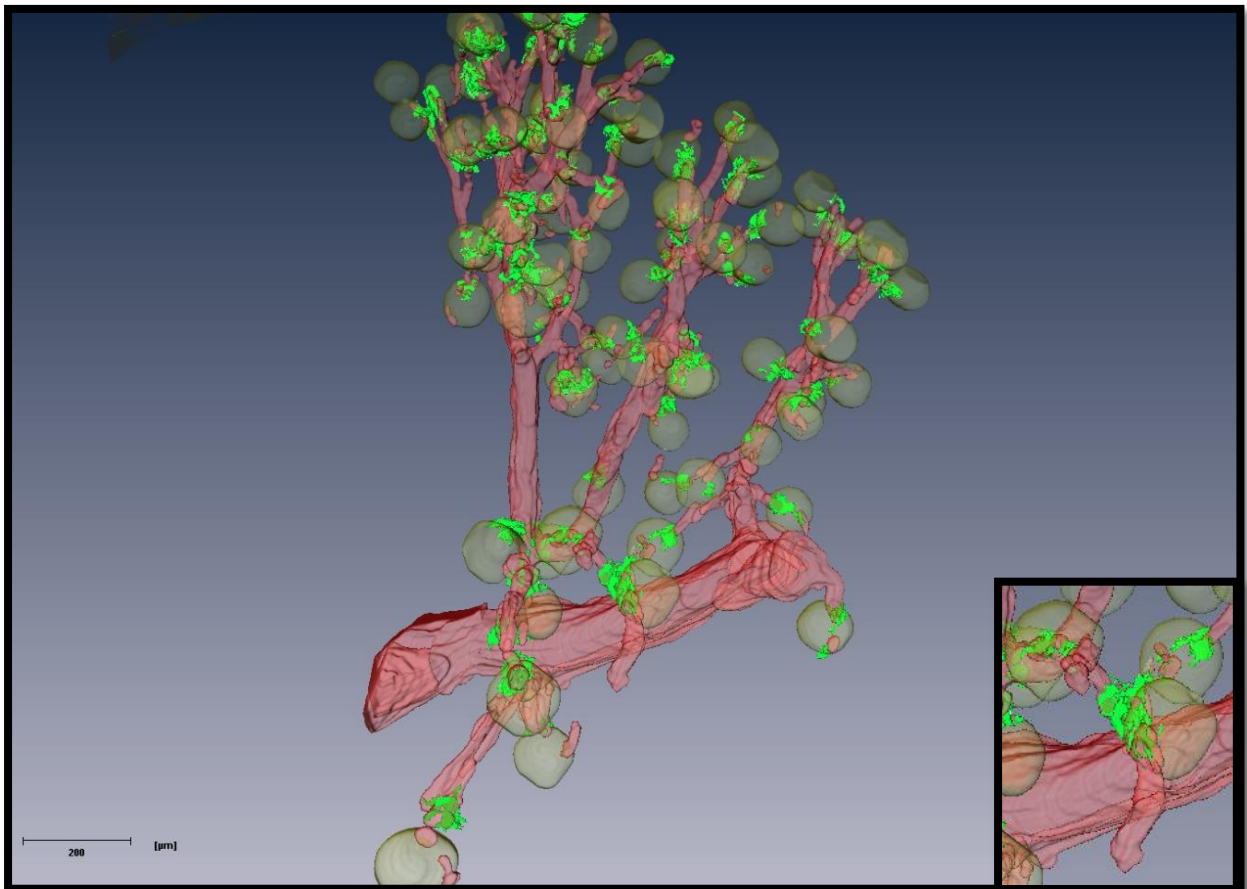


Abb. 3.19: 3D-Rekonstruktion einer Connexin40-defizienten Mauseiere stimuliert mit E/LS. Gesamt- und Detailansicht.

Verglichen mit einer unbehandelten wildtypischen Niere zeigt das Connexin40-defiziente Versuchstier - ebenso wie die bisherigen Mausmodelle - eine deutlich erhöhte Reninkonzentration nach Stimulation des RAAS mittels E/LS. ACE-Inhibition und Salz-getriggerte Macula Densa abhängige Regulationsmechanismen spielen demnach auch beim Cx40-Knockout eine entscheidene Rolle (Abb. 3.19). Die Morphologie des Gefäßbaums zeigt keine auffälligen Besonderheiten, jedoch weichen die reninbildenden Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation von den bis dato unter-

suchten Mausmodellen ab. Reninsynthese findet demnach nicht nur präglomerulär, sondern auch im umgebenden extraglomerulären Mesangium statt (Abb. 3.20). LS/E-getriggerte Rekrutierungsvorgänge erstrecken sich beim Cx40-Knockoutmodell demnach nicht in retrograder Richtung, sondern ektopisch periglomerulär.

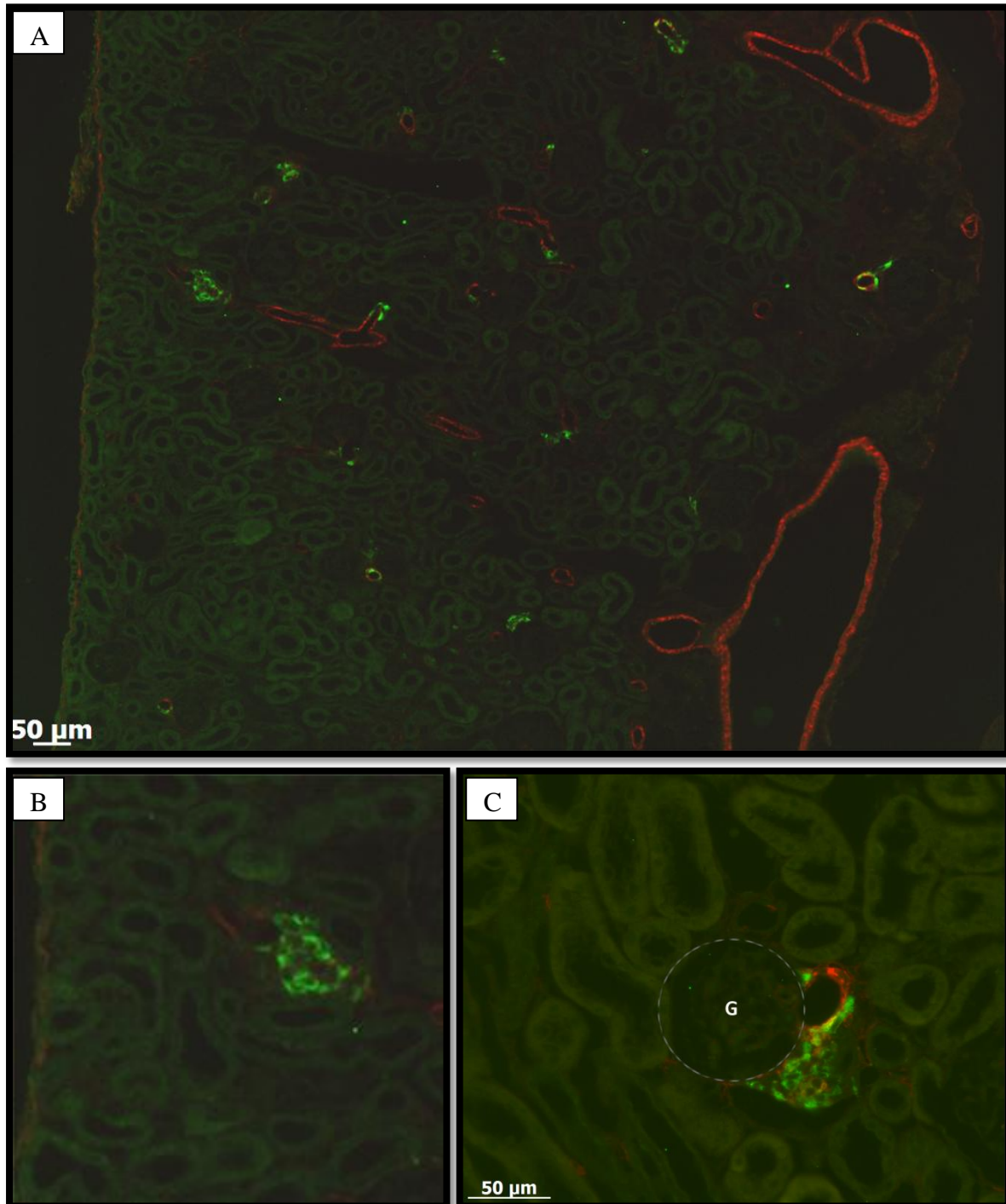


Abb. 3.20: histologische Aufnahmen des Cx40-Knockouts + E/LS.

- A: [Übersichtsbild]: Cx40-Knockout + E/LS in 100facher Vergrößerung.
- B: [Detailansicht]: Cx40-Knockout + E/LS. Ausgewählter Ausschnitt aus A.
- C: [Detailansicht]: Cx40-Knockout + E/LS in 400facher Vergrößerung.

Die histologischen Bilder bestätigen die Annahme, dass im Falle eines Cx40-Knockouts reninbildende Zellen neben ihrer präglomerulären Position auch im extraglomerulären Mesangium anzutreffen sind. Diese Beobachtungen bekräftigen die Ergebnisse früherer Untersuchungen, dass Cx40 eines der entscheidenden Proteine bezüglich der Zell-Zell-Verbindung reninbildender Zellen darstellt. Ein Fehlen dieses junctionalen Proteins führt dementsprechend zur Lockerung dieser Zellkontakte und zum Auftreten reninbildender Zellen in der hier vorliegenden ektopischen Lokalisation.

Vergleicht man die stimulierten Cx40-Knockouts ohne systemische Blockade von NO mit denjenigen, welche zusätzlich mit L-Name behandelt wurden, so ist auch hier eine Abnahme der Reninzellrekrutierung als Folge der NO-Inhibition zu beobachten.

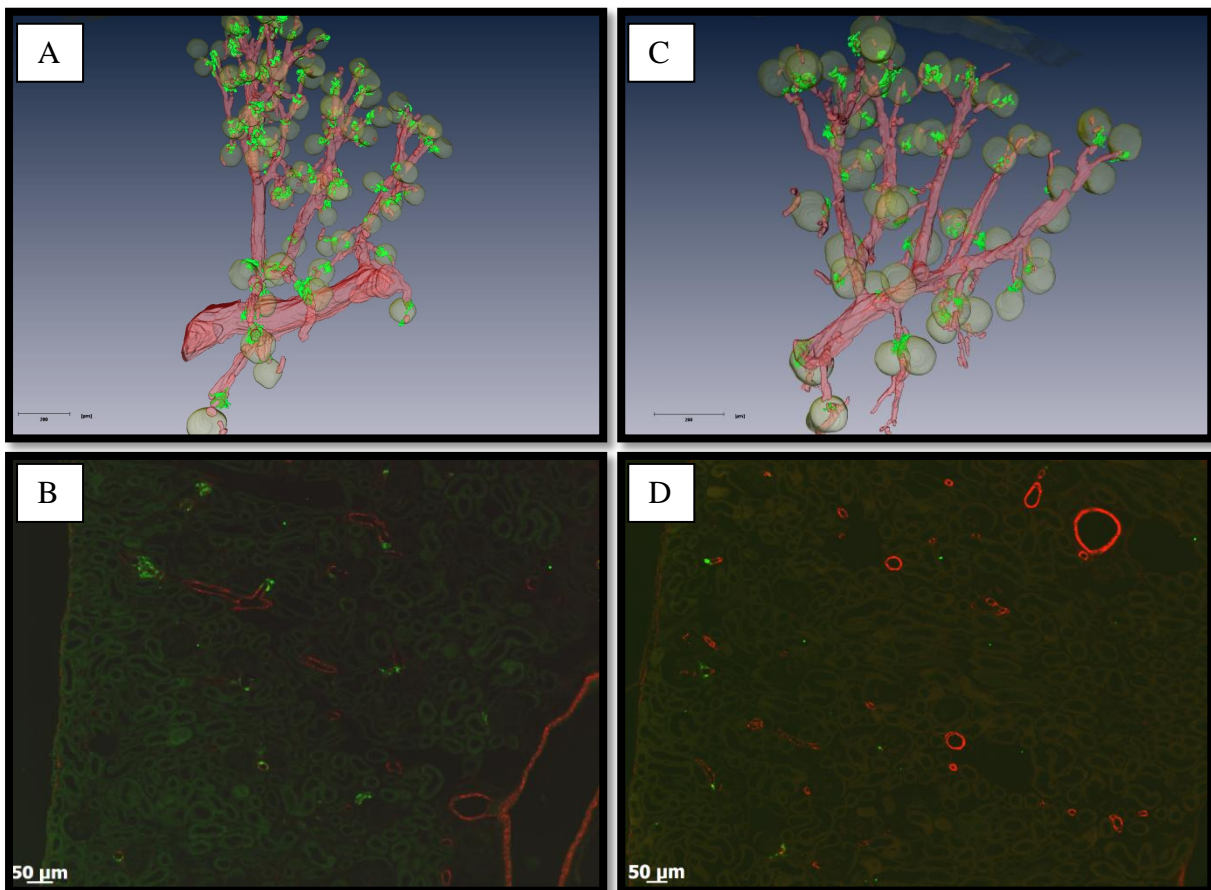


Abb. 3.21: Vergleichende Untersuchungen von Cx40-Knockout Tieren + E/LS mit und ohne L-Name

- A:** 3D-Rekonstruktion Cx40-Knockout + E/LS (3 Wochen)
- B:** [Übersichtsbild]: histologische Darstellung Cx40-Knockout + E/LS in 100facher Vergrößerung
- C:** 3D-Rekonstruktion Cx40-Knockout + E/LS (3Wochen) + L-Name
- D:** [Übersichtsbild]: histologische Darstellung Cx40-Knockout + E/LS + L-Name in 100facher Vergrößerung

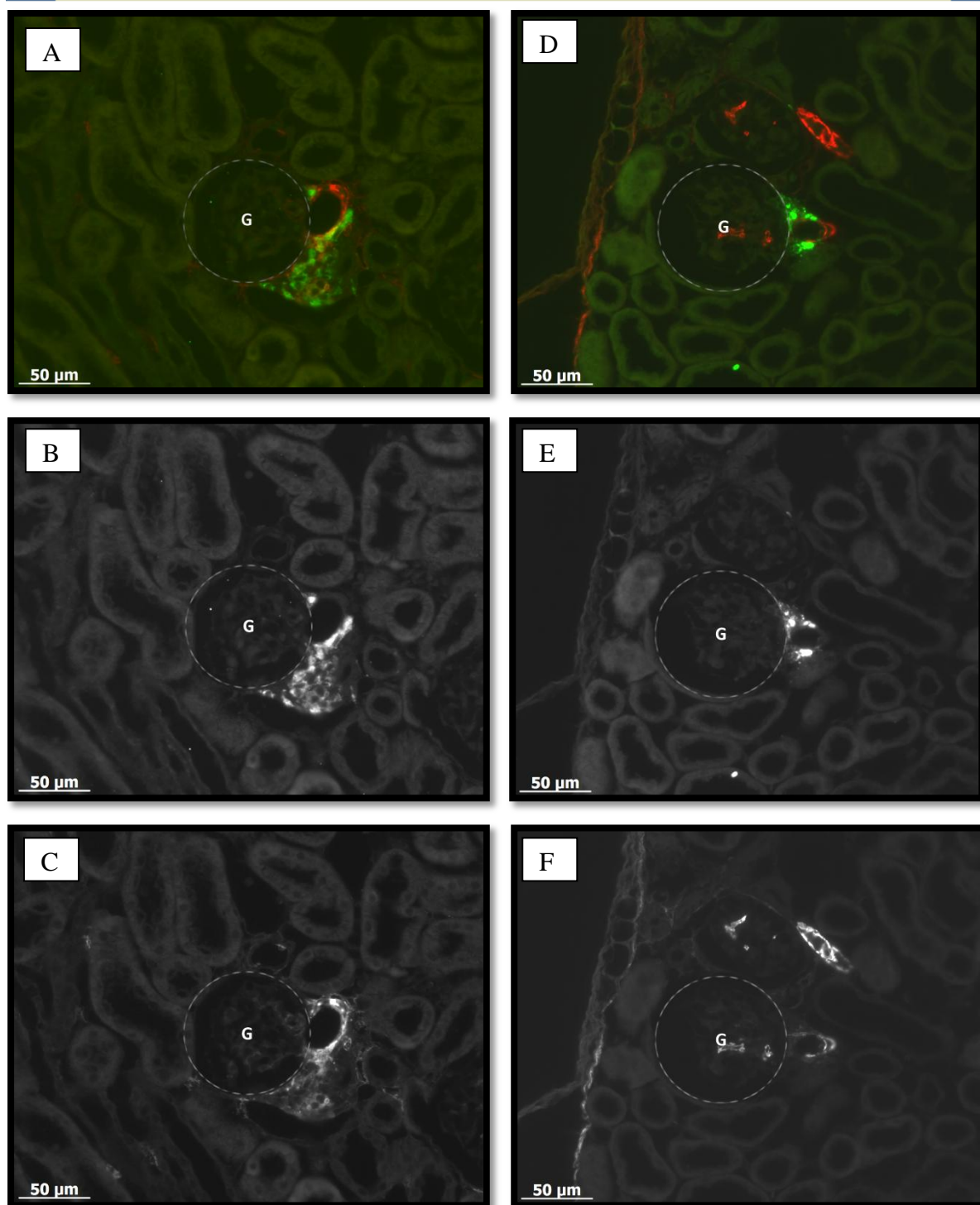


Abb. 3.22: histologische Darstellung Cx40-Knockout + E/LS mit und ohne L-Name in 400facher Vergrößerung

- A:** [Detailansicht]: Cx40-Knockout + E/LS
- B:** Renin-Einzelreaktion Cx40-Knockout + E/LS
- C:** Aktin-Einzelreaktion Cx40-Knockout + E/LS
- D:** [Detailansicht]: Cx40-Knockout + E/LS + L-Name
- E:** Renin-Einzelreaktion Cx40-Knockout + E/LS + L-Name
- F:** Aktin-Einzelreaktion Cx40-Knockout + E/LS + L-Name

Die histologischen Bilder unterstreichen die atypische Position der reninbildenden Zellen im Cx40-Knockout. Auch dieser Genotyp reagiert auf die Gabe des NO-Inhibitors L-Name mit einer verminderten Anzahl reninsynthetisierender Zellen, was sich im extraglomerulären Mesangium eindeutig nachvollziehen lässt und mit einer verminderten Reninkonzentration einhergeht (Abb. 3.22).

Zusammenfassend ist demnach festzuhalten, dass eine Stimulation des RAAS mit Hilfe von LS/E bei allen hier untersuchten Tieren mit einer gesteigerten Rekrutierung reninbildender Zellen in retrograder Richtung, bzw. bei den Cx40-defizienten Versuchstieren in ektopischer Position, vergesellschaftet ist. Derartige Rekrutierungsvorgänge konnten bei den eNOS-defizienten Tieren jedoch nicht beobachtet werden. Zwar weisen diese eine Zunahme reninbildender Zellen in präglomerulärer Position im Sinne eines Clusters auf, eine retrograde Reninzellrekrutierung entlang der afferente Arteriole konnte hingegen nicht beobachtet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-Name bei allen Genotypen - mit Ausnahme der eNOS-Knockoutmäuse – mit einer signifikant geringeren Rekrutierung reninbildender Zellen einhergeht. Die eNOS-defizienten Tiere hingegen zeigten trotz L-Name-Substitution keinerlei Veränderung bezüglich ihres Reninexpressionsmusters.

Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass endothelial gebildetes NO für die - der Rekrutierung zugrundeliegenden - Transformationsvorgänge von entscheidender Bedeutung ist. Zwar findet sich im eNOS-Knockout durch E/LS eine Stimulation der Reninsynthese, diese ist jedoch auf präglomeruläre Clusterbildung und nicht auf eine Rekrutierung im eigentlichen Sinne zurückzuführen. Welche Mediatoren in diesem Falle für die Steigerung der Reninfreisetzung verantwortlich sind, bleibt demnach ungewiss.

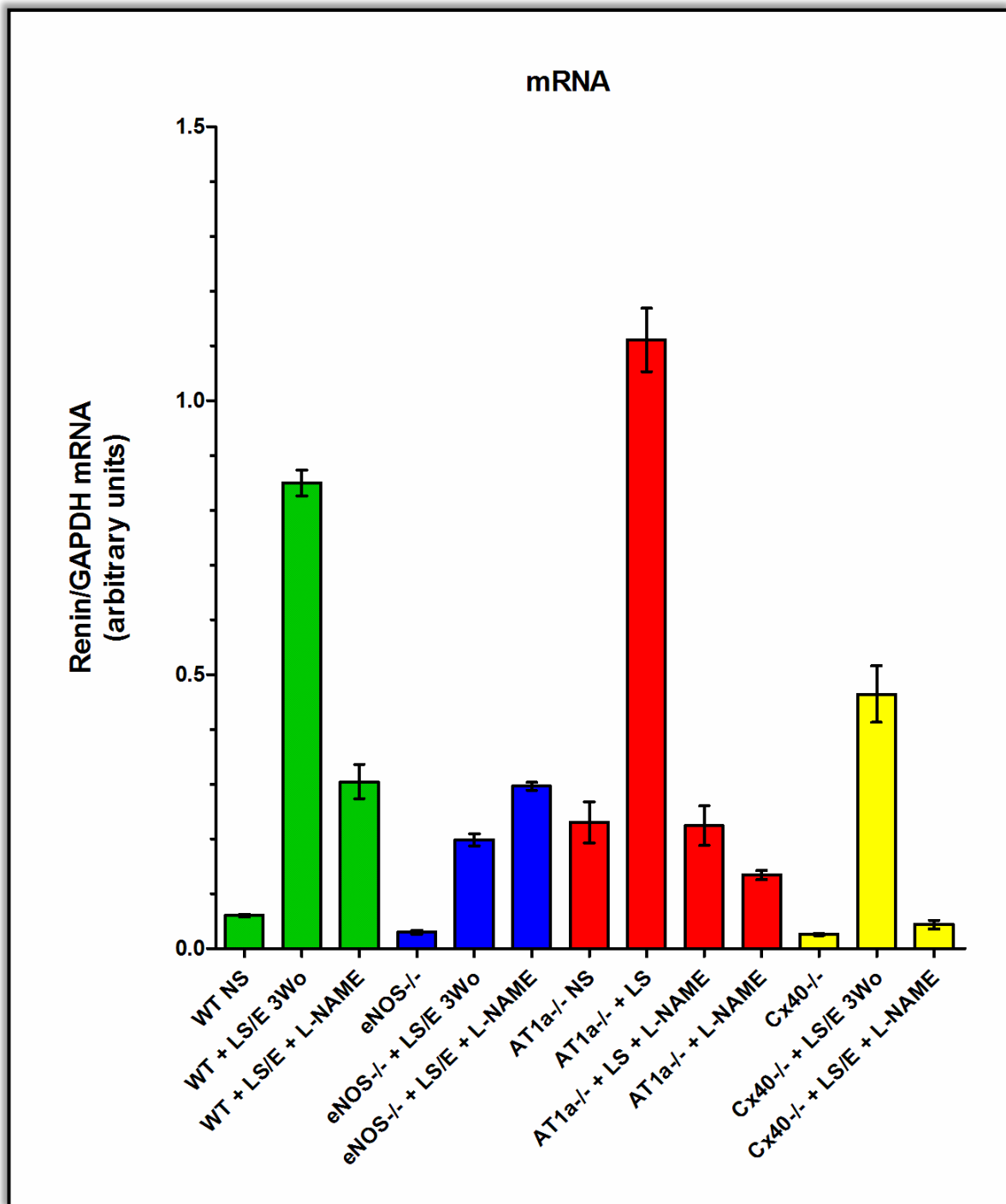
3.2.5 Renin-mRNA-Analysen

Abb. 3.23: Graphik zur Darstellung des mRNA-Gehalts der verschiedenen Genotypen: Eine Verminderung des mRNA-Gehalts nach L-Name-Substitution zeigt sich bei allen Versuchstieren mit Ausnahme der eNOS-defizienten Tiere.

Zur quantitativen Bestimmung der Reninkonzentration wurde parallel zur dreidimensionalen Bearbeitung der verschiedenen Genotypen eine Analyse der Renin-mRNA-Werte durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse (Abb. 3.23) bekräftigen die Resultate, welche bereits mittels der computergesteuerten Rekonstruktionsverfahren geliefert werden konnten.

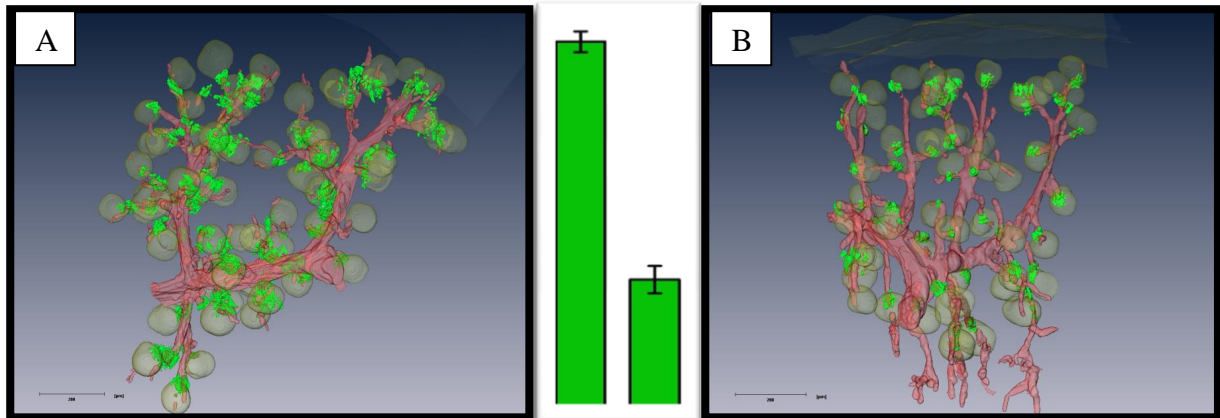


Abb. 3.24: **A:** 3D-Rekonstruktion WT + LS/E 3 Wochen; **B:** 3D-Rekonstruktion WT + LS/E 3 Wochen + L-Name mit graphischer Darstellung des Renin-mRNA-Gehalts (Ausschnitt aus Abb. 3.23): Die Gabe von L-Name hat einen signifikant niedrigeren Renin-mRNA-Gehalt zur Folge.

Eine durch Nidrigsalz-Diät und ACE-Hemmung getriggerte Stimulation des RAAS zeigt sich in der mRNA-Analyse des Wildtypen durch eine Zunahme des mRNA-Gehaltes um den Faktor 14 und ist damit hoch signifikant. Jene Versuchstiere jedoch, welche zusätzlich den NO-Inhibitor L-Name erhalten hatten, zeigten hingegen eine nur 5fache Erhöhung des mRNA-Gehaltes (Abb. 3.23), so dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden hier dargestellten Mausmodellen bezüglich ihrer Reninkonzentration beobachten lässt (Abb. 3.24).

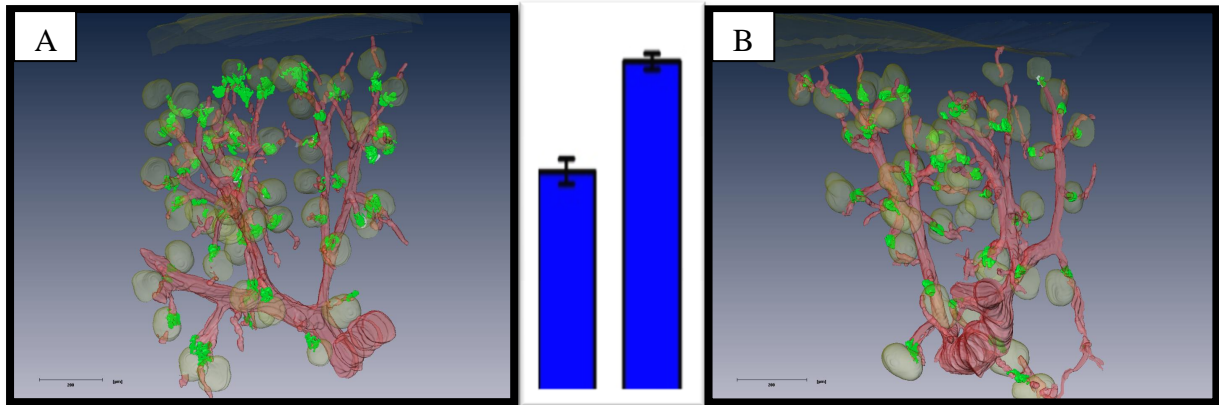


Abb. 3.25: **A:** 3D-Rekonstruktion eNOS-Knockout + E/LS 3 Wochen; **B:** 3D-Rekonstruktion eNOS-Knockout + E/LS 3 Wochen + L-Name mit graphischer Darstellung des Renin- mRNA-Gehaltes (Ausschnitt aus Abb. 3.23): Eine signifikante Veränderung des Renin-mRNA-Gehaltes ist nicht zu beobachten.

Derartige Resultate können beim eNOS-defizienten Modell nicht erzielt werden. Zwar führt die Gabe von E/LS auch bei diesem Genotyp zur Stimulation des RAAS und einer damit verbundenen Zunahme der mRNA-Werte etwa um den Faktor 7 (siehe Abb. 3.23), wobei dieses Ergebnis als nicht signifikant bewertet werden muss. Darüber hinaus führt die zusätzliche Gabe von L-Name jedoch zu keiner bedeutenden Veränderung der mRNA-Konzentration (siehe Abb. 3.25). Anders als bei den übrigen Versuchstieren geht hier die NO-Blockade sogar mit einer – wenn auch nicht signifikanten – Zunahme des mRNA-Gehaltes einher. Eine Beobachtung, die bereits bei der zweidimensionalen histologischen Darstellung des eNOS-Knockoutmodells gemacht werden konnte. Der Verdacht, dass endothelial gebildetes NO im Zusammenhang mit der Reninzellrekrutierung steht, wird somit auch durch die mRNA-Analyse bekräftigt.

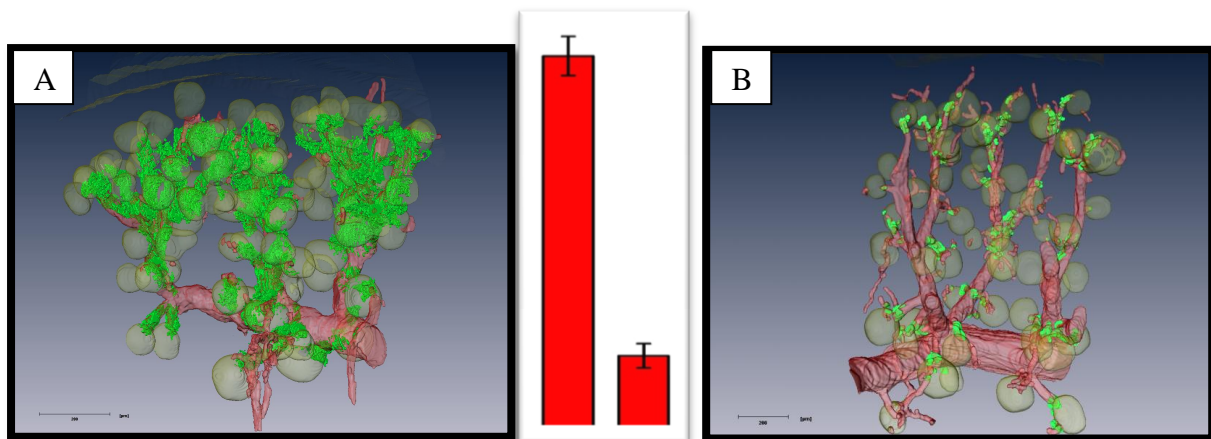


Abb. 3.26: **A:** 3D-Rekonstruktion AT_{1a} -Knockout + LS 3 Wochen; **B:** 3D-Rekonstruktion AT_{1a} -Knockout + LS 3 Wochen + L-Name mit graphischer Darstellung des Renin-mRNA-Gehaltes (Ausschnitt aus Abb. 3.23): Die Gabe von L-Name hat einen signifikant niedrigeren Renin-mRNA-Gehalt zur Folge.

Auch bei der Betrachtung der AT_{1a} -Knockout-Tiere zeigt sich ein eindeutiger Einfluss von L-Name auf die Reninkonzentration (Abb. 3.26). Hier liefern bereits die unbehandelten Tiere höhere mRNA-Werte als die wildtypischen Referenztiere, was auf den Mangel des ANG II-vermittelten negativen Feedbacks sowie den fehlenden vasokonstriktorischen Effekt zurückzuführen ist. Eine Stimulation dieses Knockouts mittels einer LS-Diät bewirkt eine signifikante Zunahme des Renin-mRNA-Gehaltes, etwa um den Faktor 5, so wie es bereits durch die 3D-Rekonstruktionen angenommen werden konnte. Im Vergleich zum WT-NS-Modell hat der stimulierte AT_{1a} -Knockout eine nahezu 19fach höhere mRNA-Konzentration.

Wird diesem Genotyp zusätzlich zur Low-Salt-Diät der NOS-Blocker L-Name verabreicht, so zeigt sich keine erkennbare Erhöhung des Renin-mRNA-Gehaltes im Vergleich zum NS- AT_{1a} -Knockout (Abb. 3.23). Eine hoch signifikante Differenz zwischen den stimulierten AT_{1a} -Knockouts ohne und denjenigen mit L-Name konnte auf diese Art und Weise nachgewiesen werden. Diejenigen Versuchstiere, welche ausschließlich L-Name und keine spezielle Diät erhalten hatten, lieferten bei der mRNA-Untersuchung einen Mittelwert, welcher noch geringer ist, als es bei den unbehandelten AT_{1a} -Knockouts zu beobachten ist.

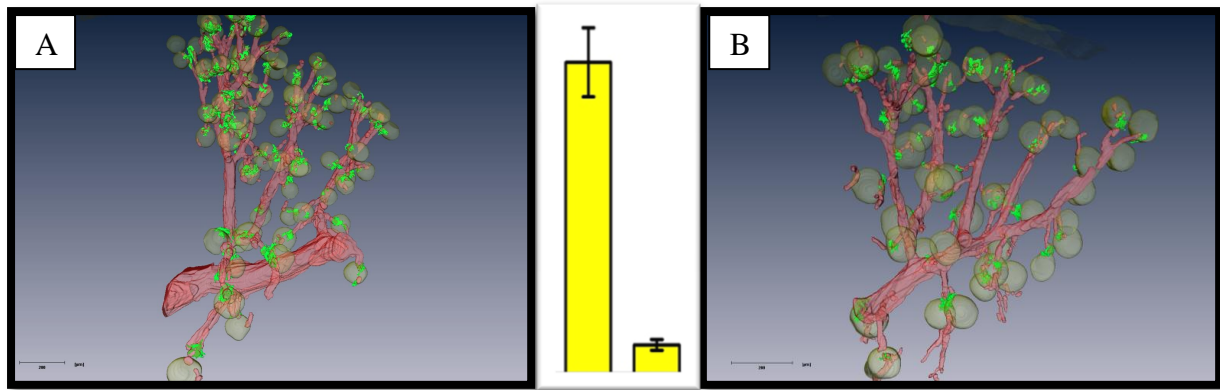


Abb. 3.27: **A:** 3D-Rekonstruktion Cx40-Knockout + LS/E 3 Wochen; **B:** Cx40-Knockout + LS/E 3 Wochen + L-Name mit graphischer Darstellung des Renin-mRNA-Gehaltes (Ausschnitt aus Abb. 3.23): Die Gabe von L-Name hat einen signifikant niedrigeren Renin-mRNA-Gehalt zur Folge.

Das Cx40-defiziente Tiermodell weist eine geringere Renin-mRNA-Ausgangskonzentration auf, als es beim WT-NS-Tier der Fall ist (Abb. 3.23). Dennoch erweist sich auch dieser Genotyp als hoch ansprechbar auf die Gabe von E/LS. Eine Zunahme des mRNA-Gehaltes um das nahezu 18fache ist nach derartiger Stimulation zu beobachten und zeigt, dass Macula Densa-getriggerte Regulationsfaktoren sowie ACE-Inhibition auch im Cx40-defizienten Tier Einfluss auf die Reninsynthese haben. Im Vergleich zum WT-NS-Tier hat der stimulierte Cx40-Knockout einen ca. 8fach höheren Renin-mRNA-Gehalt.

Verabreicht man den Tieren zudem einen NO-Blocker, so ist eine eindeutige Zunahme des Renin-mRNA-Gehaltes im Vergleich zum Cx40^{-/-} NS-Genotypen nicht mehr festzustellen. Ähnlich wie die anderen Versuchstiere, ist demnach auch beim Cx40-Knockout ein hoch signifikanter Unterschied der beiden anbehandelten Mausmodelle bezüglich ihrer mRNA-Konzentration zu beobachten, je nachdem ob eine zusätzliche Gabe von L-Name stattgefunden hat oder nicht (Abb. 3.27).

Bezogen auf den Reningehalt bzw. die Reninzellrekrutierung der einzelnen Versuchstiere lassen die Resultate der mRNA-Analysen folglich einen ähnlichen Schluss zu wie die histologischen und computergesteuerten Untersuchungen der verschiedenen Genotypen. Salzrestriktion und ACE-Hemmung führen bei allen Versuchstieren zu einer Zunahme des Reningehaltes in unterschiedlichem Ausmaß. Die simultane systemische NO-Inhibition mittels L-Name bewirkt darüber hinaus bei allen Mausmodellen, mit Ausnahme der eNOS-Knockout-Tiere, eine hoch signifikant verminderte Renin-mRNA-Konzentration im Vergleich zu ihren Referenztieren. Die

eNOS-defizienten Versuchstiere zeigten in Folge der NO-Blockade sogar eine geringgradige - wenn auch nicht signifikante - Erhöhung ihrer Reninkonzentration.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Einfluss von NO auf die Reninzellrekrutierung um eine direkte Wirkung des Moleküls auf die Zellen des Juxtaglomerulären Apparates handelt oder ob nicht vielmehr eine NO-getriggerte Veränderung des Blutdrucks die Umgestaltung des Reninexpressionsmusters bewirkt, wurden zusätzlich die Blutdruckparameter der verschiedenen Mausmodelle ermittelt.

3.2.6 Blutdruckveränderungen unter dem Einfluss des NO-Inhibitors L-Name

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Zu- bzw. Abnahme der Reninzellrekrutierung und einer Veränderung des Blutdrucks herauszuarbeiten, wurden die systolischen Blutdruckwerte der einzelnen Versuchstiere mit Hilfe einer um den Schwanz der Mäuse befestigten Blutdruckmanschette gemessen und im Anschluss in Relation zueinander gesetzt. Dabei ist in jedem Falle zu berücksichtigen, dass diese Methode möglichen äußeren Störfaktoren unterworfen ist, worunter vor allem der Erregung und Agitiertheit der Mäuse während der Messung Bedeutung zukommt. Durch Adaption der Mäuse an die Umgebung wurde dabei versucht, jenen Faktoren bestmöglich entgegen zu wirken (Material und Methoden 2.2.4).

Basierend auf den Resultaten der Blutdruckmessungen ergibt sich ein Hinweis darauf, dass die Gabe von L-Name bei chronisch stimuliertem RAAS eine deutliche Blutdrucksteigerung zur Folge hat, was mit Ausnahme der eNOS-defizienten Mäuse bei allen Versuchstieren, deren Messergebnisse im Folgenden aufgeführt sind, zu beobachten war (Abb. 3.28).

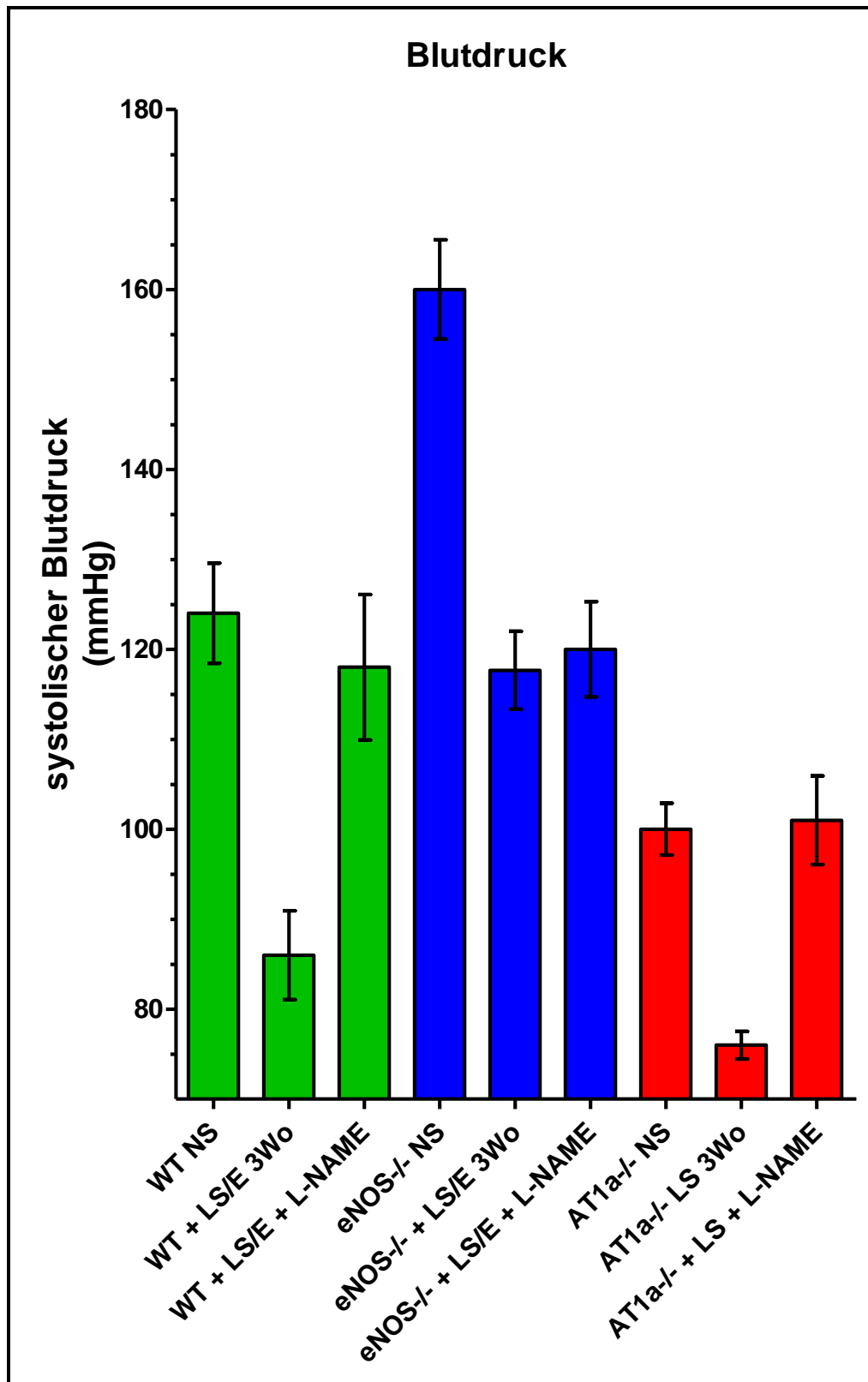


Abb. 3.28: Graphik zur Darstellung der systolischen Blutdruckparameter verschiedener Genotypen: Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung des Blutdrucks nach L-Name-Gabe beim Wildtypen sowie bei den AT_{1a}-Knockouttieren. Die Blutdruckwerte des eNOS-defizienten Modells hingegen zeigen keine signifikanten Veränderungen nach L-Name-Substitution (Die Blutdruckwerte des Cx40-Knockout-Modells wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt).

Vergleicht man die systolischen Blutdruckparameter mit den Ergebnissen der Renin-mRNA-Analyse, so wird deutlich, dass sich der Blutdruck reziprok zum Renin-mRNA-Gehalt verhält.

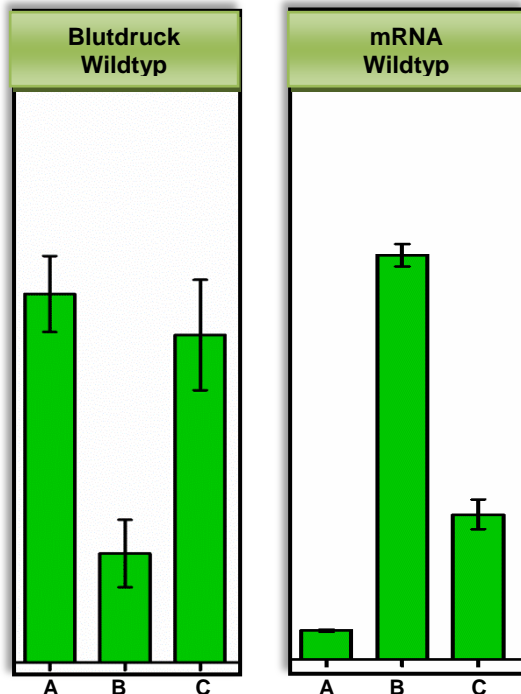


Abb. 3.29: Graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des Wildtyps (Ausschnitt aus Abb. 3.28 und 3.23): Eine reziproke Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-mRNA lässt sich bei allen drei Versuchstieren herstellen.

A: WT NS

B: WT + LS/E 3 Wochen

C: WT + LS/E + L-Name

Der Blutdruck der unbehandelten wildtypischen Versuchstiere liegt bei einem Mittelwert von ca. 124mmHg. Nach chronischer Stimulation des RAAS via LS/E lässt sich eine Abnahme des systolischen Blutdrucks um ca. 31% auf einen Mittelwert von 86mmHg beobachten, wohingegen bei zusätzlicher Substitution von L-Name nur eine geringgradige Blutdrucksenkung um ca. 5% - auf einen Mittelwert von ca. 118mmHg - zu messen ist (Abb. 3.28). Die gleichzeitige Betrachtung der zugehörigen Renin-mRNA-Parameter veranschaulicht die wechselseitige Relation zwischen den beiden Faktoren. Es zeigt sich demnach als Folge der LS/E-Gabe eine hoch signifikante Blutdrucksenkung bei gleichzeitiger Zunahme der Renin-mRNA-Konzentration, während im Vergleich dazu die mit L-Name behandelte Versuchstiere nur eine geringgradige Verminderung der Blutdruckwerte sowie eine nur geringe Zunahme des Renin-mRNA-Gehaltes aufweisen (Abb. 3.29).

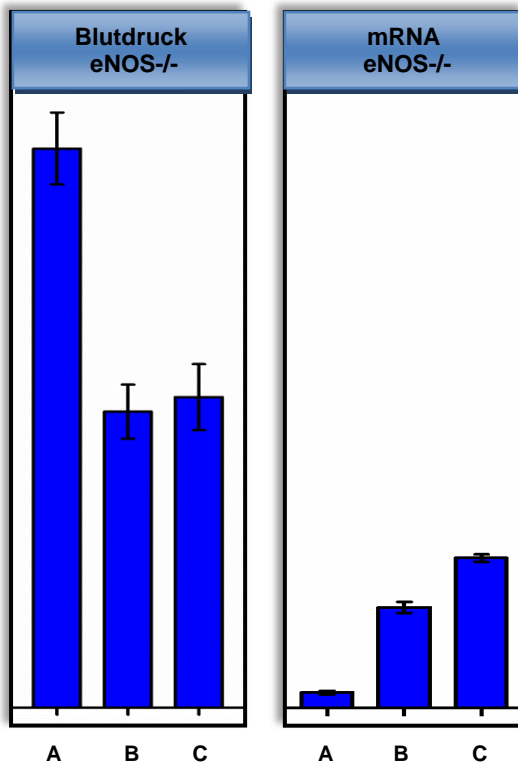


Abb. 3.30: Graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des eNOS-defizienten Genotyps (Ausschnitt aus Abb. 3.28 und 3.23). Eine bedingt reziproke Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-mRNA lässt sich bei allen drei Versuchstieren herstellen.

A: eNOS-/- NS

B: eNOS-/- + LS/E 3 Wochen

C: eNOS-/- + LS/E + L-Name

Das eNOS-defiziente Tier weist im Vergleich zum WT-NS-Tier signifikant höhere Blutdruckwerte auf. Mit einem Mittelwert von ca. 160mmHg ergibt sich ein um etwa 29% höherer systemischer Druck. Wie beim Wildtypen führt auch hier die chronische Stimulation des RAAS mittels LS/E zu einer Abnahme des Blutdrucks um ca. 26% auf einen Mittelwert von 118mmHg. Die simultane Gabe des NO-Inhibitors L-Name liefert beim eNOS-Knockout in etwa die gleichen Ergebnisse wie das stimulierte Modell ohne NO-Block. Ein Wert von ca. 120mmHg konnte hier ermittelt werden. Somit zeigt sich bezüglich des Blutdrucks kein relevanter Unterschied zwischen den beiden stimulierten eNOS-Knockouttieren, unabhängig davon ob sie zusätzlich mit L-Name behandelt wurden oder nicht (Abb. 3.28). Betrachtet man parallel dazu die gemessenen Renin-mRNA-Werte, so zeigt sich auch hier eine weitestgehend wechselseitige Beziehung. Eine Reizung des RAAS geht somit mit einer hoch signifikanten Verminderung des Blutdrucks sowie gleichzeitiger Erhöhung der Renin-mRNA-Konzentration einher. Bei den zusätzlich mit L-Name behandelten Versuchstieren wird diese Relation etwas undeutlicher. Zwar zeigt das mit dem NO-Blocker behandelte Modell eine geringgradige Erhöhung des Renin-mRNA-Gehaltes, eine Veränderung des Blutdrucks bleibt jedoch aus (Abb. 3.30). Allerdings ist hinzuzufügen, dass sich die hier dargestellte Differenz der mRNA-Werte als nicht signifikant erweist. Demnach ist festzuhalten, dass eine systemische Inhibition von

NO mittels L-Name sowohl auf den Blutdruck als auch auf den Renin-mRNA-Gehalt der eNOS-defizienten Tiere keinen signifikanten Einfluss ausübt. Diese Beobachtung lässt sich darüber hinaus mit den histologischen sowie den dreidimensionalen Darstellungen in Einklang bringen und betont die Bedeutung von endothelial gebildetem NO für die Rekrutierung reninbildender Zellen.

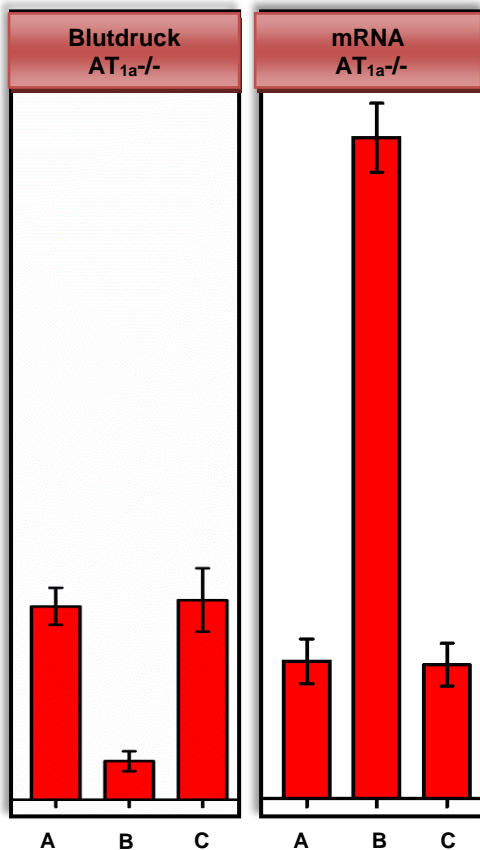


Abb. 3.31: Graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des AT_{1a}-Knockouts (Ausschnitt aus Abb. 3.28 und 3.23). Eine reziproke Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-mRNA lässt sich bei allen drei Versuchstieren herstellen.

A: AT_{1a}^{-/-} NS

B: AT_{1a}^{-/-} + LS 3 Wochen

C: AT_{1a}^{-/-} + LS 3 Wochen + L-Name

Das AT_{1a}-Knockoutmodell weist mit einem Mittelwert von ca. 100mmHg einen im Vergleich zum WT-NS-Tier um ca. 19% geringeren systolischen Blutdruck auf. Bei chronischer Reizung des RAAS mittels LS ergibt sich auch bei diesem Genotypen eine signifikante Verminderung dieses Ausgangswertes um etwa 24% auf 76mmHg. Die zusätzliche Substitution von L-Name wiederum bewirkt – ähnlich wie beim Wildtypen – keine signifikante Änderung des Drucks im Vergleich zum AT_{1a}-NS-Tier. Mit einem Mittelwert von ca. 101mmHg erreicht der mit L-Name behandelte AT_{1a}-Knockout somit annähernd das Ausgangsniveau der unbehandelten Referenztiere (Abb. 3.28). Die systemische Blockade von NO übt demzufolge einen hoch signifikanten Einfluss auf das chronisch stimulierte RAAS des AT_{1a}-Knockouts aus, indem es einer Blutdrucksenkung entgegenwirkt. Betrachtet man die zugehörigen

Renin-mRNA-Werte, so ergibt sich auch hier eine inverse Beziehung zwischen Blutdruck und mRNA-Gehalt. Eine chronische Stimulation des RAAS geht demnach mit einer hoch signifikanten Verminderung des systemischen Drucks sowie einer Erhöhung der Renin-mRNA-Konzentration einher. Nach Gabe von L-Name zeigt sich der Blutdruck bei gleichzeitiger Verminderung des Renin-Gehaltes hingegen wieder deutlich erhöht (Abb. 3.31).

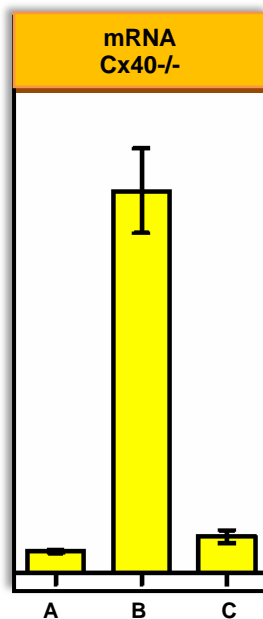


Abb. 3.32: Graphische Darstellung der Renin-mRNA-Konzentration des Cx40-defizienten Genotyps. Eine reziproke Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-mRNA-Gehalt wäre zu erwarten.

A: Cx40^{-/-} NS

B: Cx40^{-/-} + LS/E 3 Wochen

C: Cx40^{-/-} + LS/E 3 Wochen + L-Name

Die Blutdruckparameter der Cx40-defizienten Mäuse wurden in diesem Versuchsansatz nicht bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine deutliche wechselseitige Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-mRNA-Gehalt zu beobachten ist. So sind hohe Blutdruckwerte mit niedrigen mRNA-Konzentrationen vergesellschaftet und umgekehrt. Darüber hinaus konnte dargelegt werden, dass eine systemische NO-Blockade eine Beeinträchtigung des blutdrucksenkenden Effekts einer Niedrigsalz-Diät in Kombination mit ACE-Hemmung zur Folge hat. Während eine chronische Stimulation des RAAS mit einer Verminderung des Blutdrucks einhergeht, bewirkt die zusätzliche Substitution von L-Name die Inhibition dieses Effekts und weist somit höhere Blutdruckparameter bzw. geringere Renin-mRNA-Werte auf. Diese Wirkung konnte bei allen hier dargestellten Versuchstieren beobachtet werden, nicht jedoch beim eNOS-defizienten Genotypen. Dieser lässt auch nach NO-Blockade keine

deutliche Blutdruckveränderung erkennen. Auf diese Weise bestätigt die Auswertung der Blutdruckmessung die Annahme, dass es sich bei der Reninzellrekrutierung um einen Mechanismus handelt, welcher vorwiegend durch endothelial gebildetes NO zustande kommt.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung von NO für die Rekrutierung reninbildender Zellen bei chronischer Stimulation des RAAS

Es ist bekannt, dass die Anzahl der in der Niere lokalisierten reninbildenden Zellen nicht konstant ist, sondern in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimulantien oder Inhibitoren variiert. Die Veränderung der Anzahl reninbildender Zellen der Niere stellt einen bedeutenden Mechanismus bezüglich der Blutdruckregulation dar. Auch wenn die Einzelheiten dieses Phänomens nicht in Gänze geklärt sind, so wird dennoch aufgrund fehlender Proliferations- und Apoptose-Vorgänge von einer metaplastischen Transformation von Renin-Vorläufer- zu reninbildenden Zellen ausgegangen, wobei dieser Ablauf in retrograder Richtung vom vaskulären Pol des Glomerulums zurück zu den Interlobulararterien stattfindet (*Gomez et al., 1990*). Dabei spielen zum einen die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur eine Rolle, welche sich im Sinne einer vaskulären Rekrutierung zu reninbildenden Zellen transformieren können, zum anderen scheinen – Spekulationen zu Folge – auch perivaskuläre Zellen, welche in Verbindung mit dem extraglomerulären Mesangium stehen, Ausgangspunkt reninproduzierender Zellen zu sein (*Sequeira-Lopez et al., 2001*). Derartige Rekrutierungsvorgänge lassen sich etwa in Folge einer Salzrestriktion oder unter hypotonen Bedingungen mit der Folge einer renalen Minderperfusion beobachten. Salzsubstitution und Hypertonie hingegen wirken der Rekrutierung entgegen und vermögen eine Rückbildung von reninbildenden Zellen zu glatten Muskelzellen (*Barajas, 1979; Taugner et al., 1984*). Auf welche Art und Weise dieser Vorgang getriggert und reguliert wird und welche Faktoren im Einzelnen hierfür verantwortlich sind, ist bisweilen noch ungewiss. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von NO für die Rekrutierung reninbildender Zelle untersucht werden. Da bereits in der Vergangenheit zahlreiche Studien darauf hingewiesen haben, dass NO einen der bedeutendsten Mediatoren bezüglich der Stimulation des RAAS darstellt und damit eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Renin-Signalkaskade sowie der Blutdruckmodulation spielt (*Schricker et al., 1994*), scheint es wahrscheinlich, dass auch der Vorgang der Reninzellrekrutierung unter dem Einfluss von NO geschieht.

Eine chronische Stimulation des RAAS wurde in den durchgeführten Versuchen mit Hilfe einer Nidrigsalz-Diät sowie einer ACE-Inhibition induziert. Darüber hinaus

wurde eine Hälfte der Versuchstiere zusätzlich mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-Name behandelt und die Folgen dieser Maßnahme an wildtypischen, eNOS-defizienten, AT_{1a}-Knockouttieren sowie Cx40-defizienten Mäusen untersucht.

Dabei konnte eine deutlich gesteigerte retrograde Reninzellrekrutierung als Konsequenz einer verringerten Salzzufuhr sowie einer Hypoperfusion in Folge des ACE-Blocks mit Hilfe der histologischen Bilder und vor allem der dreidimensionalen Rekonstruktionen dargestellt werden. Besonders die wildtypischen Mäuse sowie die AT_{1a}-Knockouttiere lassen das retrograde Rekrutierungsverhalten entlang der afferenten Arteriole in Folge der LS/E-Behandlung erkennen. Das Cx40-Knockoutmodell hingegen liefert ein von diesem Schema abweichendes Rekrutierungsmuster. Die metaplastische Transformation geschieht nicht entlang der zuführenden arteriellen Äste, sondern vielmehr ektopisch, im extraglomerulären Mesangium. Es ist demnach anzunehmen, dass nicht nur glatte Muskelzellen, sondern auch Mesangiumszellen als Renin-Vorläuferzellen fungieren, welche sich in Folge einer Stimulation zu reninbildenden Zellen umwandeln können. Des Weiteren unterstreicht dieses Ergebnis die Bedeutung von Cx40 als junctionales Protein, welches hinsichtlich der Zell-Zell-Verbindungen zwischen reninbildenden Zellen eine große Rolle spielt. Ein Fehlen dieses Proteins führt demnach zur Lockerung dieser Zellkontakte und zum Auftreten der reninbildenden Zellen in dieser atypischen periglomerulären Position. Eine Beobachtung, welche auch 2007 von Kurtz et al. in einer diesbezüglichen Arbeit bereits beschrieben wurde.

Während alle hier untersuchten Genotypen auf die stimulatorischen Maßnahmen der Salzrestriktion und ACE-Hemmung mit einem gesteigerten Rekrutierungsverhalten reagierten, ließ sich eine derartige Beobachtung im eNOS-defizienten Tiermodell nicht machen. Die eNOS-Knockouttiere zeigten zwar in Folge der LS/E-Behandlung eine Zunahme der Reninkonzentration, bei Betrachtung der 3D-Rekonstruktionen und histologischen Darstellungen fällt jedoch auf, dass diese Zunahme nicht auf eine gesteigerte Reninzellrekrutierung entlang der afferenten Arteriole zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine Clusterbildung, also eine punktuelle Zunahme der reninbildenden Zellen in präglomerulärer Position. Ob diesem Verhalten möglicherweise autacoider Regulationsfaktoren, wie etwa Prostaglandine, zugrunde liegen, bleibt Gegenstand von Spekulationen. Aufgrund fehlender Rekrutierungsvorgänge im eNOS-Knockout liegt die Schlussfolgerung jedoch nahe, dass NO hinsichtlich dieses Vorgangs von entscheidender Relevanz ist.

Bei allen Genotypen wurde darüber hinaus eine gleichzeitig zur LS/E-Behandlung durchgeführte systemische NO-Blockade mittels des NOS-Inhibitors L-Name durchgeführt und die Ergebnisse dieser Maßnahme mit den Referenztieren verglichen. Dabei zeigte sich ein deutlich inhibitorischer Einfluss von L-Name auf den stimulierenden Effekt einer LS/E-Substitution. An Hand der 3D-Rekonstruktionen sowie der histologischen Bilder kann gezeigt werden, dass die Gabe von L-Name mit einer signifikant verminderten Reninzellrekrutierung vergesellschaftet ist. Diese Beobachtung kann bei allen Versuchstieren gemacht werden, nicht jedoch beim eNOS-defizienten Modell. Dieses weist keinerlei Unterschied hinsichtlich seines Renin-Expressionsmusters auf, unabhängig davon, ob eine NO-Blockade vorliegt oder nicht. Eine Rekrutierung reninbildender Zellen in retrograder Richtung ist demnach beim eNOS-Knockout nicht zu erkennen, lediglich eine durch Stimulation hervorgerufene Clusterbildung, welche auch unter dem Einfluss von L-Name keine Veränderungen aufweist. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem metaplastischen Transformationsmechanismus von Renin-Vorläufer- zu reninbildenden Zellen in der Niere um einen von NO abhängigen Vorgang handelt, wobei endothelial gebildetem NO dabei die größte Bedeutung zuzukommen scheint, wohingegen iNOS und nNOS eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Zur quantitativen Untermauerung dieser Resultate wurde außerdem von allen untersuchten Genotypen eine Renin-mRNA-Analyse durchgeführt, deren Ergebnis sich mit jenem der zwei- und dreidimensionalen Aufarbeitungen in Einklang bringen lässt. Zusätzlich wurden in diesem Ansatz Tiere untersucht, welche eine Ernährung mit normalem Salzgehalt erhalten hatten, um den basalen Renin-mRNA-Wert des jeweiligen Genotyps zu ermitteln. Es zeigt sich eine Zunahme des Renin-mRNA-Gehaltes unterschiedlichen Ausmaßes bei allen Versuchstieren unter dem Einfluss einer Niedrigsalz-Diät sowie ACE-Inhibition. Die simultane L-Name-Substitution führt bei allen Tieren - mit Ausnahme der eNOS-Knockoutmäuse - zu einer signifikant niedrigeren oder fehlenden mRNA-Erhöhung. Die eNOS-defizienten Tiere weisen nach L-Name-Gabe sogar einen geringgradig höheren mRNA-Gehalt auf als diejenigen ohne NO-Block, was die Vermutung zulässt, dass bei Hemmung des NO-Signalweges andere Faktoren, wie etwa Autacoide, bezüglich der Reninsekretion an Bedeutung gewinnen und im Zusammenhang mit der präglomerulären Clusterbildung stehen. Dennoch bestätigen auch die Ergebnisse der mRNA-Analyse die Vermutung, dass NO einen wesentlichen Mediator der Reninzellrekrutierung darstellt.

Nichtsdestotrotz stellt sich die Frage, ob dieser Einfluss durch einen direkten oder indirekten Mechanismus zustande kommt. Frühere Studien tendierten dabei zu der Annahme, dass es sich um einen vom systemischen Blutdruck unabhängigen Prozess handle. So beobachteten Johnson und Freeman 1994, dass eine NO-Blockade auch dann eine Hemmung der Reninfreisetzung zur Folge hat, wenn der Perfusionsdruck der Versuchstiere konstant gehalten wird. Andere Studien wiederum vermuteten, dass NO kontinuierlich in der juxtaglomerulären Region freigesetzt werden könnte, was durch Hypoperfusion (*Schricker et al., 1994*), ANG II-Antagonismus (*Schricker et al., 1995*) oder Natriumrestriktion (*Schricker und Kurtz, 1996*) verstärkt werden könnte und damit auch einen positiven Effekt auf die Reninfreisetzung hätte (*Schricker und Kurtz, 1996*). Die Resultate dieser Arbeit jedoch vermitteln eher den Eindruck, dass der Einfluss von NO bzw. der NO-Inhibition auf das chronisch stimulierte RAAS ein vom Blutdruck abhängiger Mechanismus ist. Die Beobachtung, dass die Substitution von L-Name sowohl in einer signifikanten Erhöhung des Blutdrucks, als auch einer simultanen Verminderung der Renin-mRNA-Werte sowie der computergesteuert semiquantitativ ermittelten Reninkonzentration resultiert, unterstützt diese Annahme. Demnach wäre anzunehmen, dass es die - durch die Hemmung des Vasodilatators NO - bewirkte systemische Blutdrucksteigerung ist, welche den inhibitorischen Effekt auf das mittels E/LS stimulierte RAAS ausübt, wobei dem endothelial gebildetem NO dabei die größte Bedeutung zukommt. Nichtsdestotrotz stellt sich die Frage, inwiefern eine Veränderung des systemischen Blutdrucks eine metaplastische Transformation von Renin-Vorläufer- zu reninbildenden Zellen zu bewirken vermag. Denkbar wäre ein Mechanismus basierend auf einer veränderten Wandspannung der renalen Gefäße bzw. einer von dieser Spannung abhängigen Mediatorfreisetzung. Darüber hinaus könnten Macula Densa-abhängige Regulationsfaktoren diesbezüglich von Relevanz sein. Dabei scheint es jedoch – basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit – unwahrscheinlich, dass nNOS gebildetem NO eine größere Bedeutung im Hinblick auf die Reninzellrekrutierung zukommt. Ein Einfluss von Prostaglandinen, welche durch in der Macula Densa gebildetes COX-2 produziert werden, wäre jedoch vorstellbar, auch wenn frühere Studien darauf hindeuten, dass Prostaglandine im Zusammenhang mit Salzrestriktion eine eher untergeordnete Rolle in Bezug auf die Reninexpression spielen (*Schricker und Kurtz, 1996*).

4.2 Bedeutung von NO bezüglich des Zusammenhangs zwischen Salzaufnahme und Blutdruckschwankungen

Lange Zeit ging man von der Annahme aus, dass erhöhte Salzzufuhr mit einem schlechten Outcome bei chronischer Hypertonie vergesellschaftet sei. Heute weiß man jedoch, dass dies nur bei einem Teil der Patienten der Fall ist, denjenigen nämlich, welche unter einer sogenannten salzempfindlichen Hypertonie leiden. Risikofaktoren für diese Form der Erkrankung scheinen laut Chen et al., 2009 Symptome des metabolischen Syndroms zu sein, welches sich aus folgender klinischer Symptomatik zusammensetzt: Stammbetonte Adipositas, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Glucosetoleranzstörung, meist in Form

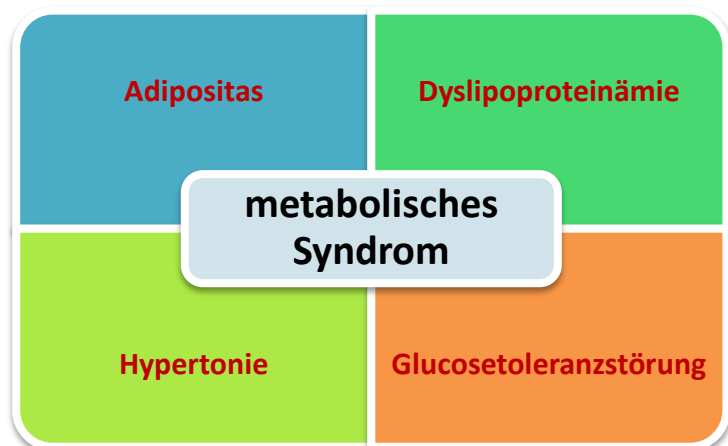


Abb. 4.1: Tetrade des metabolischen Syndroms

eines Diabetes mellitus Typ II (Abb. 4.1). Demnach sei eine

Salzempfindlichkeit bei Hypertonikern umso wahrscheinlicher, je mehr Symptome dieses Syndroms ein Patient aufweise. Ein Zusammenhang mit dem NO-System wird dabei schon lange Zeit untersucht, auch wenn ein genauer Mechanismus bisher nicht entschlüsselt werden konnte. Bragulat und de la Sierra vermuteten in einer 2002 veröffentlichten Studie, dass bei Salzempfindlichkeit der Mechanismus zur Hochregulation der NO-Freisetzung als Antwort auf eine erhöhte Salzzufuhr gestört sein könnte. Diese endotheliale Dysfunktion fände sich gehäuft bei salzempfindlicher Hypertonie und könnte eine Erklärung für die salzgetriggerte Blutdrucksteigerung sein, was wiederum mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko vergesellschaftet sei. Die Rolle, welche das NO-System in diesem Zusammenhang spielt, zeigt sich darüber hinaus dadurch, dass eine hohe Salzaufnahme mit einer erhöhten NO-Konzentration sowie einer gesteigerten NOS-Expression und -aktivität einhergeht, wohingegen bei salzempfindlichen Versuchstieren ein Mangel an NOS-Aktivität zu beobachten ist. Eine Hemmung von NO könnte auf diese Weise eine Steigerung des Blutdrucks zur Folge haben (Zou und Cowley Jr., 1999). Den Zusammenhang

zwischen Salzzufuhr und Blutdruckschwankungen darzustellen, war auch Gegenstand der 1994 von Tollins und Shultz veröffentlichten Arbeit. Sie konnten zeigen, dass eine erhöhte Salzzufuhr bei gleichzeitiger Hemmung des NO-Systems mittels L-Name eine signifikante Blutdrucksteigerung zur Folge hat, ein Effekt, welcher bei der Kontrollgruppe (Tiere, die auf gleiche Weise ernährt wurden, jedoch mit intaktem NO-System) nicht zu beobachten war. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Beeinträchtigung der NOS-Aktivität ein grundlegender Pathomechanismus bezüglich der Entstehung salzempfindlicher Hypertonie sein könnte. Wie diese Beeinträchtigung zustande kommt und inwiefern ein Bezug zum RAAS bzw. dem Einfluss von NO auf das RAAS besteht, bleibt jedoch weitestgehend unklar. Diesbezügliche Analysen zur Bestimmung der Reninkonzentration und zur Lokalisationsdiagnostik reninbildender Zellen könnten von Nutzen sein, um diesen Mechanismus weiter zu entschlüsseln. Eine Antagonisierung einer durch LS-Diät verursachten Blutdrucksenkung durch die systemische Blockade von NO ergab sich jedoch auch aus der zugrunde liegenden Arbeit und bekräftigt den Verdacht, dass die L-Name-getriggerte Verminderung der Reninzellrekrutierung bei chronischer Stimulation des RAAS ein vom Blutdruck abhängiger Mechanismus ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Zu- oder Abnahme der Anzahl reninbildender Zellen in der Niere ist verschiedenen Einflüssen unterworfen und basiert auf einem metaplastischen Transformationsvorgang. Dieser als Rekrutierung bezeichnete Mechanismus ist auf eine Umwandlung von Renin-Vorläufer- zu reninbildenden Zellen zurückzuführen, wobei sowohl glatte Muskelzellen als auch extraglomeruläre Mesangiumszellen als Vorläuferzellen fungieren können. Bei Stimulation des RAAS, beispielsweise durch Salzrestriktion oder Hypotension, kommt es zu einer Steigerung dieser Rekrutierungsvorgänge in retrograder Richtung vom vaskulären Pol der Glomeruli zu den großen renalen Gefäßen (*Barajas, 1979; Taugner et al., 1984*). Welchen Regulationsfaktoren dieser Vorgang unterworfen ist, ist bisweilen noch weitgehend unbekannt, jedoch scheint es wahrscheinlich, dass NO als wichtigster Mediator der Reninsekretion, auch hinsichtlich des Rekrutierungsmechanismus eine bedeutende Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Relevanz von endothelial gebildetem Stickstoffmonoxid für die Rekrutierung reninbildender Zellen herausgearbeitet werden.

Zu diesem Zweck wurden Versuchstiere unterschiedlichen Genotyps hinsichtlich ihres Rekrutierungsverhaltens untersucht. Eine Kombinationsbehandlung aus salzarmer Diät und ACE-Hemmung wurde allen Tieren verabreicht, um eine Stimulation des RAAS zu erreichen. Die Wirkung der Salzrestriktion auf die Reninkonzentration beruht dabei auf Macula Densa-getriggerten Regulationsfaktoren, welche mit Hilfe von Salzsensoren den NaCl-Gehalt im tubulären System der Niere registrieren und in Abhängigkeit davon durch verschiedene Mediatoren Einfluss auf die Reninfreisetzung nehmen. Die ACE-Inhibition mittels Enalapril beruht auf einer Blockade der Umwandlung von ANG I zu ANG II und damit einer Hemmung der ANG II-vermittelten Vasokonstriktion und Inhibition der Reninfreisetzung der JG-Zellen als Teil der negativen Rückkopplungsschleife des RAAS. Ein Fehlen dieses hemmenden Effekts begünstigt demnach die Reninsekretion.

Mit Hilfe fluoreszenzgefärbter histologischer Bilder konnte das Rekrutierungsmuster der verschiedenen Genotypen verfolgt und untersucht werden. Die computer-gesteuerte dreidimensionale Aufarbeitung ausgewählter Gefäßbaumabschnitte ist der zweidimensionalen Darstellung in vielerlei Hinsicht überlegen und erlaubt die genaue Verfolgung des Rekrutierungshergangs sowie die Untersuchung der

Verteilung reninbildender Zellen im dreidimensionalen Raum. Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der Reninkonzentration wurden Renin-mRNA-Analysen durchgeführt.

Neben wildtypischen Versuchstieren, wurden mittels dieser Methoden zudem eNOS-Knockout-, AT_{1a}-Knockout-, sowie Cx40-defiziente Tiere im Hinblick auf ihr Rekrutierungsverhalten untersucht.

Wildtypische Mäuse ließen dabei in Folge der LS/E-Behandlung ein deutliches retrogrades Rekrutierungsmuster entlang der afferenten Arteriole erkennen, welches auf die Transformation glatter Gefäßmuskelzellen zu reninbildenden Zellen zurückzuführen ist. Auch die mRNA-Werte zeigten eine signifikante Zunahme der Reninkonzentration nach Stimulation des RAAS.

Derartiges konnte bei eNOS-defizienten Tieren, bei denen aufgrund eines genetischen Knockouts die Bildung von endothelalem NO blockiert ist, nicht beobachtet werden. Aus den 3D-Rekonstruktionen sowie den mRNA-Analysen geht deutlich hervor, dass die eNOS-Knockouttiere auf die LS/E-Gabe zwar mit einer Zunahme der Reninkonzentration reagieren, dies jedoch auf eine präglomeruläre Clusterbildung und nicht auf eine retrograde Reninzellrekrutierung zurückzuführen ist. Das Fehlen von endothelial gebildetem NO ist demnach mit einem fehlenden Rekrutierungsmechanismus vergesellschaftet, was die Bedeutung von NO für diesen Vorgang unterstreicht.

Die AT_{1a}-Knockouttiere lieferten bereits ohne vorherige Stimulation signifikant höhere Renin-mRNA-Werte als die wildtypischen Referenztiere. Da aufgrund des genetischen Knockouts die ANG II-Wirkung an AT_{1a}-Rezeptoren bei diesem Tiermodell fehlt, wurde auf die Zugabe eines ACE-Inhibitors verzichtet. Reninzellrekrutierung zeigt sich hier bereits ohne LS-Behandlung. Eine Nidrigsalz-Diät führt bei den AT_{1a}-Knockouttieren zu einer enormen Rekrutierungssteigerung, welche sich bis in die Interlobulararterien verfolgen lässt.

Auch die Cx40-defizienten Tiere reagierten auf die Gabe von LS/E mit einer deutlichen Steigerung der Reninkonzentration sowie des Rekrutierungsverhaltens. Dieses findet jedoch nicht in retrograder Richtung entlang der arteriellen Gefäße statt, sondern ektopisch im extraglomerulären Mesangium, was die Bedeutung von Cx40 als Bestandteil der Gap Junctions zwischen den reninbildenden Zellen unterstreicht.

Um die Relevanz von NO für die Reninzellrekrutierung zu untersuchen, wurde einem Teil der Versuchstiere zusätzlich zur LS/E-Behandlung der NOS-Inhibitor L-Name verabreicht, welcher unspezifisch alle NOS-Isoformen inhibiert und somit pharmakologisch die NO-Wirkung blockiert. Derartig behandelte Mäuse zeigten eine signifikant geringere Zunahme ihres Reningehaltes als die Tiere gleichen Genotyps ohne NO-Blockade. Dieses Phänomen lies sich bei allen Versuchstieren nachvollziehen mit Ausnahme des eNOS-defizienten Mausmodells. Dieses lieferte in der 3D-Rekonstruktion keinerlei Veränderung hinsichtlich seines Reninexpressionsmusters im Vergleich zu den Referenztieren. Eine L-Name-Wirkung konnte demnach im eNOS-Knockout nicht beobachtet werden. Das Fehlen der Reninzellrekrutierung im eNOS-Knockoutmodell liefert somit einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Transformation von Renin-Vorläufer- zu reninbildenden Zellen ein von endothelial gebildetem NO abhängiger Mechanismus ist, während iNOS und nNOS eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war darüber hinaus, die Ergebnisse der mRNA-Analyse- und Rekonstruktionsverfahren mit den Blutdruckparametern der Versuchstiere zu vergleichen. Dabei konnte eine deutlich inverse Relation zwischen Renin-mRNA-Gehalt und systolischem Blutdruck gezeigt werden. Hohe mRNA-Level sind demnach mit einem geringen, niedrige mRNA-Level mit einem hohen systolischen Blutdruck vergesellschaftet. Diese Resultate weisen auf einen indirekten, vom Blutdruck abhängigen, Einfluss von NO auf die Reninzellrekrutierung hin. NO bewirkt als starker Vasodilatator eine Weitstellung der Gefäße und auf diese Weise eine Blutdrucksenkung. Dies wiederum führt aufgrund einer verminderten renalen Perfusion zur Stimulation der Reninsynthese infolge einer vermehrten Reninzellrekrutierung. Im Umkehrschluss führt – wie in dieser Arbeit dargestellt - die systemische Blockade von NO mittels L-Name zu einer Zunahme des systolischen Blutdrucks und infolge dessen zu einer verminderten Reninzellrekrutierung. Endothelial gebildetes NO triggert somit durch eine Senkung des systemischen Blutdrucks die Transformation von Renin-Vorläufer- zu reninsynthetisierenden Zellen. Auf welche Art und Weise die Modulation des Blutdrucks derartige Transformationsvorgänge zu bewirken vermag, ist jedoch noch weitestgehend unklar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ardailou R. (1999):** Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 11: S30-9.
- Ardailou R., Chansel D., Chatziantoniou C., Dussaule J.C. (1999):** Mesangial AT1 receptors: expression, signaling, and regulation. *J Am Soc Nephrol.* 11: S40-6.
- Bachmann S., Mundel P. (1994):** Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis.* 24(1): 112-29.
- Barajas L. (1979):** Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol.* 236: 240-246.
- Beyer E.C., Paul D.L., Goodenough D.A. (1990):** Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol.* 116(3): 187-94.
- Bosse H.M., Böhm R., Resch S., Bachmann S. (1995):** Parallel regulation of constitutive nitric oxide synthase and renin at the juxtaglomerular apparatus of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 269: F793-805.
- Bragulat E., de la Sierra A. (2002):** Salt intake, endothelial dysfunction, and salt-sensitive hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 4(1): 41-6.
- Cantin M., Araujo-Nascimento M.D., Benchimol S., Desormeaux Y. (1977):** Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol* 87: 581-602.
- Chen J., Gu D., Huang J., Rao D.C., Jaquish C.E., Hixon J.E., Chen C., Chen J., Lu F., Hu D., Rice T., Kelly T.N., Hamm L.L., Whelton P.K., He J. (2009):** Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *The Lancet*, 373 (9666), 829 – 835.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Davis J.O., Freeman R.H. (1976):** Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 56:1-56.
- Friis U.G., Jensen B.L., Sethi S. (2002):** Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation Research* 90:996-1003.

- Gödecke A., Decking K.M., Ding Z, Hirchenhain J., Bidmon H.J., Gödecke S., Schrader J. (1998):** Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 82: 186-194.
- Gomez R.A., Chavalier R.L., Everett A.D., Elwod J.P., Peach M.J., Lynch K.R., Carey R.M. (1990):** Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F660-F665.
- Grady E.F., Sechi L.A., Griffin C.A., Schambelan M., Kalinyak J.E. (1991):** Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* 88(3): 921-33.
- Grasemann H., Yandava C.N., Drazen J.M. (1999):** Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy* 4: 39-41.
- Greten H. (2005):** Innere Medizin. Verstehen – Lernen – Anwenden. *Thieme-Verlag, 12. Auflage, Stuttgart, S170-96.*
- Grüneberger C., Obermayer B., Klar J., Kurtz A., Schweda F. (2006):** The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res.* 99(11): 1197-206.
- Hackenthal E. (1986):** Renin secretion. Mechanism and effectors. *Ann Endocrinol (Paris)* 47(3): 145-55.
- Hackenthal E., Paul M., Ganten D. and Taugner R. (1990):** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067 – 1116.
- Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y., Jacobson H.R., Dubois R.N. and Breyer M.D. (1994):** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94(6): 2504-10.
- Hess H., Sinowatz F. (2000):** Histologie, *Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Dt. Ärzteverlag Köln, 3. Auflage S. 285-298.*
- Holmer S.R., Kaissling B., Putnik K., Pfeifer M., Krämer B.K., Riegger A.J., Kurtz A. (1997):** Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15: 1471-1479.
- Ito M., Oliverio M.I., Mannon P.J., Best C.F., Maeda N., Smithies O., Coffman T.M. (1995):** Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8): 3521-3525.

- Johnson R.A., Freeman R.H. (1994):** Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 2):R1723-9.
- Junqueira L.C., Carneiro J. und Kelley R.O. (2002):** Histologie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 5. Auflage: S329.
- Kelsell D.P., Dunlop J., Stevens H.P., Lench N.J., Liang J.N., Parry G., Mueller R.F., Leigh I.M. (1997):** Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature* 387(6628): 80.3.
- King J.A., Fray J.C. (1994):** Hydrogen and potassium regulation of (pro)renin processing and secretion. *Am J Physiol.* 267(1 Pt 2): F1-12.
- Kirchhoff S., Nelles E., Hagendorff A., Kruger O., Traub O., Willecke K. (1998):** Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8: 299-302.
- Kon Y. (1999):** Comparative study of renin-containing cells. Histological approaches. *J Vet Med Sci.* 1999 Oct;61(10):1075-86.
- Kone B.C. (2004):** Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol.* 24(4): 299-315.
- Kurtz A., Götz, K. H., Hamann, M., Kieninger, M. and Wagner C. (1998a):** Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cyclic AMP pathway. *Am. J. Physiol.* 274, F709–F717.
- Kurtz L., Madsen K., Kurt B., Jensen B.L., Walter S., Banas B., Wagner C., Kurtz A.(2010):** High-level connexin expression in the human juxtaglomerular apparatus. *Nephron Physiol.* 116(1): p1-8.
- Kurtz L., Schweda F., de Wit C., Kriz W., Witzgall R., Warth R., Sauter A., Kurtz A., Wagner C. (2007):** Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Apr; 18(4): 1103-11.
- Kurtz A., Wagner C. (1998):** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol.* 275: F849-62.
- Kurtz A., Wagner C. (1999):** Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol.* 202: 219-25.

- MacMicking J.D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D.S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q.W., Sokol K., Hutchinson N. et al. (1995):** Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 81(4): 641-50.
- Makowski L., Caspar D.L., Phillips W.C., Goodenough D.A. (1977):** Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol*. 74(2): 629-45.
- Manning R.D. Jr., Hu L., Tan D.Y., Meng S. (2001):** Role of abnormal nitric oxide systems in salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens*. 14(6 Pt 2): 68S-73S.
- Michel T., Feron O. (1997):** Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 100(9): 2146-52.
- Nafz B., Berthold H., Ehmke H., Hackenthal E., Kirchheim H.R., Persson P.B. (1997):** Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol*. 273(2 Pt 2): F200-5.
- Ollerstam A., Persson AE. (2002):** Macula densa neuronal nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 56(2): 189-96.
- Patterson J.H. (2003):** Angiotensin II receptor blockers in heart failure. *Pharmacotherapy* 23(2): 173-82.
- Peters J., Clausmeyer S. (2002):** Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Dec; 34(12): 1561-8.
- Phillips M. I. and Schmidt-Ott K. M. (1999):** The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News in Physiological Sciences*, Vol. 14, No. 6, 271-274.
- Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. (2008):** Duale Reihe Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, S.633-35.
- Romeis B. (1989):** Romeis mikroskopische Technik. Urban & Schwarzenberg, München, 17. Auflage, S.256-259.
- Schricker K., Della Bruna R., Hamann M., Kurtz A. (1994):** Endothelium derived relaxing factor is involved in the pressure control of renin gene expression in the kidney. *Pflügers Arch* 428: 261-268.

Schricker K., Hamann M., Kurtz A. (1995): Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am J Physiol* 269: F825-F830.

Schricker K., Hegyi I., Hamann M., Kaissling B., Kurtz A. (1995): Tonic stimulation of renin gene expression by nitric oxide is counteracted by tonic inhibition through angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17): 8006-10.

Schricker K., Kurtz A. (1996): Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch* 432: 187-191.

Schweda F., Friis U., Wagner C., Scott O., Kurtz A. (2007): Renin Release. *Physiol.* 22: 310-319.

Sequeira Lopez M.L., Pentz E.S., Robert B., Abrahamson D.R. and Gomez R.A. (2001): Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281(2): 345-56.

Sequeira López M.L., Pentz E.S., Nomasa T., Smithies O., Gomez R.A. (2004): Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell.* 2004 May; 6(5): 719-28.

Söhl G., Willecke K. (2003): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 62: 228– 232.

Steckelings U.M., Rompe F., Kaschina E., Namsolleck P., Grzesiak A., Funke-Kaiser H., Bader M., Unger T. (2010): The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11(1): 67-73.

Suadinaci S.O., Vink M.J., Spray D.C. (2000): Slow intercellular Ca(2+) signaling in wildtype and Cx43-null neonatal mouse cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(6): H3076-88.

Takenaka T., Inoue T., Kanno Y., Okada H., Meaney K.R., Hill C.E., Suzuki H. (2008): Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int.* 73(4): 415-22.

Taugner R., Buhle C.P and Nobiling R. (1984): Ultrastructural changes associated with renin secretion from juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 273: 459-472.

- Tollins J.P., Shultz P.J. (1994):** Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int.* 46(1): 230-6.
- Unger T., Chung O., Csikos T., Culman J., Gallinat S., Gohlke P., Höhle S., Meffert S., Stoll M., Stroth U., Zhu Y.Z. (1996):** Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 14(5): S95-103.
- Vetter Christine (2004):** Abschied vom Stufenschema. *Deutsches Ärzteblatt Jg. 101, Heft 1-2.*
- Wagner C. (2008):** Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* 73(5): 547-55.
- Wagner C., Gödecke A., Fordm., Schnermann J., Schrader J., Kurtz A. (2000):** Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflugers Arch.* 439(5): 567-72.
- Wagner C., Jensen B.L., Kramer B.K. and Kurtz A. (1998):** Control of the renal rennin system by local factors. *Kidney Int Suppl.* 67: 78-83.
- Wagner C., Pfeifer A., Ruth P., Hofmann F., Kurtz A. (1998):** Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest.* 102(8): 1576-82.
- Wei X.Q., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G.J., Guang F.P., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F.Y. (1995):** Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375(6530): 408-11.
- Wenzel U.O., Krebs C., Benndorf R. (2010):** The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11: 37.
- Zou A.P., Cowley A.W. Jr. (1999):** Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Curr Hypertens Rep.* 1(2): 178-86.

7. ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	WHO-Klassifikation von Blutdruckparametern (WHO/ISH-Guidelines-Subcommittee: 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. In: Journal Hypertens. 17.1999,151-183.)	6
Abb. 1.2:	medikamentöses Pentagramm der Hypertoniebehandlung	7
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der RAAS-Signalkaskade (siehe AG Deußen, Technische Universität Dresden)	7
Abb. 1.4:	Molekulare Struktur des Renins (siehe http://www.sciencephoto.com/media/6131/enlarge)	8
Abb. 1.5:	schematische Darstellung der Wirkungsweise antihypertensiver Medikamente	9
Abb. 1.6:	schematische Darstellung des Juxtaglomerulären Apparates	11
Abb. 1.7:	schematische Darstellung zur Abstammung der JG-Zellen	12
Abb. 1.8:	Darstellung der NO-Biosynthese	15
Abb. 1.9:	AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptorwirkung in der Niere	18
Abb. 1.10:	Signalkaskade der ANG II-Rezeptortypen AT ₁ und AT ₂	19
Abb. 1.11:	schematische Darstellung von Gap Junctions	20
Abb. 1.12a:	struktureller Aufbau von Gap Junctions	21
Abb. 1.12b:	schematische Darstellung eines Connexin-Moleküls	21
Abb. 2.1:	Bildstapelgenerierung	36
Abb. 2.2:	Farbkanalauftrennung	47
Abb. 3.1a:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des unbehandelten Wildtypen (Gesamtansicht)	44
Abb. 3.1b:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des unbehandelten Wildtypen (Detailansicht, Ausschnitt aus 3.1a)	44
Abb. 3.2a:	Histologische Darstellung des unbehandelten Wildtypen in 100facher Vergrößerung	45
Abb. 3.2b:	Histologische Darstellung des unbehandelten Wildtypen in 400facher Vergrößerung	45

Abb. 3.3a:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS	47
Abb. 3.3b:	Histologische Darstellung des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS, in 100facher Vergrößerung	47
Abb. 3.3c:	Histologische Darstellung des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS, in 400facher Vergrößerung	47
Abb. 3.3d:	siehe Abb. 3.1a	47
Abb. 3.3e:	siehe Abb. 3.2a	47
Abb. 3.3f:	siehe Abb. 3.2b	47
Abb. 3.4a:	siehe Abb. 3.3.a	49
Abb. 3.4b:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Wildtypen stimuliert mit E/LS, Detailansicht (Ausschnitt aus 3.4a)	49
Abb. 3.4c:	siehe Abb. 3.3.b	49
Abb. 3.4d:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS + L-Name, Gesamtansicht	49
Abb. 3.4e:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS + L-Name, Detailansicht (Ausschnitt aus 3.4d)	49
Abb. 3.4f:	Histologische Darstellung des eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS + L-Name, in 100facher Vergrößerung	49
Abb. 3.5a:	Histologische Darstellung des eNOS-Wildtypen stimuliert mit E/LS, in 400facher Vergrößerung	50
Abb. 3.5b:	Histologische Darstellung der Reninreaktion am eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS, in 400facher Vergrößerung	50
Abb. 3.5c:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion am eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS, in 400facher Vergrößerung	50
Abb. 3.5d:	Histologische Darstellung des eNOS-Wildtypen, Stimuliert mit E/LS + L-Name, in 400facher Vergrößerung	50
Abb. 3.5e:	Histologische Darstellung der Reninreaktion am eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS + L-Name, in 400facher Vergrößerung	50
Abb. 3.5f:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion am eNOS-Wildtypen, stimuliert mit E/LS + L-Name, in 400facher Vergrößerung	50

Abb. 3.6a:	siehe Abb. 3.3a und 3.4b	52
Abb. 3.6b:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Knockout, Stimuliert mit E/LS (Gesamt- + Detailansicht)	52
Abb. 3.6c:	siehe Abb. 3.1a und 3.1b	52
Abb. 3.7a:	siehe Abb. 3.6b	53
Abb. 3.7b:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des eNOS-Knockout, stimuliert mit E/LS + L-Name (Gesamt- + Detailansicht)	53
Abb. 3.8a:	Histologische Darstellung des eNOS-Knockout, stimuliert mit E/LS in 100facher Vergrößerung	54
Abb. 3.8b:	Histologische Darstellung des eNOS-Knockout, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	54
Abb. 3.8c:	Histologische Darstellung des eNOS-Knockout stimuliert mit E/LS + L-Name in 100facher Vergrößerung	54
Abb. 3.8d:	Histologische Darstellung des eNOS-Knockout stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	54
Abb. 3.9a:	Histologische Darstellung der Reninreaktion des eNOS- Knockouts, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	55
Abb. 3.9b:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion des eNOS- Knockouts, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	55
Abb. 3.9c:	Histologische Darstellung der Reninreaktion des eNOS- Knockouts, stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	55
Abb. 3.9d:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion des eNOS- Knockouts, stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	55
Abb. 3.10a:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS	57
Abb. 3.10b:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS, Detailansicht aus 3.10a	57
Abb. 3.10c:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS, Detailansicht aus 3.10a	57
Abb. 3.11a:	Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts stimuliert mit LS in 100facher Vergrößerung	58

Abb. 3.11b: Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts stimuliert mit LS in 400facher Vergrößerung	58
Abb. 3.12a: Histologische Darstellung der Reninreaktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS in 400facher Vergrößerung	59
Abb. 3.12b: Histologische Darstellung der Aktinreaktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS in 400facher Vergrößerung	59
Abb. 3.13a: siehe Abb. 3.10a	60
Abb. 3.13b: siehe Abb. 3.10c	60
Abb. 3.13c: Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des AT _{1a} -Knockouts stimuliert mit LS + L-Name	60
Abb. 3.13d: Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion AT _{1a} -Knockouts stimuliert mit LS + L-Name, Detailansicht (Ausschnitt aus 3.13c)	60
Abb. 3.14a: siehe Abb. 3.11a	61
Abb. 3.14b: siehe Abb. 3.11b	61
Abb. 3.14c: Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS + L-Name in 100facher Vergrößerung	61
Abb. 3.14d: Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	61
Abb. 3.15a: Histologische Darstellung der Reninreaktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	62
Abb. 3.15b: Histologische Darstellung der Aktinreaktion des AT _{1a} -Knockouts, stimuliert mit LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	62
Abb. 3.16a: siehe Abb. 3.10a und 3.10c	63
Abb. 3.16b: siehe Abb.3.13c und 3.13d	63
Abb. 3.16c: Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des AT _{1a} -Knockouts, + L-Name (Gesamt- und Detailansicht)	63
Abb. 3.17a: siehe Abb. 3.14c	64
Abb. 3.17b: siehe Abb. 3.14d	64
Abb. 3.17c: Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts + L-Name, in 100facher Vergrößerung	64
Abb. 3.17d: Histologische Darstellung des AT _{1a} -Knockouts + L-Name in 400facher Vergrößerung	64

Abb. 3.18a:	Histologische Darstellung der Reninreaktion des AT _{1a} -Knockouts, + L-Name in 400facher Vergrößerung	65
Abb. 3.18b:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion des AT _{1a} -Knockouts, + L-Name in 400facher Vergrößerung	65
Abb. 3.19:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS (Gesamt- + Detailansicht)	66
Abb. 3.20a:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS in 100facher Vergrößerung	67
Abb. 3.20b:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS, Detailansicht (Ausschnitt aus 3.20a)	67
Abb. 3.20c:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	67
Abb. 3.21a:	siehe Abb. 3.19	68
Abb. 3.21b:	siehe Abb. 3.20a	68
Abb. 3.21c:	Amira-3D-Gefäßbaumrekonstruktion des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS + L-Name	68
Abb. 3.21d:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS + L-Name in 100facher Vergrößerung	68
Abb. 3.22a:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, Stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.22b:	Histologische Darstellung der Reninreaktion des Cx40-Knockouts, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.22c:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion des Cx40-Knockout, stimuliert mit E/LS in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.22d:	Histologische Darstellung des Cx40-Knockout, Stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.22e:	Histologische Darstellung der Reninreaktion des Cx40-Knockouts, stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.22f:	Histologische Darstellung der Aktinreaktion des Cx40-Knockouts, stimuliert mit E/LS + L-Name in 400facher Vergrößerung	69
Abb. 3.23:	graphische Darstellung des mRNA-Gehaltes der verschiedenen Genotypen	71

Abb. 3.24a:	siehe Abb. 3.3a (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des Wildtypen, Ausschnitt aus 3.23)	72
Abb. 3.24b:	siehe Abb. 3.4d (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des Wildtypen, Ausschnitt aus 3.23)	72
Abb. 3.25a:	siehe Abb. 3.6b (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des eNOS-Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	73
Abb. 3.25b:	siehe Abb. 3.7b (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des eNOS-Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	73
Abb. 3.26a:	siehe Abb. 3.10a (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des AT _{1a} -Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	74
Abb. 3.26b:	siehe Abb. 3.13c (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des AT _{1a} -Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	74
Abb. 3.27a:	siehe Abb. 3.19 (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des Cx40-Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	75
Abb. 3.27b:	siehe Abb. 3.21c (mit graphischer Darstellung des mRNA-Gehaltes des Cx40-Knockout, Ausschnitt aus 3.23)	75
Abb. 3.28:	graphische Darstellung der Blutdruckparameter der verschiedenen Genotypen	77
Abb. 3.29:	graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des Wildtypen (Ausschnitte aus 3.23 und 3.28)	78
Abb. 3.30:	graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des eNOS-Knockout (Ausschnitte aus 3.23 und 3.28)	79
Abb. 3.31:	graphische Darstellung der Blutdruck- und Renin-mRNA-Werte des AT _{1a} -Knockout (Ausschnitte aus 3.23 und 3.28)	80
Abb. 3.32:	graphische Darstellung der Renin-mRNA-Werte des Cx40-Knockout (Ausschnitt aus 3.23)	81
Abb. 4.1:	symptomatische Tetrade des metabolischen Syndroms	88

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten			
bp	Basenpaare	DNase	Desoxyribonuklease
I.E.	internationale Einheit	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
M	molar	E	embryonaler Tag
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
U	enzymatische Einheit (Unit)	et al.	und andere (et alii)
		EtOH	Ethanol
		GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
Physikalische Größen und Einheiten		H ₂ O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
°C	Grad Celsius	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
g	Erdbeschleunigung (gravity)	HS	Pferdeserum (horse serum)
g	Gramm	Ig	Immunglobulin
h	Stunde(n)	i.p.	intra peritoneal
l	Liter	IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
min	Minute(n)	JGA	juxtaglomerulärer Apparat
s	Sekunde(n)	JGE-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
V	Volumen	KCl	Kaliumchlorid
		K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten		H ₂ KPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
k	kilo (1x10 ³)	MD	Macula densa
m	milli (1x10 ⁻³)	mRNA	messenger ribonucleic acid
μ	micro (1x10 ⁻⁶)	N ₂	Stickstoff
n	nano (1x10 ⁻⁹)	Na	Natrium
p	pico (1x10 ⁻¹²)	NaCl	Natriumchlorid
		Na ₂ HPO	di-Natriumhydrogenphosphat
Sonstige		PBS	phosphate buffered saline
3D	dreidimensional	PCR	Polymerasekettenreaktion
%	Prozent	PDGF-β	platelet derived growth factor-beta
αSMA	α smooth muscle actin	PIP2	Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat
A.	Arteria(e)	PKC	Proteinkinase C
Abb.	Abbildung	PLC	Phospholipase C
ACE	Angiotensin-converting Enzyme	pp	postpartal
ANGI	Angiotensin I	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ANGII	Angiotensin II	RNA	Ribonukleinsäure
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1	RNase	Ribonuklease
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2	RT	Raumtemperatur
ATP	Adenosintriphosphat	RT	Reverse Transkriptase
BSA	bovine serum albumin	SEM	Standardfehler des Mittelwerts
bzw.	beziehungsweise	TRIS	Tris-(hydroxy-methyl)-amino-methan
Ca	Calcium	TRITC	Tetramethylrhodamin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	ün	über Nacht
cDNA	copy deoxyribonucleic acid	V.	Vena(e)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	VEGF	vascular endothelial growth factor
Cy2	Carbocyanin	vgl.	vergleiche
DAG	Diacylglycerol	z.B.	zum Beispiel
DEPC	Diethylpyrocarbonat		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich von Herzen allen danken, die während der letzten Monate und Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des spannenden Themas sowie die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmaterialien und Geräte. Sein Engagement und die Leidenschaft, die er für seine Forschung aufbringt, waren mir Inspiration und Motivation.

Frau Dr. Katharina Machura danke ich für die Einarbeitung, die fachliche Unterstützung sowie die kompetente Betreuung dieser Arbeit. Ich fühlte mich nicht nur in fachlicher, sondern auch in persönlicher Hinsicht stets gut aufgehoben. Ohne sie wäre die Arbeit an dieser Dissertation niemals so reibungslos verlaufen.

Allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Meli, Björn, Dominik und Ramona, danke ich für das durchweg angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.

Bei Frau Anna M´Bangui und Marina Ivaysyuk bedanke ich mich für die Einarbeitung in die histologischen Arbeitstechniken und die stets harmonische Zusammenarbeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre seit Jahren andauernde, niemals endende Unterstützung, auf die ich Tag und Nacht, in guten und in schlechten Zeiten, stets zählen kann. Das Wissen um diese durch nichts zu erschütternde Freundschaft erfüllt mich mit Stolz und Dankbarkeit und lässt mich sowohl in freudigen, als auch in traurigen Tagen, stets nach vorne blicken und bietet mir Rückhalt und Sicherheit für meinen Lebensweg. Besonders danken möchte ich meiner treuen Freundin Schniefi, die als Spezialagentin der internationalen Wort- und Grammatikpolizei wie geschaffen für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit war.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie: Meinen Eltern Heidi und Fritz für die kontinuierliche Unterstützung meiner Ausbildung, meiner Schwester Birgit sowie meiner Zeholfinger- und meiner Schrömer-Oma. Egal wohin mein Weg mich auch führen mag, das Wissen darum, jederzeit nach Hause kommen zu können, bietet mir die Sicherheit, die ich brauche, um diesen Weg mit Kraft und Selbstvertrauen beschreiten zu können.

7.4 Erklärung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2010 bis Juli 2012 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Ich, Ramona Kettl, geboren am 14.10.1987 in Landau an der Isar, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 27.11.2013

Ramona Kettl