

Strukturelle Analyse der Reninfreisetzung in juxtaglomerulären Epitheloidzellen von Cx40^{+/+}- und Cx40^{-/-}-Mäusen



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

vorgelegt von
Maria Heidrun Scheid

aus
Regensburg

im Jahr
2017

Strukturelle Analyse der Reninfreisetzung in juxtaglomerulären Epitheloidzellen von Cx40^{+/+}- und Cx40^{-/-}-Mäusen



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

vorgelegt von
Maria Heidrun Scheid

aus
Regensburg

im Jahr
2017

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2013 bis Juli 2016 am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 04.06.2017

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung.....	6
2 Einführung	9
2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System	9
2.2 Die juxtaglomeruläre Epitheloidzelle	11
2.3 Reninsynthese und Sekretionsvesikel	12
2.4 Regulation der Reninsynthese und -sekretion in juxtaglomerulären Zellen ..	13
2.4.1 Regulation durch systemische und lokale Faktoren.....	13
2.4.1.1 Systemischer Blutdruck	13
2.4.1.2 Salzhaushalt	14
2.4.1.3 Sympathisches Nervensystem.....	14
2.4.1.4 Angiotensin II	15
2.4.1.5 Weitere Hormone und Autacoide.....	15
2.4.2 Regulation auf zellulärer Ebene	15
2.4.2.1 Der cAMP-Signalweg.....	15
2.4.2.2 Intra- und extrazelluläre Kalzium-Konzentration	16
2.4.2.3 Der cGMP-Signalweg	17
2.5 Connexine und Gap Junctions	18
2.5.1 Allgemeiner Aufbau.....	18
2.5.2 Funktion von Connexinen	20
2.5.3 Connexine in der Niere	21
2.6 Sekretionsmechanismen.....	23
2.6.1 Klassisch regulierte Exozytose	23
2.6.2 Compound-Exozytose.....	24
2.6.3 <i>Kiss and Run</i> -Mechanismus	25
2.6.4 Regulierte lysosomale Sekretion.....	25
2.7 Zielsetzung	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Geräte.....	28
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	29
3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits	30

3.1.4	Puffer und Lösungen.....	31
3.1.4.1	IPN-Methode.....	31
3.1.4.2	Elektronenmikroskopie	32
3.1.5	Software und Internetdienste	32
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Versuchstiere	33
3.2.2	Isoliert perfundierte Niere (IPN)	33
3.2.2.1	Präparation der Nieren	33
3.2.2.2	Pharmakologische Stimulation der Reninsekretion.....	34
3.2.2.3	Messung der Reninsekretionsrate	34
3.2.2.4	Fixierung des Nierengewebes	35
3.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie	35
3.2.3.1	Einbettung und Trimmen	35
3.2.3.2	Anfertigen von Ultradünnschnitten.....	37
3.2.3.3	Kontrastieren der Schnitte	37
3.2.3.4	Elektronenmikroskopie: Akquisition und Digitalisierung.....	37
3.2.4	Dreidimensionale Rekonstruktion	38
3.2.4.1	Datenaufbereitung mittels <i>ImageJ</i>	38
3.2.4.2	Rekonstruktion mittels <i>Amira</i>	38
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Definition morphologischer Begrifflichkeiten	42
4.1.1	Reninspeichervesikel und Reninspeichervesikel-Netzwerke	42
4.1.2	Low-Density-Vesikel	43
4.1.3	Reninspeichervesikel-Vorstufen.....	43
4.1.4	Inhomogen elektronendichte Vesikel	47
4.1.5	Reninspeichervesikel-Einschlüsse.....	48
4.2	Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Cx40 ^{+/+} -Maus	50
4.2.1	Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen	50
4.2.2	Untersuchung von stimulierten JG-Zellen	54
4.2.2.1	Messung der Reninsekretionsrate	54
4.2.2.2	16-minütige Stimulation mit Isoproterenol.....	55
4.2.2.3	16-minütige Stimulation mit EGTA.....	63
4.3	Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Cx40 ^{-/-} -Maus	72
4.3.1	Untersuchung einer unstimulierten JG-Zelle.....	72

4.3.2	Untersuchung von stimulierten JG-Zellen	75
4.3.2.1	Messung der Reninsekretionsrate	75
4.3.2.2	16-minütige Stimulation mit Isoproterenol.....	77
4.3.2.3	16-minütige Stimulation mit EGTA.....	84
4.4	Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran in JG-Zellen	94
4.4.1	Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen	95
4.4.2	Untersuchung von stimulierten JG-Zellen	97
4.4.2.1	16-minütige Stimulation mit Isoproterenol.....	97
4.4.2.2	16-minütige Stimulation mit EGTA.....	100
5	Diskussion	105
5.1	Allgemeine Morphologie in JG-Zellen	106
5.2	Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen	107
5.2.1	Die Cx40 ^{+/+} -Maus.....	107
5.2.2	Die Cx40 ^{-/-} -Maus	109
5.3	Die kontrollierte Reninsekretion in JG-Zellen.....	110
5.3.1	Mögliche Exozytose-Mechanismen.....	110
5.3.1.1	„Klassische“ Exozytose versus <i>Kiss and Run</i> -Mechanismus.....	110
5.3.1.2	Die Compound-Exozytose	112
5.3.1.3	Weitere Überlegungen zu Zellmembran-Kontakten.....	114
5.3.2	Die Cx40 ^{+/+} -Maus.....	115
5.3.2.1	16-minütige Stimulation mit Isoproterenol.....	115
5.3.2.2	16-minütige Stimulation mit EGTA.....	116
5.3.3	Die Cx40 ^{-/-} -Maus	120
5.3.3.1	16-minütige Stimulation mit Isoproterenol.....	121
5.3.3.2	16-minütige Stimulation mit EGTA.....	122
5.4	Fazit.....	124
6	Literaturverzeichnis	126
7	Anhang.....	144
7.1	Abbildungsverzeichnis	144
7.2	Tabellenverzeichnis	148
7.3	Abkürzungsverzeichnis	148
	Danksagung.....	152
	Erklärung.....	154

1 Zusammenfassung

Für das Renin-Angiotensin-Aldosteron System und damit für die Blutdruckregulierung im Organismus spielt Renin eine entscheidende Rolle. In den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere wird Renin in elektronenmikroskopisch dichten Vesikeln gespeichert und über einen regulierten Freisetzungsmechanismus ausgeschüttet, wobei der intrazelluläre cAMP-Signalweg die Reninsekretion stimuliert und eine Erhöhung der extra- und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration diese hemmt. Der genaue Exozytosemechanismus von Renin ist noch nicht vollständig geklärt. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass in JG-Zellen die Compound-Exozytose, bei der zu großen Speichernetzwerken fusionierte Vesikel die Sekretion erhöhen, für die Maximierung der Reninsekretionsrate (RSR) relevant sein könnte.

Die JG-Zellen der Niere sind sowohl untereinander als auch mit benachbarten Zellen durch Gap Junctions verbunden, wobei JG-Zellen im adulten Organismus überwiegend Connexin 40 (Cx40) exprimieren. Cx40-Knockout-Mäuse (Cx40^{-/-}) weisen unter anderem einen Anstieg der Plasmanreninkonzentration und daher Bluthochdruck auf. Bei diesen Mäusen sind die JG-Zellen nicht mehr ausschließlich in der Media afferenter Arteriolen lokalisiert und der sogenannte Barorezeptorreflex, der durch einen Anstieg des intrarenalen Blutdrucks zur Abnahme der Reninexpression und -sekretion führt, ist nachweislich gestört. In Versuchen von Wagner et al. mit isoliert perfundierten Nieren (IPN) wurde festgestellt, dass die RSR bei Cx40^{-/-}-Mäusen unter Stimulation mit Isoproterenol (Iso), das zur Aktivierung des cAMP-Signalwegs führt, regulär ansteigt. Unter Stimulation mit Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), welches die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration absenkt, findet eine Zunahme der RSR im Gegensatz zum Wildtyp jedoch nur in geringem Maße statt [1]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Ausmaß sich die Abwesenheit von Cx40 ultrastrukturell in der zwei- und dreidimensionalen Ebene auf die Reninsekretion und auf die Morphologie von Reninspeichervesikeln (RV) auswirkt.

Im Zuge dieser Dissertation wurden dazu in IPN-Versuchen präparierte, unstimulierte und stimulierte Wildtyp- und Cx40^{-/-}-Mäuse ultrastrukturell analysiert. Zur pharmakologischen Stimulation der Reninsekretion wurde 10 nM Iso bzw. 3,1 mM EGTA verwendet. Nach der Fixierung des Nierengewebes wurden 70 nm dünne Schnitte von JG-Zellen erstellt, in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM-

Aufnahmen) betrachtet und mittels eines Softwareprogrammes dreidimensional rekonstruiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden JG-Zellausschnitte von Wildtyp-Mäusen betrachtet. Während die 16-minütige Stimulation mit 10 nM Iso im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp die RV-Morphologie nur wenig beeinflusste, führte die 16-minütige Stimulation des Wildtyps mit 3,1 mM EGTA zur verstärkt irregulären Morphologie der RV, zur Verminderung und Inhomogenität der Elektronendichte mancher RV, zur Abnahme von der durchschnittlichen Vesikelvolumina und -oberflächen und zur Zunahme des Vernetzungsgrades der RV. Die Zunahme der RSR war bei beiden Stimulationsarten nahezu identisch. Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen aus früheren Studien. Die verminderte Elektronendichte mancher RV im mit EGTA stimulierten Wildtyp könnte auf eine unvollständige Entleerung dieser RV und damit auf einen in JG-Zellen stattfindenden *Kiss and Run*-Mechanismus hindeuten, durch den Speichervesikel über kleine Fusionsporen mit der Zellmembran nur teilweise entleert werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden JG-Zellausschnitte von Cx40^{-/-}-Mäusen betrachtet und mit dem Wildtyp verglichen. Der unstimulierte Cx40^{-/-} wies neben einer leicht erhöhten RSR im Vergleich zum Wildtyp fast ausschließlich klassisch runde RV auf. Die RV-Morphologie des unstimulierten Cx40^{-/-} bestätigt frühere Beschreibungen, dass die RV sich im Cx40^{-/-} vermehrt klassisch rund präsentieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass JG-Zellen durch extrazelluläre Signale zur Bildung von Speichernetzwerken angeregt werden und dieser Mechanismus bei Cx40^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ist. Nach der 16-minütigen Stimulation des Cx40^{-/-} mit Iso wurde in den betrachteten Zellausschnitten im Vergleich zum mit Iso stimulierten Wildtyp eine stärker variierende Morphologie der RV festgestellt, wobei die Vernetzungsgrade der RV sich ähnelten. Die 16-minütige Stimulation des Cx40^{-/-} mit EGTA führte im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp nicht zur Inhomogenität der RV-Elektronendichte, zu weniger ausgeprägten morphologischen Veränderungen und zur geringeren Abnahme der durchschnittlichen Vesikelvolumina und Vesikeloberflächen. Während die RSR beim mit Iso stimulierten Knockout wie beim Wildtyp deutlich zunahm, fehlte dieser Anstieg unter dem Einfluss von EGTA beim Cx40^{-/-} fast vollständig. Die Zellmorphologie beim mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} steht in Einklang mit dem ausbleibenden Anstieg der RSR, der bereits von Wagner et al. beobachtet wurde, und mit deren Annahme, dass das Fehlen von Cx40 die

Übertragung von Ca^{2+} -Signalen beeinflusst [1].

Im dritten Teil der Arbeit wurden noch einmal gezielt Kontakte der RV mit der Zellmembran betrachtet. Mit Ausnahme des mit Iso stimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ wurden, unabhängig von der RSR, pro Zellausschnitt durchschnittlich zwei bis drei Kontakte von RV mit der Zellmembran beobachtet. Lediglich bei zwei der mit Iso stimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ -Zellausschnitte wurden überdurchschnittlich viele Zellmembran-Kontakte festgestellt. Laut früheren Studien wird die Reninsekretion unter Stimulation mit Iso durch den direkten Kontakt zu Endothelzellen, der bei $\text{Cx40}^{-/-}$ aufgrund der veränderten Lokalisation der JG-Zellen nicht immer vorliegt, gedrosselt [2]. Zudem fördert die Stimulation des cAMP-Signalwegs in JG-Zellen die Größenzunahme sogenannter *Readily Releasable Pools*, in denen sich bereits aktivierte Speicher-vesikel befinden, die rasch sezerniert werden können [3]. Beides könnte die hohe Anzahl an Zellmembran-Kontakten erklären, die im mit Iso stimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ festgestellt wurde.

Der Sekretionsmechanismus von RV konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die ultrastrukturellen Beobachtungen schlossen weder die klassisch regulierte Exozytose noch die Compound-Exozytose oder den *Kiss and Run*-Mechanismus als mögliche relevante Mechanismen aus. Denkbar wäre, dass die „klassische“ Exozytose die basale RSR aufrechterhält, während die Compound-Exozytose die Maximierung der RSR über ein gewisses Zeitintervall hinweg fördert. Dabei könnten unter Stimulation des cAMP-Signalweges bevorzugt die Vergrößerung der *Readily Releasable Pools* und unter Hemmung der extra- und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der *Kiss and Run*-Mechanismus zum kontrollierten Anstieg der RSR beitragen. Folglich wäre davon auszugehen, dass die RV grundsätzlich zu allen aufgeführten Exozytose-Mechanismen befähigt sind.

2 Einführung

2.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) ist für die physiologische Homöostase des Wasser- und Salzhaushalts und folglich für die Regulierung des Blutdrucks von zentraler Bedeutung. Bei der pathophysiologischen Entstehung und beim Fortschreiten von Fibrose- und Hypertrophie-assoziiierter Erkrankungen spielt das RAAS ebenfalls eine entscheidende Rolle [4, 5].

Unterschieden wird zwischen dem klassischen systemischen RAAS, bei dem die Synthese und Sekretion der Protease Renin durch die Niere eine Schlüsselrolle spielt, und dem lokalen gewebsspezifischen RAAS außerhalb der Niere [4]. Das lokale System scheint unter anderem im Herzen, in den Blutgefäßen, Nebennieren und im Gehirn ein wichtiger Faktor bei der Regulation von Organfunktionen zu sein [6, 7].

Das Substrat der Enzymkaskade des RAAS (Abb. 2.1) ist das α_2 -Glykoprotein Angiotensinogen, welches vorwiegend in der Leber synthetisiert und konstitutiv in den Blutkreislauf sezerniert wird [8-11]. Vom Oligopeptid Angiotensinogen wird durch die

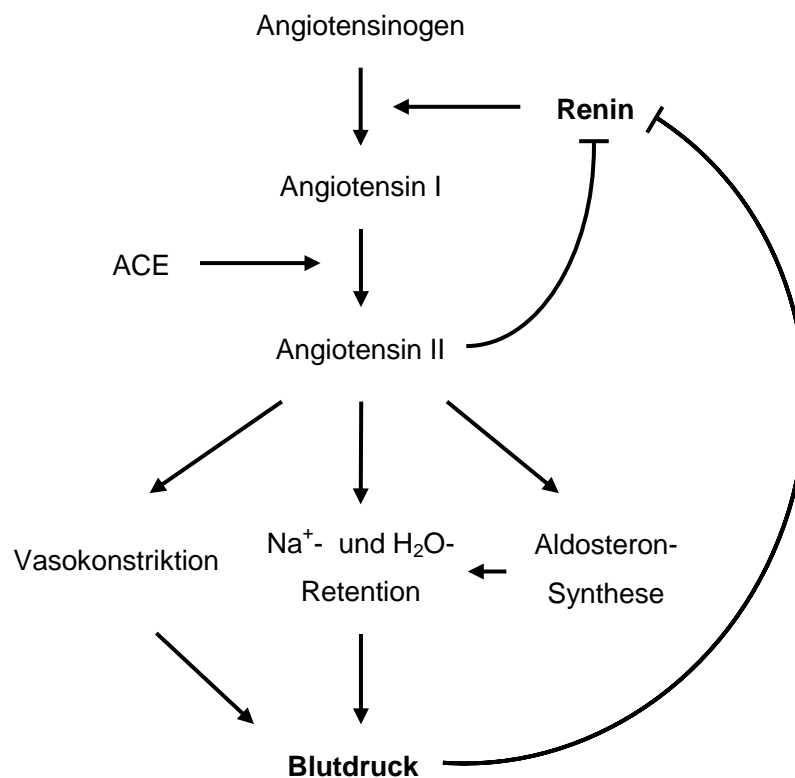


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems

Aspartylprotease Renin, die vor allem von den juxtaglomerulären Epitheloidzellen der Niere synthetisiert und in das Blutplasma abgegeben wird, das biologisch inaktive Angiotensin I (ANG I) abgespalten [8, 9, 12]. Von diesem Dekapeptid werden im nächsten Schritt durch die in der Zellmembran verankerte Metalloprotease Angiotensin Converting Enzyme (ACE), die hauptsächlich im Lungenepithel exprimiert wird, zwei Aminosäuren abgespalten [9, 13]. Dabei wird der wichtigste physiologische Mediator des klassischen RAAS, das aktive Angiotensin II (ANG II), gebildet [9, 14].

ANG II bindet an ANG II-Rezeptoren, von denen bisher die Typen 1, 2 und 4 (AT₁-R, AT₂-R und AT₄-R) bekannt sind, und führt dadurch direkt und indirekt zum Anstieg des systemischen Blutdrucks, wobei dem AT₁-R die größte Bedeutung zukommt [8, 9, 15]. ANG II-Rezeptoren werden von Endothelzellen, aber auch von Zellen des endokrinen und des kardiovaskulären Systems exprimiert [15].

Der AT₁-R vermittelt bei Erhöhung der ANG II-Konzentration im Blut neben einer starken Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen, die zum Anstieg des Gefäßwiderstands und infolgedessen direkt zum Blutdruckanstieg führt, eine Steigerung der Aldosteronsynthese und -sekretion in der Nebenniere [9, 14]. Aldosteron bewirkt eine gesteigerte tubuläre Rückresorption von Na⁺ und H₂O in der Niere und führt folglich über die Zunahme des Blutvolumens indirekt zum Blutdruckanstieg [8, 16]. Über das zentrale Nervensystem löst ANG II zudem ein Durstgefühl und Salzhunger aus [9, 17].

Beim Menschen ist unter physiologischen Bedingungen die Plasmaninkonzentration der limitierende Faktor der RAAS-Aktivität, da Angiotensinogen und ACE im Organismus im Überfluss vorhanden sind. Die Abspaltung von ANG I durch Renin ist damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des RAAS und folglich auch für die ANG II-Produktion [18, 19]. Aus diesem Grund setzen viele negative Rückkopplungsmechanismen zur Regulation des RAAS an der Produktion und Ausschüttung von Renin an. Unter anderem führen eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks, des Perfusionsdrucks in der Niere, der tubulären Kochsalz- und der ANG II-Plasmakonzentration zu dessen Inhibition [8, 20-22].

Im Zuge vieler ausführlicher Studien haben sich seit der Entdeckung des Renins durch Tigerstedt und Bergmann im Jahre 1898 die Erkenntnisse über das RAAS immer weiter verbessert und diverse Medikamente wurden entwickelt, die an verschiedenen Stellen an diesem System pharmakologisch angreifen [9]. Die

Medikamentengruppen, die im Moment therapeutisch angewandt werden, sind ACE-Hemmer, AT₁-R-Antagonisten, Aldosteron-Antagonisten und Renin-Hemmer. Als Indikation für diese sogenannten RAAS-Inhibitoren gelten unter anderem arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, Prophylaxe von Herzinfarkt und Schlaganfall, diabetische Nephropathie und primärer und sekundärer Hyperaldosteronismus [23].

2.2 Die juxtaglomeruläre Epitheloidzelle

Außer in der Niere, in der Renin überwiegend synthetisiert wird, findet man Renin produzierende Zellen im Zusammenhang mit lokalen RAAS auch im Gehirn, in den Nebennieren und im Herzen [6, 7, 24]. In der Niere wird Renin hauptsächlich in Zellen der Media afferenter Arteriolen nahe dem vaskulären Pol, der in das Kapillarnetzwerk der Glomeruli übergeht, synthetisiert und bis zur Sekretion gespeichert [8, 24-26]. Diese Myofibroblasten-artigen Zellen werden aufgrund ihrer Lokalisation und epitheloiden Form als juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JG-Zellen) bezeichnet und erscheinen durch die große Zahl an elektronenmikroskopisch dichten Reninspeichervesikeln, die sie enthalten, ultrastrukturell als granuliert Zellen. Die Anzahl an JG-Zellen kann sich je nach Spezies und Pathophysiologie erheblich unterscheiden [27]. Zusammen mit der Macula densa (MD), die sich aus spezialisierten Endothelzellen im distalen Tubulus des Nephrons zusammensetzt, und den extraglomerulären Mesengialzellen bilden die JG-Zellen der afferenten Arteriole den sogenannten juxtaglomerulären Apparat (JGA) (Abb. 2.2), der an der Regulation des Blutdrucks und der Filtrationsrate des Glomerulus beteiligt ist [29].

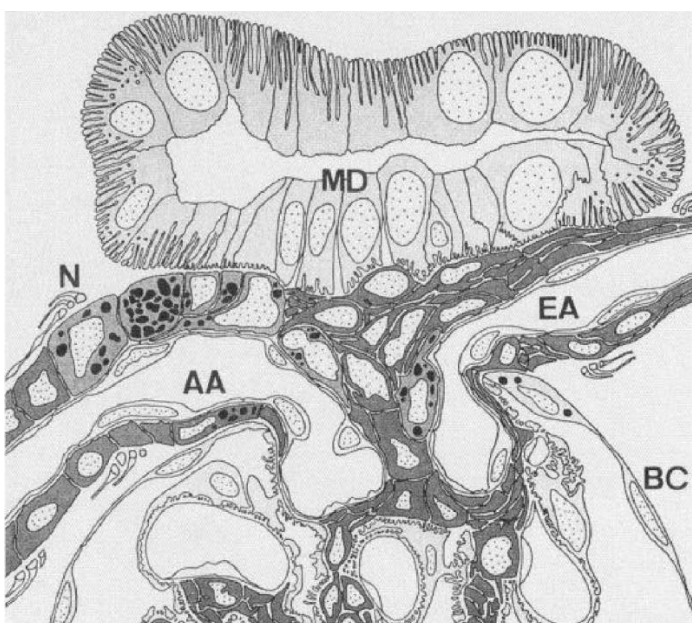


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Gefäßpols mit juxtaglomerulärem Apparat (JGA)

Der JGA besteht aus afferenter Arteriole (AA), Macula densa (MD), JG-Zellen und den dazwischen liegenden extraglomerulären Mesengialzellen. Die Media der afferenten Arteriole enthält granuliert JG-Zellen. Die afferente Arteriole und die efferente Arteriole (EA) werden von Nervenaxonen (N) innerviert. BC Bowman'sche Kapsel. [28]

2.3 Reninsynthese und Sekretionsvesikel

Renin wird bei vielen Tieren und auch beim Menschen durch ein einzelnes Gen (Ren-1) kodiert [30]. Manche Mäusestämme weisen jedoch zwei Reningene auf (Ren-1D und Ren-2), während andere, wie auch der in dieser Arbeit verwendete Mäusestamm C57/Bl6, nur ein Gen (Ren-1C) aufweisen [31]. Aufgrund der nahen genetischen Verwandtschaft geht man davon aus, dass Ren-2 aus einer Genduplikation von Ren-1 entstanden ist [32]. Anhand einer systematischen Studie wurde aufgezeigt, dass sich die Plasmareninkonzentration zwischen Mäusen mit einem und zwei Reningenen jedoch nicht unterscheidet [33].

Renin wird als Prä-Pro-Renin transkribiert und translatiert. Die Prä-Sequenz wird nach Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten und das daraus entstehende enzymatisch inaktive Pro-Renin wird im Golgi-Apparat weiter prozessiert. Entweder wird Pro-Renin mit Mannose-6-Phosphatresten glykosyliert und mit Hilfe von Mannose-6-Phosphatrezeptoren in elektronenmikroskopisch dichten, Lysosomen-artigen Dense-Core-Vesikeln (DCVs) für die kontrollierte Exozytose gespeichert oder das Protein wird nicht glykosyliert und stattdessen konstitutiv durch sogenannte "klare" Vesikel als inaktives Renin aus der Zelle abgegeben. Entscheidend für die regulierte Freisetzung von Renin ist die Glykosylierung des Pro-Renin [34, 35].

Die Proteine, die von den zwei Reningenen kodiert werden, stimmen auf Aminosäureebene fast gänzlich überein, die Ren-1 Proteine besitzen aber an drei Asparaginresten Glykosylierungsstellen, die die Ren-2 Proteine nicht aufweisen [35, 36]. Daher wird nur aus Ren-1 synthetisiertes Renin in den DCVs gespeichert und das Ren-2 Protein konstitutiv sezerniert [37].

In sogenannten Reninspeichervesikel-Vorstufen wird Renin durch das Abspalten des n-terminalen Pro-Segments aktiviert, wodurch die Vesikel zu DCVs reifen, in denen Renin bis zur kontrollierten Exozytose gespeichert wird [38, 39]. Begünstigt wird die Proteolyse durch den niedrigen pH-Wert von 4-6 in den Vesikeln. Der genaue Vorgang der Proteolyse ist noch nicht geklärt, jedoch sind vermutlich in den DCVs nachgewiesene Proteasen, wie beispielsweise Prohormon-Konvertase PC5 [40], Cathepsin B [41, 42] und Kallikreine [43], daran beteiligt. Diese sogenannten Prorenin Processing Enzymes (PPE) könnten sich möglicherweise in Zukunft auch als neuer pharmakologischer Ansatzpunkt eines RAAS-Inhibitors erweisen [41].

2.4 Regulation der Reninsynthese und -sekretion in juxtaglomerulären Zellen

Die Reninsynthese und -sekretion führen durch die Signalkaskade des RAAS zur Erhöhung der ANG II-Konzentration im Blut und werden aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Beeinflussung des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushaltes durch komplexe Regulationsmechanismen kontrolliert. Diese finden einerseits auf systemischer und andererseits auf lokaler Ebene statt. Auf zellulärer Ebene münden diese Kontrollmechanismen in drei verschiedene intrazelluläre Signalwege.

2.4.1 Regulation durch systemische und lokale Faktoren

Bei der systemischen Regulation wirken der systemische Blutdruck, die Kochsalzzufuhr und die ANG II-Konzentration als negative Feedbackmechanismen. Auf lokaler Ebene werden diese systemischen Einflüsse, unter anderem durch die MD und einen Barorezeptor-Mechanismus, registriert. Das sympathische Nervensystem stimuliert die Reninproduktion und -freisetzung über β 1-Rezeptoren. Zusätzlich wirken sich auch systemische und lokal sezernierte Hormone und Autacoide auf die Reninaktivität aus.

2.4.1.1 Systemischer Blutdruck

Der systemische Blutdruck wird von vielfältigen Organsystemen wie dem zentralen Nervensystem, dem kardiovaskulären System, der Niere und den Nebennieren reguliert, wobei das RAAS eine entscheidende Rolle spielt [44] und die Niere vermutlich den wichtigsten Beitrag zur Langzeitregulierung des Blutdrucks leistet [45].

Eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und damit des renalen Perfusionsdrucks führt im Zuge einer negativen Feedback-Schleife zur Hemmung der Reninsynthese und -sekretion, während umgekehrt ein Blutdruckabfall zu dessen Förderung führt [46]. Ein Barorezeptor-Mechanismus in der Niere ist dabei wahrscheinlich für die Regulierung dieser Rückkopplung verantwortlich [47, 48]. Der intraluminale Druck verändert die Wandspannung der Gefäße, wodurch die Zellwand der JG-Zellen gedehnt wird. Aufgrund des dadurch veränderten Membranpotentials der JG-Zellen wird vermutlich die Reninsekretion vermindert [49, 50]. Der dafür notwendige Barorezeptor scheint sich in den Renin produzierenden Zellen zu befinden, da eine direkte mechanische Dehnung isolierter JG-Zellen ebenfalls eine Verminderung der Reninsekretion bewirkt [8, 47, 50, 51]. Die Kalzium-Abhängigkeit dieses Druck-

abhängigen Mechanismus konnte an isoliert perfundierten Nagetiernieren bereits bestätigt werden [1, 52], weshalb angenommen wird, dass die mechanische Dehnung der Plasmamembran über dehnungsabhängige Kalzium-Kanäle zum vermehrten Kalzium-Einstrom in den JG-Zellen führt [51, 53].

2.4.1.2 Salzhaushalt

Als systemische Faktoren beeinflussen die nahrungsbedingte Salzaufnahme und der NaCl-Haushalt des Körpers die Aktivität des RAAS. Ähnlich dem Blutdruck führt die vermehrte Kochsalzzufuhr über eine negative Rückkopplungsschleife zur Hemmung und die verminderte Salzaufnahme zur Anregung der Reninproduktion und -sekretion [46]. Der in MD-Zellen apikal gelegener $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) fungiert als Sensor der Chlorid-Konzentration im distalen Tubulus [54]. Die MD nimmt damit eine wichtige Funktion bei der Kopplung der Reninaktivität an akute Veränderungen der Salzkonzentration ein [4, 55, 56]. Den von COX-2 abgeleiteten Prostanoiden, beispielsweise Prostaglandin E_2 , und Stickstoffmonoxid (NO) wird bei der kurzfristigen salzabhängigen Regulation der Reninsynthese und -freisetzung ein lokal modulierender Effekt zugeschrieben [4, 46, 57-61]. Welche Mechanismen bei der langfristigen Regulation des Salzhaushalts beteiligt sind, ist noch nicht geklärt. Eine Beteiligung des MD-Mechanismus konnte bislang nicht nachgewiesen werden [4].

2.4.1.3 Sympathisches Nervensystem

Eine Innervation durch das sympathische Nervensystem findet sich nicht nur an den Blutgefäßen der Niere, sondern auch im Tubulussystem und damit auch am JGA [8, 62]. Die Stimulierung der JG-Zellen durch den Sympathikus bewirkt über die Aktivierung des cAMP-Signalwegs eine Steigerung der Reninsekretion [63]. Die Wirkung des Nervensystems an den JG-Zellen wird überwiegend über β_1 -adrenerge Rezeptoren vermittelt [8, 64, 65]. Für die Aufrechterhaltung der basalen Plasmanreninkonzentration ist die sympathische Innervation über lokale Nervenendigungen oder zirkulierende Katecholamine entscheidend, wobei die Aktivierung der β_1 -Adrenorezeptoren offenbar für eine ausreichende Reninsynthese sorgt, um jederzeit auf externe Reize mit einer adäquaten Ausschüttung von Renin reagieren zu können [4, 66]. Für die Anpassung der Reninsekretion auf andere Stimuli, wie beispielsweise einer veränderten Salzzufuhr, scheint das lokale Nervensystem allerdings nicht wesentlich zu sein [55, 67, 68].

2.4.1.4 Angiotensin II

Die Reninproduktion und -freisetzung wird ebenfalls über eine negative Feedback-Schleife durch die ANG II-Plasmakonzentration reguliert, wobei eine niedrige Konzentration oder eine Blockade der AT₁-R zur Zunahme und eine erhöhte ANG II-Konzentration zur Abnahme der Reninaktivität führt [8, 69, 70]. Die Wirkung von ANG II wird scheinbar direkt über AT₁-Rezeptoren, die auf JG-Zellen festgestellt werden konnten, vermittelt [8, 21, 71]. In den JG-Zellen führt ANG II zur Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und damit zur Hemmung der Reninsekretion [72]. Weitere Effekte von ANG II, die das RAAS und den Blutdruck betreffen, wurden bereits im Abschnitt 2.1 erläutert.

2.4.1.5 Weitere Hormone und Autacoide

Das Reninsystem wird neben den bereits erwähnten Faktoren noch von vielzähligen weiteren Hormonen und Autacoiden beeinflusst. Neben dem bereits erwähnten inhibitorischen Effekt von ANG II und der stimulierenden Wirkung von Katecholaminen an β 1-Adrenozeptoren erfährt die Reninproduktion und -sekretion unter anderem durch Prostaglandine und Dopamin eine stimulierende und durch Adenosin eine hemmende Modulation [61, 73-75]. Das Calcitonin Gene-Related Protein [76], Bradykinin [77], Histamin [78], Aldosteron [79], Glucagon [74], Parathormon [80] und die Schilddrüsenhormone Thyroxin und Triiodthyronin [81] stimulieren ebenfalls die Reninfreisetzung. Der Tumornekrosefaktor α [82], das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) [83], die Interleukine IL-1 und IL-6 [84], der Platelet Activating Factor [85], Endotheline [2, 86] und Vasopressin [87] hemmen hingegen die Reninsekretion.

2.4.2 Regulation auf zellulärer Ebene

Auf der zellulären Ebene wird die Reninsynthese und -sekretion im Wesentlichen durch die klassischen Second Messenger Kalzium (Ca^{2+}), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) reguliert (Abb. 2.3).

2.4.2.1 Der cAMP-Signalweg

Im Hinblick auf die intrazellulären Signalwege ist der Second Messenger cAMP der Hauptstimulator der Reninexpression und -sekretion. Stimuliert wird der cAMP-Weg unter anderem von den β -Adrenozeptoren und den Prostaglandin E₂ und I₂ [75, 88, 89]. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kann durch die vom

$G_s\alpha$ -Protein übermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), durch die Inhibition von cAMP-Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu 5'-AMP hydrolysieren, oder direkt pharmakologisch erfolgen [90-92]. In den JG-Zellen sind vermutlich die Adenylatbcyclasen AC-5 und AC-6, sowie die Phosphodiesterasen PDE-3 und PDE-4 die entscheidenden beteiligten Isoformen [91-95]. Der erhöhte cAMP-Spiegel führt möglicherweise über die Aktivierung der Proteinkinase A zur Phosphorylierung weiterer bisher noch nicht bekannter Proteine und dabei über verschiedene Wege zur Erhöhung der Reninexpression [92, 96]. Der exakte Wirkmechanismus von cAMP ist jedoch noch nicht bekannt.

2.4.2.2 Intra- und extrazelluläre Kalzium-Konzentration

Die Hauptinhibition der Reninsekretion in JG-Zellen wird durch die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst [72]. Dies wird als Ca^{2+} -Paradoxon bezeichnet, da in fast allen anderen sekretorischen Zellen, mit Ausnahme der Zellen der Nebenschilddrüse, ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel stimulierend auf Sekretionsmechanismen wirkt [91, 97, 98]. In JG-Zellen stehen die intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen positiv miteinander in Beziehung. Eine Senkung der

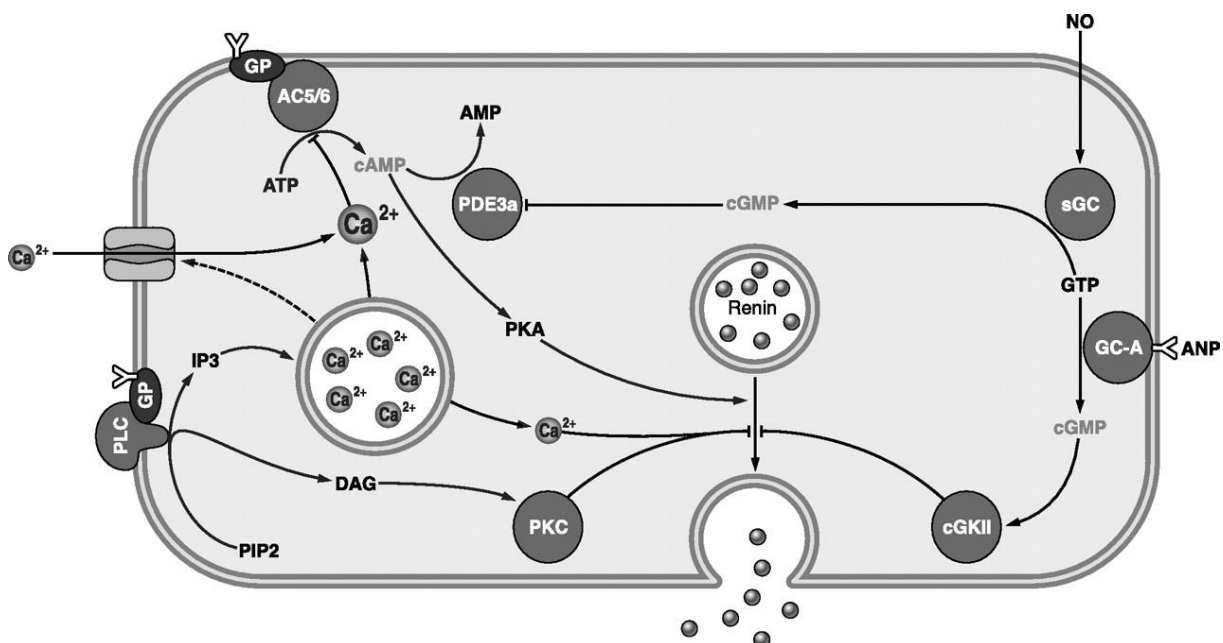


Abb. 2.3: Intrazelluläre Signalwege zur Regulation der Reninsekretion

ANP Atrial Natriuretisches Peptid, AC5/6 Adenylatcyclase 5/6, AMP Adenosinmonophosphat, ATP Adenosin-triphosphat, Ca^{2+} Kalzium-Ionen cAMP zyklisches AMP, cGKII cGMP-abhängige Proteinkinase Typ 2, cGMP zyklisches Guanosinmonophosphat, DAG Diacylglycerol, GC-A Guanylatcyclase A (pGC), GP GTP-Bindeprotein, GTP Guanosin-triphosphat, IP3 Inositol-1,4,5-Triphosphat, NO Stickstoffmonoxid, PDE3a cAMP-Phosphatdiesterase 3a, PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PKA Proteinkinase A, PKC Proteinkinase C, PLC Phospholipase C, sGC lösliche Guanylatcyclase. [4]

extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt vermutlich über einen daraus resultierenden verminderten Ca^{2+} -Einstrom zur Abnahme des zellulären Ca^{2+} -Spiegels und daraufhin zum Anstieg der Reninsekretion in JG-Zellen [52, 86, 99]. Der auf den Renin-sezernierenden Zellen vorhandene " Ca^{2+} sensing"-Rezeptor könnte ebenfalls einen Beitrag zur Regulation durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration leisten [100, 101]. Viele Hormone wie beispielsweise die Vasokonstriktoren ANG II, Endothelin und Vasopressin führen in JG-Zellen durch eine Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms oder durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Hemmung der Reninfreisetzung [20, 72, 91, 102, 103]. Die genaue Wirkweise der zellulären Ca^{2+} -Konzentration ist noch nicht geklärt, jedoch könnten unter anderem die Aktivierung der Proteinkinase C und Calmodulin-abhängige Mechanismen, wie die Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, eine Rolle spielen [8, 18, 97]. Es ist ebenfalls denkbar, dass den Adenylatcyclasen AC-5 und AC-6, die durch Kalzium gehemmt werden, auch bei der Verknüpfung zwischen dem hemmenden Effekt von Kalzium und der stimulierenden Wirkung des cAMP-Signalwegs, eine wichtige Rolle zukommt [91, 104].

2.4.2.3 Der cGMP-Signalweg

Im Gegensatz zu cAMP und Kalzium, kann das von Guanylatcyclasen (GC) produzierte cGMP die Reninsekretion in JG-Zellen stimulieren und inhibieren [18, 105]. Dabei hängen die Effekte vermutlich von der jeweiligen intrazellulären cGMP-Konzentration ab. Niedrige cGMP-Konzentrationen hemmen offenbar die PDE-3, was im Anstieg des cAMP-Spiegels resultiert und folglich die Ausschüttung von Renin fördert [83, 92, 105, 106]. Hohe cGMP-Spiegel aktivieren jedoch scheinbar eine cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII), die mit Vesikeln assoziiert ist und auf noch ungeklärte Weise die Reninfreisetzung inhibiert [107, 108]. Zudem sind die gegenläufigen cGMP-Signalwege wohl räumlich voneinander getrennt. Die PDE-3 befindet sich gemeinsam mit der von NO aktivierten löslichen Guanylatcyclase (sGC) im Zytosol, während eine von ANP induzierte Membran-gebundene Guanylatcyclase (pGC) nahe der Vesikel-assoziierten cGKII lokalisiert ist [4, 83, 106, 109, 110]. Das durch die sGC erzeugte cGMP könnte demzufolge die PDE-3 hemmen und den stimulierenden Effekt von NO auf die Reninfreisetzung erklären, wohingegen das von der pGC synthetisierte cGMP die cGKII aktivieren und dadurch die inhibierende Wirkung von ANP auf die Reninsekretion begründen würde [4, 8, 46, 111]. In humanen embryonalen Nieren- und in vaskulären glatten Muskelzellen konnte

bereits eine räumliche Trennung der durch NO und ANP aktivierten cGMP-Signalwege festgestellt werden [112, 113].

2.5 Connexine und Gap Junctions

Die direkte und indirekte Zellkommunikation spielen eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Regulationssignalen. Die sogenannte „indirekte“ Zell-Zell-Kommunikation basiert auf Kontakt der Zellen über Bestandteile der extrazellulären Matrix [114, 115] oder weitverbreitet auf der Abgabe von Hormonen, Neurotransmittern, Ionen oder anderer Moleküle in den Extrazellulärraum (ERZ). Diese Moleküle werden über Rezeptoren [116-118], freie Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran oder über spezifische Transportproteine oder Kanäle in die Empfängerzelle aufgenommen [114, 119, 120]. Die „direkte“ Zell-Zell-Kommunikation benötigt hingegen einen unmittelbaren Kontakt zwischen den kommunizierenden Zellen und folglich keine extrazellulären Mediatoren. Direkte Kontakte werden durch Zelladhäsionsglykoproteine [115] oder Kanalproteine, Connexine (Cx) genannt [121, 122], vermittelt, wobei der Fokus in dieser Arbeit auf interzellulären Kontakten über Connexine liegt.

2.5.1 Allgemeiner Aufbau

Beim Menschen sind bisher 21 und bei der Maus 20 verschiedene Cx-Isoformen bekannt, wobei die unterschiedlichen Connexine nach ihrem Molekulargewicht benannt werden, Connexin 40 weist beispielsweise eine Masse von 40 kD auf. Connexine, die nur bei der Maus bzw. ausschließlich beim Menschen vorkommen, erhalten den Zusatzbuchstaben „m“ bzw. „h“ am Anfang ihrer Bezeichnung (z.B. mCx33, hCx25) [123]. Des Weiteren werden Connexine bei Mäusen und Menschen in die Untergruppen α , β , γ , δ , ϵ eingeteilt, wobei einige Connexine noch nicht einwandfrei klassifiziert werden konnten [124, 125].

Die Cx-Gene weisen eine gemeinsame Grundstruktur auf. Die meisten Gene bestehen aus 1-3 Exonen, wobei sich die gesamte kodierende Sequenz oft ohne Unterbrechung auf Exon 2 oder Exon 3 befindet. In verschiedenen Geweben werden manche dieser Gene durch verschiedene Promoter alternativ transkribiert und einige Gene haben Exone, die auf unterschiedliche Weise gesplacet und transkribiert werden können [123].

Alle Connexine bilden vier α -Helix Domänen aus, die die Membran durchspannen und durch zwei extra- und eine intrazelluläre Schleife verbunden sind (Abb. 2.4). Die zwei extrazellulären Schleifen weisen bei allen Connexinen außer Cx31 je drei Cystein-Reste auf, sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und für die Ausbildung eines Gap Junction-Kanals essenziell [114, 126-129]. Der intrazelluläre Abschnitt beinhaltet sowohl die NH_2 -terminale Region, die in allen Connexinen eine ähnliche Länge aufweist, als auch die COOH -terminale Region, dessen Länge und enthaltene Sequenzmotive sich bei den verschiedenen Cx-Isoformen unterscheiden [114, 129-131].

Connexine lagern sich zu hydrophilen Hexameren zusammen, in deren Mitte sich eine Kanalpore bildet. Diese Hexamere, Connexone oder Halbkanäle (Hemichannel) genannt, konzentrieren sich meist an Stellen der Zellmembran, die einer benachbarten Zelle gegenüberliegen und an denen sich der EZR auf einen 2-3 nm weiten Spalt reduziert hat (Abb. 2.5). An diesen Stellen formieren sich vermehrt Gap Junction-Kanäle, die sich jeweils aus einem Connexon der einen Zelle und einem Connexon einer benachbarten Zelle via einem End-zu-End-Kontakt zusammensetzen. Dadurch bildet sich ein hydrophiler Zell-Zell-Kanal aus, der den EZR überbrückt und das

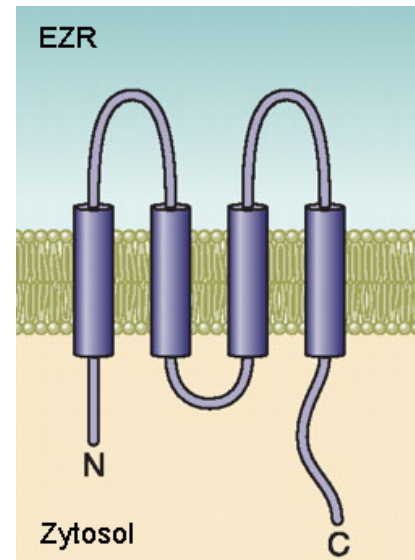


Abb. 2.4: Räumliche Proteinstruktur eines Connexins

Connexine besitzen vier Domänen, die die Zellmembran durchspannen und durch zwei Schleifen im Extrazellulärraum (EZR) und eine Schleife im Zytosol miteinander verbunden sind. Intrazellulär befindet sich die kurze NH_2 -terminale (N) und die längere COOH -terminale (C) Region des Proteins. [114]

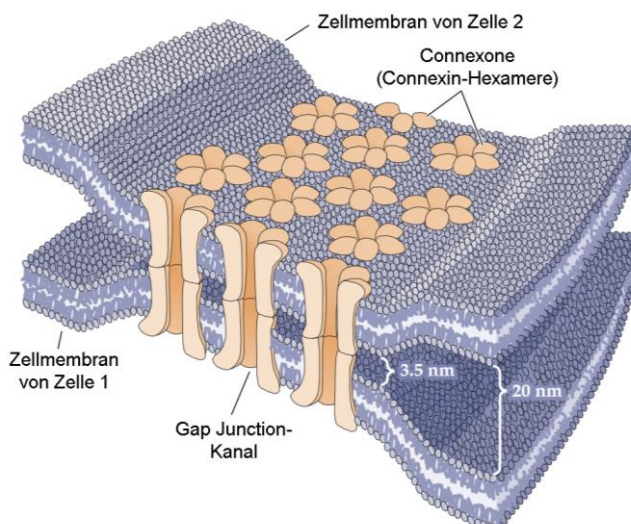


Abb. 2.5: Modell einer Gap Junction

Connexone bestehen aus jeweils sechs Connexinen. In Regionen, in denen sich die Zellmembranen benachbarter Zellen auf 2-3 nm annähern, können einander gegenüberliegende Connexone benachbarter Zellen aneinander docken und einen Gap Junction-Kanal bilden, der die Zytosolkompartimente der beiden Zellen miteinander verbindet. Die lokale Ansammlung mehrerer Einzelkanäle wird als Gap Junction bezeichnet. [132]

Zytoplasma der zwei Zellen direkt verbindet. Durch die Anhäufung mehrerer Gap Junction-Kanäle in der Zellmembran erscheint diese Ansammlung ultrastrukturell als Plaque, welcher dann als Gap Junction bezeichnet wird [133-135].

Da die meisten Zellen mehrere Cx-Isoformen exprimieren, können sich Connexone aus denselben (homomer) oder verschiedenen (heteromer) Connexinen und Gap Junction-Kanäle sich wiederum homo- oder heterotypisch aus zwei gleichen oder unterschiedlichen homomeren oder heteromeren Connexonen zusammensetzen (Abb. 2.6). Gap Junction-Kanäle bilden sich jedoch generell nur unter Connexinen derselben Untergruppe aus [134, 137].

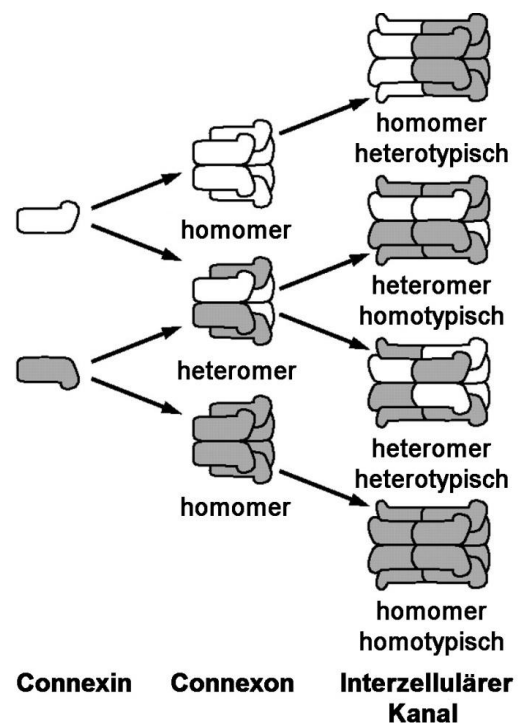


Abb. 2.6: Connexon- und Gap Junction-Kanal-Varianten [136]

2.5.2 Funktion von Connexinen

Gap Junctions ermöglichen einen meist bidirektionalen Austausch von Ionen und größeren Molekülen, wie Metaboliten und Nukleotiden [138-140]. Je nach Zusammensetzung der Gap Junction-Kanäle weisen diese eine unterschiedliche Selektivität, Permeabilität und Leitfähigkeit auf [114, 134, 137], wobei Größe und Ladung der Moleküle eine Rolle spielen. Je nach Konfiguration können Moleküle mit einer Masse von ca. 0,2 kD bis < 1,0 kD die Kanäle passieren [114, 133, 141]. Die Gap Junction-Kanäle sind dabei sogar zur Differenzierung relativ ähnlicher Moleküle wie cGMP und cAMP fähig [138-140]. Die Schließung und Öffnung der Gap Junction-Kanäle wird unter anderem durch den intrazellulären pH-Wert [142], Kalzium-Ionen [143] und Spannungsunterschiede zwischen den Zellen [144, 145] reguliert. Die Relevanz dieser Regulationsmechanismen ist jedoch noch nicht bekannt. Zudem führen verschiedene Pharmazeutika zur Blockade von Gap Junction-Kanälen oder unterstützen deren Funktion [146-148].

Werden Connexone in Zellmembranregionen eingebaut, die sich nicht in der Nähe einer benachbarten Zelle befinden, fungieren sie als Hemichannels, die die Abgabe

intrazellulärer Moleküle, besonders von Adenosintriphosphat (ATP) und Glutamat, in den EZR und umgekehrt die Aufnahme extrazellulärer und nicht Membran durchgängiger Moleküle ermöglichen. Die Selektivität der Hemichannels unterscheidet sich allerdings von der der Gap Junction-Kanäle [149, 150].

Gap Junctions leiten schnell und direkt intrazelluläre Signale in benachbarte Zellen weiter [121, 122]. Folglich spielen Gap Junction-Kanäle bei vielen Mechanismen eine wichtige Rolle und Cx-Mutationen können entsprechend auch zu einer Vielzahl von Pathologien und Erbkrankheiten führen [151, 152]. Unter anderem sind Gap Junctions an der Kontrolle von Gefäßwänden [153] und an der Sekretion der meisten Hormone beteiligt [114, 154, 155]. Connexine beeinflussen zudem verschiedene Zellvorgänge, die unabhängig von ihrer direkten Funktion als Gap Junctions und Hemichannels zu sein scheinen. Unter anderem interagieren manche Connexine mit dem Zytoskelett und mit anderen Zell- und Membranproteinen [156-158]. Einige Connexine scheinen sogar die Expression verschiedener Gene zu koordinieren und zu kontrollieren [159, 160]. Die Migration bestimmter Zellen wird ebenfalls durch Connexine beeinflusst [161, 162].

2.5.3 Connexine in der Niere

Die JG-Zellen sind mittels Gap Junctions sowohl untereinander als auch mit benachbarten Endothelzellen, mit glatten Muskelzellen des Vas afferens sowie des Vas efferens und mit extraglomerulären Mesangialzellen verbunden. Es wird daher angenommen, dass diese Zellen ein funktionelles Synzytium ausbilden [163-166].

Renin produzierende Zellen des JGA exprimieren im adulten Organismus überwiegend Connexin 40 (Cx40), wobei die typischen JG-Zellen nahe dem Gefäßpol von Glomeruli ebenfalls Cx37 und Cx43 exprimieren, wenn auch in geringerem Umfang. Während der Nierenentwicklung kann neben Cx40 auch Cx45 in geringen Mengen nachgewiesen werden [167]. Renin produzierende Zellen außerhalb des JGA, die in der Fetalperiode und bei retrograder Rekrutierung in Gefäßwänden größerer renaler Arterien vorliegen, exprimieren jedoch nur Cx40 [153, 167, 168]. Cx40 ist zudem eines der vier Hauptconnexine (Cx37, Cx40, Cx43, Cx45) der Nierengefäße, wobei es fast ausschließlich vom Endothel exprimiert wird [4, 169].

Es ist anzunehmen, dass Cx40 und Gap Junctions mit Cx40 zwischen JG-Zellen und den benachbarten Endothel- und den extraglomerulären Mesangialzellen einen Übertragungsweg für Signale vom Gefäßsystem und aus der MD zur Regulierung

der Reninsynthese und -expression darstellen [1, 170-172]. Cx40 Knockout-Mäuse (Cx40^{-/-}) weisen chronischen Bluthochdruck, eine erhöhte Anzahl an Renin produzierenden Zellen, einen Anstieg der Reninsynthese, eine veränderte Morphologie der Reninspeichervesikel im Transmissionselektronenmikroskop und einen Anstieg der Plasmareninkonzentration [1, 173, 174] und eine gestörte Relaxation der glatten Muskelzellen in Arteriolen [1, 173, 175, 176] auf. Studien weisen darauf hin, dass die veränderte Reninsynthese und -sekretion in Renin produzierenden Zellen von Cx40^{-/-}-Mäusen für den chronischen Bluthochdruck die entscheidende Rolle spielt [177, 178]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der sogenannte Barorezeptorreflex, ein von intrarenalem Blutdruck ausgelöster negativer Feedbackmechanismus auf die Reninexpression und -sekretion, bei Cx40^{-/-}-Mäusen gestört ist [1, 173, 174]. Obwohl zwischen den Zellen der MD und den JG-Zellen bislang keine Gap Junctions nachgewiesen wurden, ist bei Cx40^{-/-}-Mäusen offenbar der von der MD vermittelte Feedbackmechanismus ebenfalls gestört [172]. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass MD-Zellen möglicherweise ATP über Cx-Hemichannels in den EZR abgeben, was purinerge Kalzium-gekoppelte Rezeptoren von Mesangialzellen aktiviert [179, 180]. All dies weist darauf hin, dass die Übermittlung inhibitorischer Signale auf JG-Zellen von Cx40 abhängig ist. Eine experimentell induzierte einseitige Stenose einer Niere führte im Vergleich zum Wildtyp (Cx40^{+/+}) jedoch nicht zum Anstieg des Blutdrucks oder des Plasmareninspiegels. Eine Studie, in der Cx40 durch Cx45 in JG-Zellen ersetzt wurde, zeigte zudem, dass die Übertragung der inhibitorischen Signale nicht auf die speziellen Eigenschaften von Cx40 angewiesen ist [181]. Die Regulierung des Reninsystems durch die NaCl-Konzentration im distalen Tubulus und durch β -adrenerge Stimulatoren wird durch die Abwesenheit von Cx40 nicht wesentlich beeinträchtigt [1, 173].

Während sich das Fehlen von Cx37 nicht auf den Blutdruck auswirkt [182], könnte Cx43 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Reninsynthese und -sekretion spielen. In homozygoten Knockin-Mäusen, in denen Cx43 durch Cx32 ausgetauscht wurde, konnte weder durch eine induzierte einseitige Stenose einer Niere noch durch die Stimulation mit einer Kochsalzdiät ein Anstieg der Reninsekretion oder des Blutdrucks nachgewiesen werden [183].

Während JG-Zellen normalerweise in der Media afferenter Arteriolen und nur in Ausnahmefällen außerhalb der Media von Arterien vorzufinden sind [184], sind JG-Zellen bei Cx40^{-/-}-Mäusen im adulten Organismus im extraglomerulären Mesangium

und im periglomerulären Interstitium anstatt in der Wand von Arteriolen aufzufinden und weisen eher ein mesenchymales Aussehen auf. Während der Nierenentwicklung ist die Lokalisation der JG-Zellen nicht verändert. Folglich scheint Cx40 für die richtige Positionierung der JG-Zellen während ihrer Proliferation und Differenzierung bedeutsam zu sein [172, 185].

2.6 Sekretionsmechanismen

Während in fast allen eukaryotischen Zellen über eine sogenannte konstitutive Exozytose Vesikel mit der Zellmembran fusionieren, um neues Membranmaterial einzufügen oder extrazellulär wirkende Moleküle in den EZR abzugeben, existiert auch ein stark regulierter Exozytosemechanismus, der eine kontrollierte Freisetzung von Vesikelinhalten oder einen kontrollierten Einbau von Membranbestandteilen auf einen festgelegten physiologischen Reiz hin ermöglicht [186, 187]. Eine regulierte Exozytose ist der für die Zellfunktion entscheidenden Mechanismus bei der Freisetzung von Neurotransmittern aus Vesikeln in Synapsen [188, 189] und bei endo- und exokrinen Zellen, zum Beispiel bei Chromaffinzellen der Nebenniere [190] oder Mastzellen [191]. In den JG-Zellen der Niere wird gespeichertes Renin ebenfalls über einen regulierten Freisetzungsmechanismus aus DCVs sezerniert, wobei mögliche Exozytosevorgänge im Folgenden vorgestellt werden. Der genaue Ablauf der Reninsekretion ist derzeit noch nicht vollständig geklärt [8, 192-195].

2.6.1 Klassisch regulierte Exozytose

Essentiell für die klassische Fusion von Exozytosevesikeln mit der Zellmembran bei der Freisetzung von Speichervesikeln sind sogenannte SNAREs (soluble NSF-attachment receptors). Diese befinden sich auf den zur Fusion bestimmten gegenüberliegenden Membranen und lagern sich zu SNARE-Komplexen zusammen. Durch die bei der Bildung der Komplexe freiwerdende Energie wird die Membranfusion angetrieben [196-198]. Manche SNAREs sind auf bestimmte zelluläre Kompartimente beschränkt, wodurch jede Membran ein spezifisches SNARE-Set aufweist. Dies ermöglicht eine spezifische Paarung von SNAREs auf sich gegenüberliegenden Membranen und eine auf die dafür vorgesehenen Membranen beschränkte Fusion. Die genauen physikalischen Vorgänge, die zur Membranfusion führen, sind allerdings noch nicht genau geklärt. [198-200]. Bei der regulierten Exozytose werden einzelne Schritte der Komplexbildung, die schlussendlich zur

Bildung einer Fusionspore führen, von regulatorischen Proteinen kontrolliert [197, 201, 202]. Beispielsweise fungieren in der Vesikelmembran verankerte Synaptotagmine in Synapsen als Ca^{2+} -Sensoren und scheinen dadurch eine zentrale regulierende Rolle bei synaptischen Ca^{2+} -abhängigen Fusionsmechanismen zu haben [203, 204].

2.6.2 Compound-Exozytose

Im Gegensatz zur klassischen Exozytose, bei der jedes Vesikel einzeln mit der Zellmembran fusioniert, treten bei der Compound-Exozytose (CE) die Vesikel auch untereinander in Kontakt [205]. Zwei Formen der CE werden unterschieden (Abb. 2.7): Bei der sequentiellen CE, die in den meisten Fällen vorliegt, unter anderem in Azinuszellen des Pankreas, kommt es nach der Verschmelzung sogenannter Primärvesikel mit der Zellmembran zur Fusion von tiefer im Zytoplasma gelegenen Sekundärvesikeln mit den Primärvesikeln. Die Sekundärvesikel sind bei der sequentiellen CE erst nach der Fusion der Primärvesikel mit der Zellmembran zur Fusion mit den Primärvesikeln befähigt [207, 208]. Bei der

selteneren multivesikulären CE, die beispielsweise in Mastzellen vorkommt, fusionieren homologe Vesikel zuerst untereinander und anschließend mit der Plasmamembran [209]. Die sequenzielle und multivesikuläre CE können einzeln oder, zum Beispiel in Eosinophilen und β -Zellen des Pankreas, auch parallel auftreten [205, 206, 210, 211]. Die Regulation der beiden CE-Mechanismen ist noch nicht bekannt, jedoch scheint der Sinn der CE vorrangig in einer Maximierung der Sekretion für ein gewisses Zeitintervall zu liegen [205]. Neue Studien

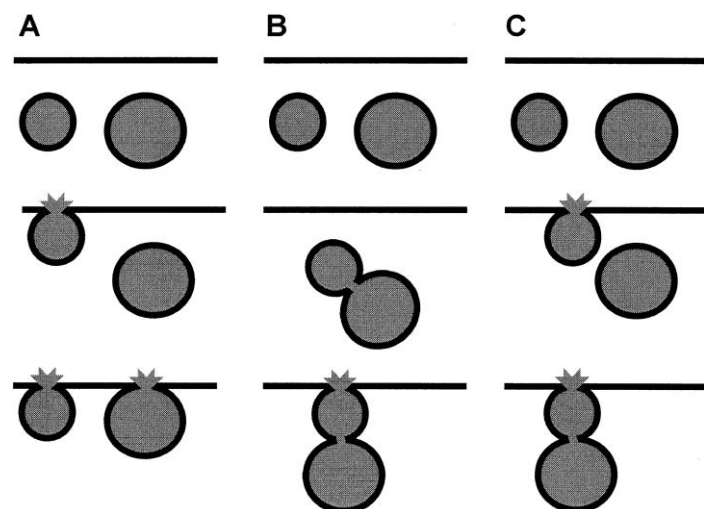


Abb. 2.7: „Klassische“ Exozytose versus Compound-Exozytose

Während bei der klassisch regulierten Exozytose (A) Vesikel unabhängig voneinander mit der Zellmembran verschmelzen, fusionieren bei der multivesikulären Compound-Exozytose (B) die homologen sekretorischen Vesikel untereinander, bevor der entstandene multivesikuläre Körper mit der Zellmembran verschmilzt. Bei der sequentiellen Compound-Exozytose (C) fusionieren Primärvesikel zuerst mit der Zellmembran. Im zweiten Schritt fusionieren weitere tiefer im Zytoplasma gelegene Vesikel mit der Membran des bereits mit der Zellmembran verschmolzenen Primärvesikels. [206]

weisen darauf hin, dass die Einleitung der Primär- und Sekundärfusion durch unterschiedliche SNARE-Komplexe stattfindet [212, 213]. Die richtige zeitliche Abfolge der sequentiellen CE wird scheinbar durch verschiedene Proteine, zum Beispiel durch SNAP-23, oder durch andere Einflüsse, wie beispielsweise einer Änderung des Vesikel-pH-Werts, reguliert [213]. Für die multivesikuläre CE in Mastzellen wurde die Theorie geäußert, dass multivesikuläre Vesikelnetzwerke möglicherweise lange vor der Fusion mit der Zellmembran entstehen. Zudem wird angenommen, dass die Fusion der Vesikel untereinander unter Umständen durch die vorübergehende Verschmelzung einzelner Vesikel mit der Zellmembran initiiert wird, womit sich die sequentielle und die multivesikuläre CE biochemisch weitgehend nicht unterscheiden würden [205, 209].

2.6.3 Kiss and Run-Mechanismus

Anstatt der vollständigen Fusion von Vesikel und Zielmembran kommt es beim sogenannten *Kiss and Run*-Mechanismus zur kurzzeitigen Öffnung einer Fusionspore, die sich schnell wieder schließt, wodurch das Vesikel erhalten bleibt [214, 215]. Dieser Mechanismus wurde außer in synaptischen Vesikeln auch bei sekretorischen Vesikeln von endokrinen Zellen nachgewiesen, zum Beispiel in Chromaffinzellen der Nebenniere und β -Zellen des Pankreas [216, 217]. Der Mechanismus ist SNARE-vermittelt und läuft in seinen Grundzügen wie die klassische Exozytose ab. Der „klassischen“ Exozytose wirkt dabei womöglich ein intaktes Zytoskelett entgegen [218]. Zudem wird diskutiert, ob für die Schließung der Fusionsporen die bei der Abspaltung und Rückgewinnung Clathrin-beschichteter Endozytosevesikel angewandten intrazellulären Zellvorgänge involviert sind [219, 220].

2.6.4 Regulierte lysosomale Sekretion

In manchen Zellen, beispielsweise in Melanozyten [221] und in Zellen mit hämatopoietischem Ursprung [222, 223], werden sekretorische Produkte in einem abgeänderten lysosomalen Kompartiment, einem sogenannten sekretorischem Lysosom (SL), gespeichert. Die Ausschüttung von SLs ist ebenfalls SNARE-vermittelt [224, 225]. SLs weisen ebenso wie reguläre Lysosomen spezifische Membranproteine, lysosomale Proteine und einen erniedrigten pH-Wert auf [226]. Im Gegensatz zu regulären Lysosomen enthalten sie jedoch noch weitere Bestandteile, die zur Sekretion bestimmt sind [227].

Es gibt Hinweise darauf, dass in JG-Zellen der Niere Renin in SLs gespeichert wird, da mehrere lysosomenspezifische Proteasen in Reninspeichervesikeln vorgefunden wurden [228, 229]. Außerdem sind die DCV in JG-Zellen, ebenso wie die SLs in Melanozyten und hämatopoietischen Zellen, in Mäusen ohne LYST-Protein (lysosomal trafficking protein), das mit für die ordnungsgemäße Reifung und Abschnürung von Membranen der Lysosomen zuständig ist, anormal vergrößert [230, 231].

2.7 Zielsetzung

Das RAAS ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung des Blutdrucks, wobei beim Menschen unter physiologischen Bedingungen die Plasmaninkonzentration den limitierenden Faktor der RAAS-Aktivität darstellt. In den JG-Zellen der Niere wird gespeichertes Renin über einen regulierten Freisetzungsmechanismus aus Dense-Core-Vesikeln sezerniert, wobei der cAMP-Signalweg die Reninsekretion stimuliert und eine Erhöhung der extra- und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration diese inhibiert.

Cx40^{-/-}-Mäuse weisen im unstimulierten Zustand Bluthochdruck, einen Anstieg der Reninsynthese und der Plasmaninkonzentration, eine veränderte Morphologie der Reninspeichervesikel im Transmissionselektronenmikroskop und eine gestörte Rückkopplung des Barorezeptorreflexes auf. In IPN-Versuchen von Wagner et al. wurde festgestellt, dass unter Stimulation mit Isoproterenol, das den cAMP-Signalweg aktiviert, in Cx40^{-/-}-Mäusen die RSR regulär ansteigt, wohingegen unter Stimulation mit EGTA, das zur Abnahme der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, in Cx40^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp eine Zunahme der RSR nur in geringem Maße stattfindet [1]. Folglich wird angenommen, dass Cx40 für die Einleitung bzw. Förderung der Absenkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch eine Veränderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wesentlich ist. Da in JG-Zellen die Hauptinhibition der Reninsekretion durch die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird, weist all dies darauf hin, dass Cx40 bei der Übermittlung inhibitorischer Signale auf JG-Zellen eine zentrale Rolle spielt und diese Prozesse im Cx40^{-/-} gestört sind.

Aufgrund des fehlenden Anstiegs der RSR beim mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} in IPN-Versuchen und der veränderten Vesikelmorphologie im unstimulierten Cx40^{-/-} wird in dieser Arbeit untersucht, in welchem Ausmaß die Abwesenheit von Cx40 die Reninsekretion und die Morphologie von Reninspeichervesikeln auf ultrastruktureller

Ebene beeinflusst. Dazu werden im Zuge dieser Dissertation Wildtyp- und Cx40^{-/-}-Mäuse mittels der IPN-Methode im unstimulierten und im stimulierten Zustand präpariert und anschließend ultrastrukturell analysiert und miteinander verglichen. Zur pharmakologischen Stimulation der Reninsekretion werden in dieser Arbeit jeweils 10 nM Iso bzw. 3,1 mM EGTA verwendet, um mögliche morphologische Veränderungen in den JG-Zellen des Cx40^{-/-} unter Aktivierung bzw. Hemmung der hierbei entscheidenden intrazellulären Signalwege, cAMP bzw. die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, feststellen zu können. Nach der Gewebefixierung werden die TEM-Serienaufnahmen der erstellten Ultradünnschnitte digitalisiert und dreidimensional rekonstruiert.

Im ersten Teil der Arbeit werden JG-Zellen im unstimulierten und im mit Iso bzw. EGTA stimulierten Wildtyp untersucht, wobei diese Zellausschnitte von je einer Wildtyp-Maus stammen. Im zweiten Abschnitt werden JG-Zellausschnitte aus wiederum jeweils einer unstimulierten und einer mit Iso bzw. EGTA stimulierten Cx40^{-/-}-Maus betrachtet und mit dem Wildtyp verglichen. Dabei soll festgestellt werden, ob im Cx40^{-/-} ultrastrukturell ein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden kann und ob dieser nur die mit EGTA stimulierten JG-Zellen betrifft oder ob die unstimulierten und die mit Iso stimulierten JG-Zellen im Cx40^{-/-} ebenfalls im dreidimensionalen Raum nachweisbare morphologische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufzeigen.

Obwohl neuere Studien darauf hinweisen, dass die Compound-Exozytose bei der Maximierung der RSR ein relevanter Mechanismus sein könnte, ist der genaue Exozytosemechanismus von Renin nicht vollständig geklärt. Exozytose-Ereignisse in Form von Omega-ähnlichen Strukturen oder der Ausschüttung von elektronendichtem Vesikelmateriale konnten bisher nur sehr selten festgestellt werden. Deshalb werden im letzten Teil dieser Arbeit in den JG-Zellausschnitten des Wildtyps und des Cx40^{-/-} noch einmal gezielt Kontakte der RV mit der Zellmembran betrachtet, um möglicherweise neue Erkenntnisse über den Ablauf des Reninsekretionsvorgangs in JG-Zellen zu erhalten. Hierbei werden ebenfalls die Anzahl der Zellmembran-Kontakte und die Morphologie der RV mit Zellmembran-Kontakten beurteilt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoclav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Isotec Druckmesser	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kameras	AxioCam MRm, Zeiss, Jena TEM-1000, TVIPS-Tietz, Gauting
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena Phillips CM12 TEM, Fei & Co, Eindhoven, NL
Mikrotome	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar EM UC7, Leica, Wetzlar CM 3050 S, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
Mikrowelle	Leica EM AMW, Leica, Wetzlar
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Scantisch	Motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Con-

Gerät	Hersteller
Servo-Controller für Perfusion	troller), Ludl Electronic Products, München SCP 704, Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen
Vakuumzentrifuge	Univabp 150 H UniEquip, Martinsried

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Diamantklingen	Diatome, Biel, CH
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Kupfer Grids	G2500C 2mm x 1mm, Plano, Wetzlar
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Nickel Grids	G2500N 2mm x 1mm, Plano, Wetzlar
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nürnberg
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nürnberg
Skalpellklingen	Feather, Köln

3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
α -Ketoglutarat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bleicitrat Ultrastain II	Leica, Wetzlar
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Citratmonohydrat	Merck, Darmstadt
Epoxy-Einbettungsmittel-Kit	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Merck, Darmstadt
Flucloxacillin	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma, Deisenhofen
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
KCl	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
L-Lactat	Sigma, Deisenhofen
L-Maleat	Sigma, Deisenhofen
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O (Borax)	Merck, Darmstadt

Produkt	Hersteller
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Nuclease-freies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
OsO ₄ 2%	Fluka, Neu-Ulm
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, GTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C ₆ H ₈ N ₂ x HCl	Sigma, Deisenhofen
Pioloform FN65 Pulver	Plano, Wetzlar
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RIA-Kit	Byk & DiaSorin, Dietzenbach
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane	Abbott, Wiesbaden
Tris(hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Vasopressin-8-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Xylazin	Ratiopharm, Ulm

3.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien für sämtliche Puffer und Lösungen in H₂O_{bidest} gelöst.

3.1.4.1 IPN-Methode

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

Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung

Glucose	8,7 mM
Pyruvat	0,3 mM
L-Lactat	2,0 mM
α -Ketoglutarat	1,0 mM
L-Maleat	1,0 mM
Harnstoff	6,0 mM
BSA	6 g/100 ml
Vasopressin 8-Lysin	1 mU/100 ml
Gewaschene Erythrozyten (Human)	10 % Hämatokrit
Ampicillin	3 mg/100 ml
Flucloxacillin	3 mg/100 ml
Physiologische Aminosäuren	0,2-2,0 mM

Während der Perfusion wurde die Lösung fortlaufend gegen ein 10-faches Volumen derselben Lösung ohne Erythrozyten und BSA dialysiert.

3.1.4.2 ElektronenmikroskopieEpon-Zusammensetzung

Komp. A: Glycidether	23 g
Komp. B: 2-Dodecetylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	15,40 g
Komp. C: Methylnadicanhydrit (MNA)	10,20 g
Komp. D: 2,4,6,-Tri-Dimethylaminomethylphenol (DMP 30)	0,77 g

Die Komponenten A - C in ein Becherglas einwiegen und 30 Minuten rühren. Anschließend Komponente D einwiegen und 30 Minuten rühren.

Cacodylat-Puffer

Natriumcacodylat	0,1 M, pH 7,4
Saccharose	1%

Uranylacetatlösung

Uranylacetat	4%
--------------	----

3.1.5 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007/2010* geschrieben. Zur Aufzeichnung der TEM-Bilder diente *EM-Menu 4.0*. Die Bildserien wurden mit *Adobe*

Photoshop CS5 und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA) bearbeitet. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mittels *Amira 5.4.3 visualization software* (Visage Imaging, USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* konstruiert.

Zur Literaturrecherche wurde *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden entsprechend dem "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" behandelt. Auf optimale Haltungsbedingungen für Nagetiere wurde geachtet (Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Folgende Tierstämme dienten als Versuchstiere für diese Arbeit:

Tierstamm	genetischer Hintergrund	Herkunft
C57/Bl6	C57/Bl6	Charles River, Sulzfeld
Cx40 ^{-/-}	C57/Bl6	Cor de Wit, Universität Lübeck

3.2.2 Isoliert perfundierte Niere (IPN)

3.2.2.1 Präparation der Nieren

Als Versuchstiere wurden 10-12 Wochen alte männliche Mäuse verwendet.

Betäubt wurden die Mäuse mittels einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (16 mg/kg KG). Anschließend wurde den Mäusen auf einer Wärmeplatte das Abdomen durch eine Inzision eröffnet. Die Bauchaorta wurde freigelegt und distal der rechten renalen Arterie geklammert, um die Perfusion der rechten Niere im nächsten Schritt nicht zu beeinträchtigen. Die Mesenterialarterie wurde mit einem Faden abgebunden und in die Aorta wurde eine metallene Perfusionskanüle (0,8 mm OD) distal der Klemme eingeführt. Die Klammer wurde daraufhin wieder entfernt und die Kanüle wurde bis zum Ursprung der rechten Nierenarterie geschoben und an dieser Position befestigt.

Anschließend wurde die Aorta proximal der rechten Nierenarterie abgebunden und die Perfusion in situ begonnen. Anfänglich wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet, um eine länger anhaltende Ischämie der rechten Niere zu umgehen.

Als Perfusionsmedium wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, die mit 94 % O₂/6 % CO₂ begast wurde, verwendet. Diese Lösung wurde zur kontinuierlichen Perfusion der Niere über ein beheiztes (37°C) 200 ml-Reservoir angeboten.

Im Anschluss entnahm man die Niere und legte sie in eine beheizbare Feuchtkammer, in der sie konstant mit einem Druck von 100 mmHg dialysiert wurde. Ein potentiometrischer Schreiber zeichnete den Perfusionsdruck auf, der im Inneren der Perfusionskanüle gemessen und mit Hilfe einer über Rückkopplung geregelten peristaltischen Pumpe konstant gehalten wurde.

Um den venösen Ausfluss für die Bestimmung der Reninaktivität sammeln zu können, wurde in die renale Vene eine Kanüle (1,5 mm OD Polypropylenkatheter) inseriert und dort fixiert.

3.2.2.2 Pharmakologische Stimulation der Reninsekretion

Sobald sich ein konstanter Perfusionsdruck eingestellt hatte, stabilisierte sich die Durchflussrate des Dialysats meistens innerhalb von 15 Minuten. Daraufhin wurde dem Perfusat, um die Reninsekretion anzuregen, für ein Zeitintervall von 16 Minuten festgelegte Konzentrationen von Isoproterenol (10 nM) oder mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (3,1 mM) hinzugefügt. Für die Rekonstruktion der unstimulierten Zellausschnitte wurde bei den entsprechenden Nieren der Schritt der Stimulation übersprungen.

3.2.2.3 Messung der Reninsekretionsrate

Die Messung der RSR fand wie die vorhergehenden Schritte unter kontrollierten Bedingungen statt. Berechnet wurde die RSR aus dem Produkt der Reninaktivität ($\text{ng} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) und des venösen Flusses ($\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{Niere}}^{-1}$).

Um die Reninaktivität des Dialysats, das zuvor durch die isolierte Niere perfundiert wurde, bestimmen zu können, wurde der venöse Abfluss des Dialysats aufgefangen. Um Kontrollwerte zu erheben, wurde vor der Stimulation der Nieren dreimal für 30-40 Sekunden der venöse Ausfluss gesammelt. Im Anschluss wurden die Nieren für 16 Minuten mit 10 nM Iso oder 3,1 mM EGTA stimuliert. Nach 12 Minuten Stimulation wurde im Abstand von zwei Minuten unter Fortsetzung der Stimulation wiederum dreimal über Zeitintervalle von jeweils 20-35 Sekunden der venöse Ausfluss gesammelt. Die Reninsekretionsraten wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Stimulationsdauer und der Zeitintervalle der Perfusatsammlung berechnet.

Die gewonnenen Perfusatproben wurden für zehn Minuten bei 1500 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde bis zur Bestimmung der Reninaktivität bei -20°C gelagert. Bei 37°C wurde der Perfusatüberstand dann für eineinhalb Stunden in Plasma von männlichen Ratten, denen beidseits die Nieren entfernt worden waren, inkubiert. Mittels Radioimmunassay wurde die entstandene Menge an Angiotensin I ($\text{ng} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) ermittelt, die durch den Renin-haltigen Perfusatüberstand aus dem im Plasma enthaltenen Angiotensinogen gespalten wurde.

3.2.2.4 Fixierung des Nierengewebes

Die Nieren wurden zum Abschluss der IPN-Methode für eine Minute mit PBS und anschließend für drei Minuten mit einer 2%-igen Glutaraldehyd-Fixierlösung dialysiert. Danach wurden die Nieren mit einer Rasierklinge in zwei Hälften geschnitten und bis zur Weiterverwendung bei 4°C in Fixierlösung aufbewahrt.

3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

3.2.3.1 Einbettung und Trimmen

Zur Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die bei 4°C in Fixierlösung aufbewahrten Nierenhälften verwendet. Für die Anfertigung der Ultradünnschnitte wurde das Nierengewebe in Epon eingebettet. Die dadurch bewirkte Härtung des Gewebes, erleichterte das Schneiden der Schnitte.

Als Erstes wurde das Gewebe in ca. 1 mm^3 kleine Blöcke geschnitten. Dies erfolgte in einer mit Cacodylatpuffer befüllten Petrischale mit Hilfe einer Rasierklinge, die zuvor mit Aceton gesäubert wurde. Anschließend wurden die Gewebelöcke in ebenfalls mit Cacodylatpuffer gefüllte Einbettkörbchen gegeben und ein Mikrowellenlauf wurde mit Hilfe einer automatischen Mikrowelle begonnen.

Beim Mikrowellenlauf wurde das Einbettkörbchen mit dem Nierengewebe in unterschiedlich gefüllte Reaktionsgefäße gestellt. Jeweils nach Ablauf des vorgegebenen Zeitintervalls (siehe Tabelle) wurde das Körbchen automatisch von einem Behältnis in das nächste überführt.

Für die Mikrowelleneinbettung wurde das folgende Standardprotokoll angewandt:

Zeitspanne (hh:mm:ss)	Maximaltemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Reagenz
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer
00:05:00	35	Cacodylat-Puffer

01:00:00	37	1% OsO ₄ in Cacodylat-Puffer
00:05:00	37	Cacodylat-Puffer
00:05:00	37	Aqua bidest.
00:05:00	37	Aqua bidest.
00:05:00	37	50% Ethanol
00:05:00	37	70% Ethanol
00:05:00	37	95% Ethanol
00:05:00	37	100% Ethanol
00:05:00	37	100% Aceton
00:05:00	37	100% Aceton
00:15:00	40	Aceton:Epon-Gemisch 1:1
00:20:00	40	Aceton:Epon-Gemisch 1:3
00:20:00	50	Epon
00:20:00	50	Epon

Im Anschluss an den Durchlauf wurde das präparierte Gewebe in mit Epon gefüllte Polymerisationsformen umgebettet und in der Mikrowelle entsprechend dem folgenden Standardprotokoll gehärtet:

Zeitspanne (hh:mm:ss) Maximaltemperatur (°C)

00:05:00	63
00:05:00	75
00:15:00	83
01:45:00	83

Die fertigen Eponblöckchen löste man aus den Polymerisationsformen und bereitete sie danach zur Herstellung der Ultradünnschnitte vor. Dafür wurden die Blöcke zum Trimmen in Halterungen befestigt, wobei sie am Trimmgerät oder am Ultramikrotom eingespannt wurden. Angetrimmt wurden die Präparate mit einer Rasierklinge oder unter Zuhilfenahme einer Fräse. Eine trapezförmige Schnittfläche wies den Vorteil auf, dass die für Serienschnitte notwendigen Schnittbänder möglichst erhalten wurden. Damit so viele Schnitte wie möglich auf einem Grid aufgetragen werden konnten, bemühte man sich, die Schnittfläche relativ klein zu halten.

3.2.3.2 Anfertigen von Ultradünnschnitten

Für die Herstellung der Ultradünnschnitte wurde ein Ultramikrotom mit Diamantklinge verwendet, wobei der Eponblock weiterhin in einer Halterung eingespannt war. Die Klingen wurden vor dem Schneiden mit steril filtriertem Millipore-Wasser befeuchtet und am Mikrotom wurde der optimale Wasserspiegel eingestellt.

Es wurden ca. 70 nm dünne Schnitte angefertigt, die nach dem Schneiden auf der Wasseroberfläche schwammen. Sie wurden mit Hilfe sogenannter "Fischgrids" (unbefilmte Kupferslotgrids) entnommen und auf einen mit 1,5%igem Pioloform beschichteten Slotgrid aufgetragen.

Die Exaktheit der Schnittdicke hängt einerseits von der Temperatur im Schneiderraum und andererseits von der Genauigkeit des Mikrotoms ab, wozu im Handbuch jedoch keine Angaben gemacht werden. Mit einer gewissen Ungenauigkeit ist folglich zu rechnen. Dessen Quantifizierung ist jedoch schwierig und wurde deshalb bei den ermittelten Messwerten nicht berücksichtigt.

3.2.3.3 Kontrastieren der Schnitte

Zum Kontrastieren wurden die Ultradünnschnitte für 30 bis 50 Minuten im Dunkeln in 4 %-igem Uranylacetat in PBS inkubiert. Anschließend wurden sie viermal in Millipore-Wasser gewaschen und danach für maximal eine Minute in 0,5 %-iger Bleicitrat-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut viermal in Millipore-Wasser gewaschen und die restliche Flüssigkeit wurde möglichst schonend mit Filterpapier aufgesaugt. Zum Schluss wurden die Ultradünnschnitte in einer Gridbox gelagert.

3.2.3.4 Elektronenmikroskopie: Akquisition und Digitalisierung

Die elektronenmikroskopischen Bildaufnahmen wurden mit Hilfe eines Phillips CM12 Transmissionselektronenmikroskops mit LaB₆-Kathode als Elektronenquelle und mit einer Beschleunigungsspannung von 120 keV gewonnen, wobei die Belichtungszeit zwischen 800 und 1000 ms lag. Für die Digitalisierung der Serienschnitte wurde eine TEM-1000 Slow-Scan-CCD-Kamera (TVIPS-Tietz GmbH) in Verbindung mit dem Programm *EM-Menu 4.0* verwendet.

Um detaillierte Aufnahmen zu akquirieren und gleichzeitig große Bildausschnitte zu ermöglichen, erfolgten die Einzelaufnahmen bei einer 3800-fachen Vergrößerung. Anschließend wurden die einzelnen Bilder zu Montagen aus je 2 x 2 bis 5 x 5 zusammengesetzt.

Die Daten wurden in 8 Bit konvertiert, um die digitalisierten Aufnahmen im Anschluss betrachten und bearbeiten zu können. Das Grafikformat TIFF wurde zur Aufrechterhaltung der Bildqualität ausgewählt.

3.2.4 Dreidimensionale Rekonstruktion

3.2.4.1 Datenaufbereitung mittels *ImageJ*

Durch die Montage der Einzelaufnahmen wiesen nicht alle Bilder übereinstimmende Längen- und Breitenmaße auf. Um die Bearbeitung der Serienaufnahmen dennoch mittels der Rekonstruktionssoftware *Amira* zu ermöglichen, wurde ein Bildstapel (Stack) mit Hilfe der Grafiksoftware *ImageJ* generiert.

Dafür wurden im Voraus die Abmessungen der einzelnen Bilder verglichen und mittels *Adobe Photoshop* den Serienaufnahmen ein leeres Bild hinzugefügt, das an Länge und Breite 100 bis 300 Pixel größer war als das größte Montagebild, und im TIFF-Format gespeichert.

Anschließend wurden alle Montageaufnahmen mitsamt dem leeren Bild in *ImageJ* geöffnet und mit Hilfe des Moduls "Stackbuilder" (*Plugins* → *Stacks* → *Stackbuilder*) in einen Bildstapel konvertiert. Dieses Modul orientiert sich an dem Bild mit den größten Abmessungen und erweitert alle anderen geladenen Bilder auf die gleichen Maße, in dem an alle kleineren Bildern schwarze Ränder seitlich angefügt werden. Durch das in *Adobe Photoshop* generierte weiße Bild, wurde gewährleistet, dass an sämtliche Montagebilder ein schwarzer Rand hinzugefügt wurde, um in *Amira* bei der Ausrichtung der Bilder aneinander möglichst wenig Bildinformation an den Bildrändern zu verlieren.

Zum Schluss wurde das leere Bild wieder entfernt (*Image* → *Stacks* → *Delete Slice*) und der entstandene Stack als "Image Sequence" im TIFF-Format gespeichert (*File* → *Save As* → *Image Sequence*).

Beim Erstellen des Stack war zu beachten, dass die Dateien der Serienaufnahmen konsequent richtig nummeriert waren, da das Programm sich bei der Anordnung der Bilder im Stack an den Dateinamen orientiert.

3.2.4.2 Rekonstruktion mittels *Amira*

Zur weiteren Bearbeitung wurde die Image Sequence in der *Amira 5.4.3 Visualization Software* in einer Grafik-Arbeitsstation geöffnet. Zur Skalierung der Daten für die dreidimensionale Rekonstruktion mussten zuerst korrekte Abmessungen eingestellt

werden. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit 3800-facher Vergrößerung betrug die Länge und Breite eines Pixels 5,2 nm x 5,2 nm. Die Schnittdicke maß jeweils ca. 70 nm. Der Begriff Pixel, der für zweidimensionale Flächen verwendet wird, wird im dreidimensionalen Raum durch den Begriff „Voxel“ ersetzt. Ein Voxel wurde als 5,2 x 5,2 x 70 nm definiert. Die maximale Abmessung des Datensatzes im dreidimensionalen Raum wurde in der sogenannten "Bounding Box" festgelegt und berechnet sich aus Länge, Breite und Schnittdicke der einzelnen Aufnahmen und aus der Gesamtzahl der Schnitte im Bildstapel.

Ausrichtung des Bildstapels (Alignierung)

Im nächsten Schritt wurden die Einzelbilder des Bildstapels aneinander ausgerichtet (*Compute* → *Align Slices* → *Edit*). Dies war notwendig, da die Serienbilder unterschiedlich auf den Slotgrids angeordnet waren. Die Einzelschnitte wurden dabei mittels Rotations- und Verschiebungsbewegungen in Deckung gebracht. Nach dem Alignieren aller Schnitte entstand dadurch ein vollständig ausgerichteter JG-Zellausschnitt.

Datensegmentierung (Labeling)

Um mit der 3D-Rekonstruktion beginnen zu können, mussten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dem Programm als Schwarz-Weiß-Kanal angezeigt werden (*Compute* → *Channelworks*).

Im Anschluss konnten durch das Generieren eines Markierungsfeldes (*Labeling* → *Labelfield*) die Zellstrukturen von Interesse (Reninspeichervesikel, Zellkern, Zellmembran, etc.) auf den Einzelschnitten markiert und diese Markierungen einem definierten Material zugeordnet werden. Durch diese Markierung von Zellmaterial konnten für die jeweiligen Zellbestandteile nach der vollständigen 3D-Rekonstruktion die entsprechenden Oberflächen- und Volumenmaße berechnet werden.

Da je Labelfield jedes Voxel in der Bounding Box immer nur einem Material zugeordnet werden kann, wurden zwei separate Labelfields pro Zelle erstellt: eines um die Zellmembran und damit das gesamte Zellvolumen zu markieren, um Volumenverhältnisse innerhalb der Zelle berechnen zu können, und ein weiteres für intrazelluläre Strukturen, die für die 3D-Rekonstruktion von entscheidendem Interesse waren.

Zur Datensegmentierung wurden für diese Arbeit folgende Werkzeuge verwendet:

- *Brush*: Markierung der Zellstrukturen durch freihändiges Umfahren

- *Fill Holes*: Ausfüllen von Flächen im ausgewählten oder umfahrenen Objekt
- *Interpolate*: Berechnung von nicht erkennbaren Zielstrukturen auf einem fehlerhaften Schnitt durch Interpolieren der Bildinformation vom jeweils direkt darüber und direkt darunter liegenden Schnitts für den beschädigten Schnitt
- *Pick and Move*: Verschiebung markierter Strukturen oder Materialien bei nicht einwandfrei alignierten Schnitten

Alle Werkzeuge sind auf Einzelschnitte oder auf den gesamten Bildstapel anwendbar.

Berechnung von Oberflächen und Volumina

Die erarbeiteten Label-Felder wurden anschließend für Berechnungen verwendet. Die Label der Reninspeichervesikel, des Zellkerns und der Zellmembran waren dazu im vorangegangenen Schritt voneinander getrennt worden. Mittels des Moduls "Surface Gen" (*Compute* → *Surface Gen*) wurden separate Oberflächen aus den einzelnen getrennten Materialien erstellt und durch das Modul "Surface View" konnten die Zellbestandteile räumlich betrachtet werden. Zum Schluss wurden mit Hilfe des Programms *Amira* die Gesamtvolumen und -oberflächen der Materialien berechnet (*Measure* → *Surface Area*). Anhand dieser Daten und der selbst notierten Anzahl an Vesikeln konnten anschließend weitere Werte berechnet werden.

Da die Berechnung von Oberfläche und Volumen für jedes einzelne Vesikel nicht praktisch umsetzbar war, wurden je Zellausschnitt nur die Gesamtwerte aller Vesikel ermittelt und daraus jeweils ein Durchschnittswert für Oberfläche und Volumen der einzelnen Vesikel berechnet. Folglich werden für die Messwerte einzelner rekonstruierter Zellausschnitte keine Standardabweichungen angegeben. Die in dieser Arbeit ausgeführten Standardabweichungen beziehen sich stets auf die Durchschnittswerte mehrerer Zellausschnitte.

Um aus den erstellten Materialien Volumen und Oberflächen für die zu untersuchenden Zellstrukturen weitgehend akkurat berechnen zu können, wurden grobe Ungenauigkeiten durch Verzerrungen und Fehler in den Schnitten mittels Interpolation ausgeglichen. Für die Oberflächenberechnung wurden sich berührende Zellstrukturen in unterschiedliche Materialien gespeichert.

Da lediglich Zellausschnitte rekonstruiert wurden, muss jedoch beachtet werden, dass Reninspeichervesikel an den Rekonstruktionsrändern nicht immer vollständig dargestellt sind und die berechneten durchschnittlichen Volumen- und Oberflächenwerte daher eher als Richtwerte und nicht als Absolutwerte betrachtet werden

sollten. Die Berechnungen zeigen deshalb lediglich eine Größtentendenz auf, die den Vergleich zwischen den unterschiedlichen JG-Zellausschnitten ermöglicht.

In Zellen mit vielen Vesikeleinschlüssen wurden diese Einschlüsse, um die Oberflächenberechnung der Reninspeichervesikel nicht zu verfälschen, zum Material der zugehörigen Vesikel hinzugefügt. Zur Volumenberechnung hingegen wurden die Vesikeleinschlüsse in einem getrennten Material gespeichert und folglich bei den Volumina der Reninspeichervesikel nicht mit einberechnet.

Darstellung der 3D-Modelle

Für die Darstellung der Modelle wurden wie für die Oberflächen- und Volumenberechnungen durch das Modul "Surface Gen" separate Oberflächen generiert.

Nachbearbeitet wurden die Materialien für die Darstellung der 3D-Modelle mit Hilfe folgender Werkzeuge:

- *Simplifier*: Verringerung der Polygonzahl der Oberflächen zur Reduzierung der Datenmenge
- *Compute* → *Smooth Surface*: Glättung der Oberflächen
- *Surface Editor*: Entfernung überflüssiger oder real nicht vorhandener Oberflächen angeschnittener Zellbestandteile am Bildrand
- *Parameter Editor*: Veränderung der Oberflächenfarbe
- *Surface View* → *Draw Style*: Änderung der Darstellung von Oberflächen (z.B. Transparenz)

Die rekonstruierten Zellbestandteile ergaben zusammengesetzt ein dreidimensionales Modell des jeweils erfassten Teilausschnittes der JG-Zelle, das mittels "Surface View" frei rotiert und betrachtet werden konnte, um die unterschiedlichen Strukturen im räumlichen Kontext analysieren zu können.

4 Ergebnisse

4.1 Definition morphologischer Begrifflichkeiten

Die dreidimensionale (3D) Rekonstruktion der juxtaglomerulären Epitheloidzellen basiert auf Modellen, die durch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM-Aufnahmen) von Ultradünnschnitten erstellt wurden.

In diesem Abschnitt werden bestimmte Bezeichnungen, die zur strukturellen Analyse der JG-Zellen in dieser Arbeit verwendet werden, definiert, um morphologische Unterschiede möglichst einheitlich und klar verständlich zu beschreiben und eine falsche Interpretation oder eine unbeabsichtigte Mehrdeutigkeit der verwendeten Begriffe zu vermeiden.

4.1.1 Reninspeichervesikel und Reninspeichervesikel-Netzwerke

Die Reninspeichervesikel (RV) sind auf TEM-Aufnahmen durch ihre meist homogene und relativ hohe Elektronendichte identifizierbar (Abb. 4.1). Als **klassische**, „**einzelne**“ **Reninspeichervesikel (eRV)** werden jene bezeichnet, die in der 3D-Rekonstruktion eine runde oder ovale Form aufweisen oder sich trotz ungewöhnlicher oder irregulärer Form dreidimensional als ein einzelnes RV darstellen (Abb. 4.1, Abb. 4.2).

Einige RV haben eine komplexere, Netzwerk-artige Morphologie. Diese **Reninspeichervesikel-Netzwerke (NV)** erwecken in vielen Fällen den Eindruck, als seien mehrere einzelne eRV miteinander verschmolzen (Abb. 4.3, Abb. 4.4: A-D). In anderen Rekonstruktionen sind die NV vollständig irregulär geformt und lassen kaum ehemals klassische eRV erkennen (Abb. 4.1, Abb. 4.4: E-H, Abb. 4.5). Manche Netzwerke sind im dreidimensionalen Raum gut erkennbar, in einzeln betrachteten TEM-Schnittbildern wirken sie jedoch wie „normale“ klassische eRV (vgl. Abb. 4.1, Abb. 4.3).

Manche RV wirken auch, als würde gerade ein eRV, manchmal auch ein sehr kleines eRV, mit einem anderen eRV fusionieren oder aus ihm entspringen (vgl. Abb. 4.6, Abb. 4.27: A). Diese RV-Ereignisse werden als gerade entstehende Netzwerke gewertet. In manchen Fällen weisen manche Abschnitte dieser Vesikel in den TEM-Aufnahmen unterschiedliche Elektronendichten auf (vgl. Abb. 4.14, Abb. 4.34).

4.1.2 Low-Density-Vesikel

Vesikel, die auf den TEM-Aufnahmen eine geringere Elektronendichte als die übrigen RV aufweisen, aber aufgrund ihrer Größe oder Form dennoch als RV zu betrachten sind, werden als **Low-Density-Vesikel (LDV)** bezeichnet (Abb. 4.7).

4.1.3 Reninspeichervesikel-Vorstufen

Kleine, rautenförmige Vesikel, die in früheren Veröffentlichungen als **Vorstufen der Reninspeichervesikel (RV-V)** bezeichnet werden [38, 232], sind gesondert markiert (Abb. 4.8, Abb. 4.10). Teilweise liegen die RV-V in Konglomeraten gehäuft nahe bei einander und sind einzeln oder gruppenweise von einer Membran umgeben.

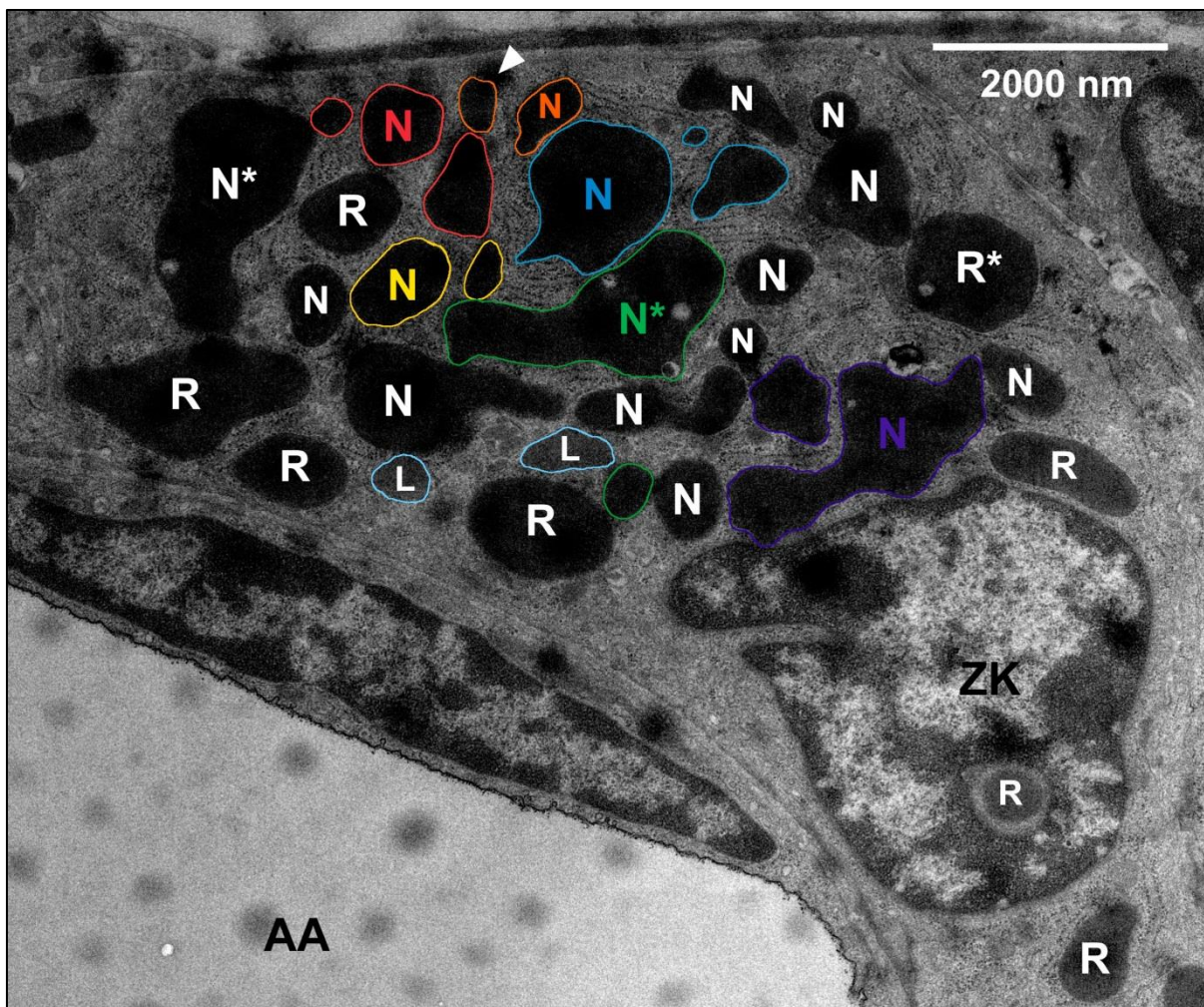


Abb. 4.1: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Renin-haltige Speichervesikel (R) und komplexer geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Ebenfalls zu erkennen sind weniger elektronendichte Renin-haltige Low-Density-Vesikel (*hellblau umrandet*, L). Die Zelle liegt nahe dem Lumen einer afferenten Arteriole (AA). *Asteriske (*)* Speichervesikel mit sichtbaren Einschlüssen in der TEM-Aufnahme, *Pfeilspitze* Artefakt, *ZK* Zellkern.

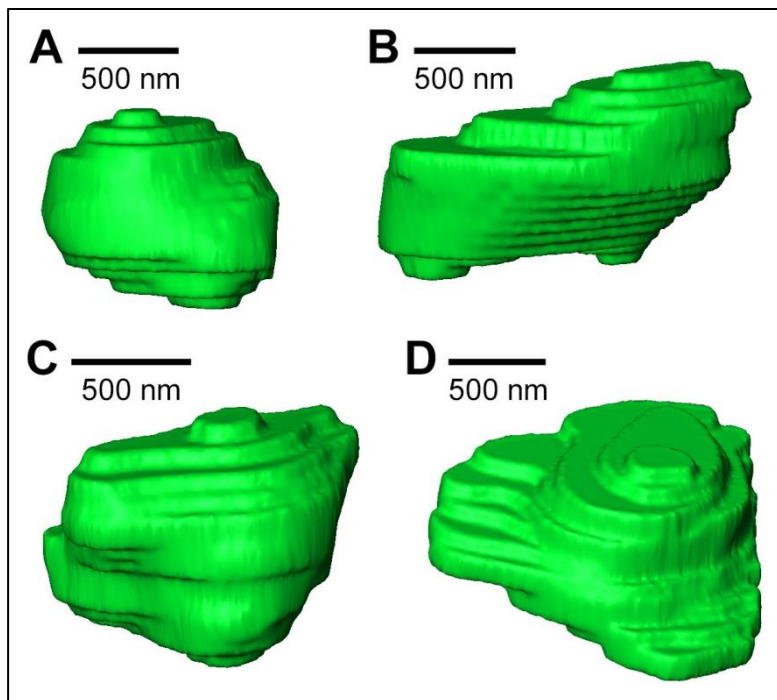


Abb. 4.2: Beispiele für die dreidimensionale Rekonstruktion von einfachen Reninspeichervesikeln (eRV)

Reninspeichervesikel werden in der 3D-Rekonstruktion grün dargestellt. **A:** „klassisch“ rundes eRV. **B:** ovales eRV. **C-D:** irregulär geformte, „verzerrte“ eRV.

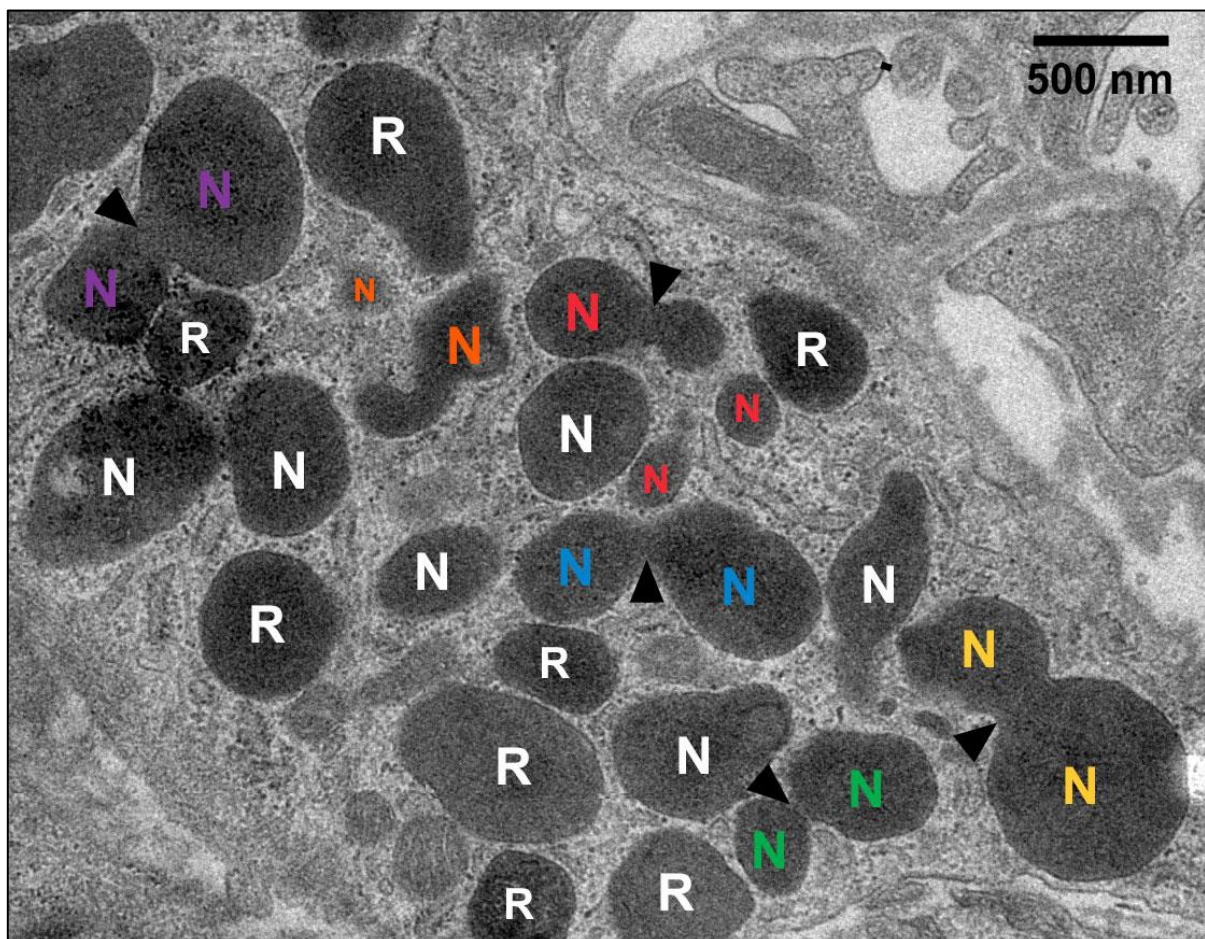


Abb. 4.3: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit scheinbaren Reninspeichervesikel-Fusionen (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Diese TEM-Aufnahme weist mehrere Reninspeichervesikel-Netzwerke (N) auf, die aus fusionierenden Reninspeichervesikeln (R) zu entstehen scheinen (*Pfeilspitzen*). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert.

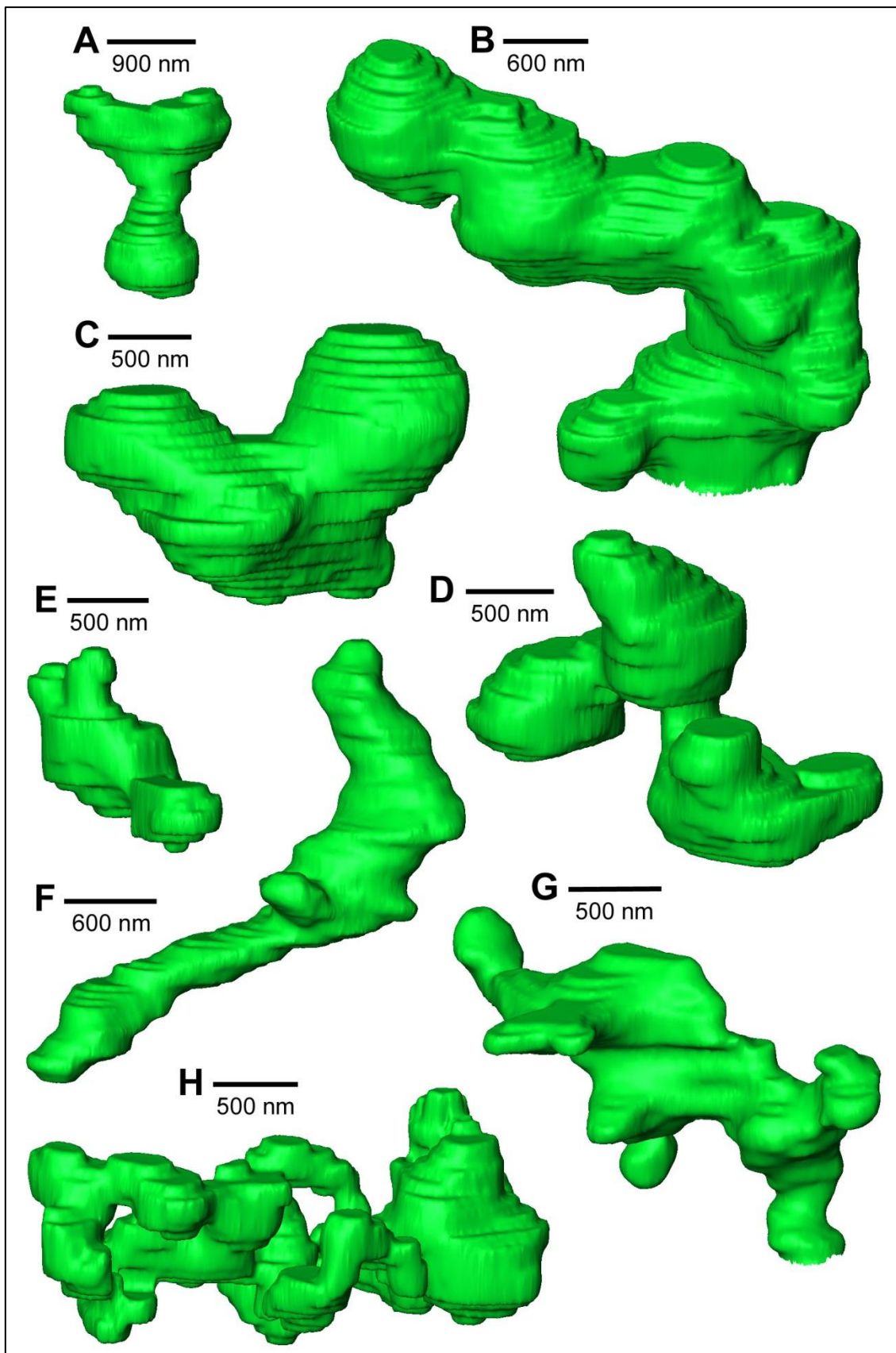


Abb. 4.4: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Netzwerken (NV)

A-D: „Kugel“-förmige NV, die wirken, als wären sie durch die Fusion einzelner Reninspeichervesikel (eRV) entstanden. **E-H:** schlanke, verzweigte Netzwerke mit teils geschlängelterm, „geknäultem“ oder „auseinander gezogenem“ Aussehen. Eine Entstehung durch die Fusion Kugel-förmiger eRV ist nicht stets nachvollziehbar.

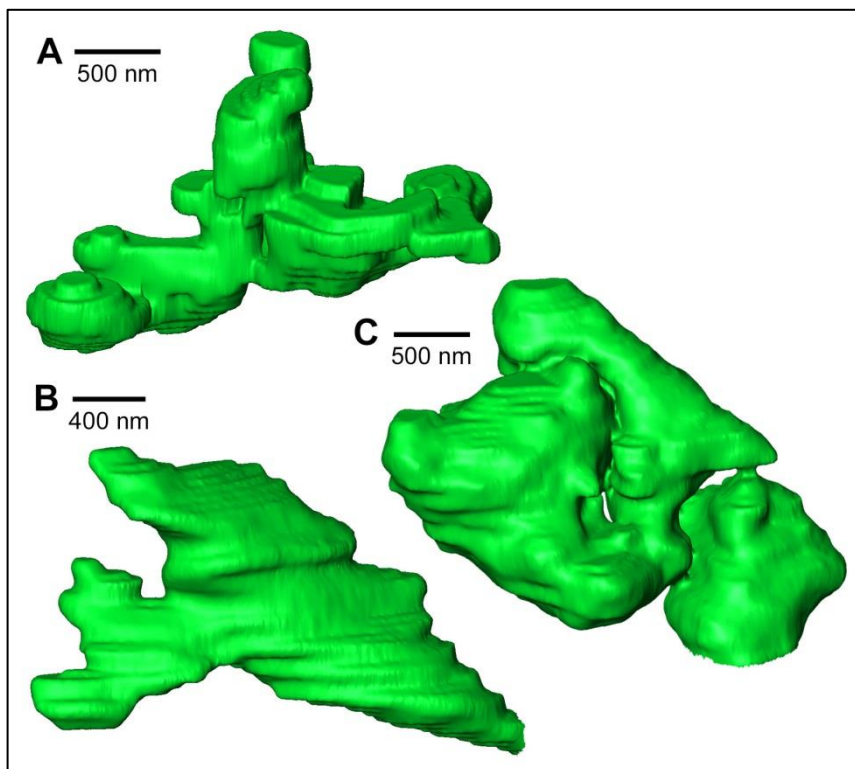


Abb. 4.5: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Netzwerken (NV)

A: NV, das „Kugel“-förmige und schlanke, „geschlängelte“ Anteile aufweist. **B:** irreguläres, „flaches“ NV. **C:** irreguläres NV, das aus großen, formlosen „Konglomeraten“ zusammengesetzt zu sein scheint.

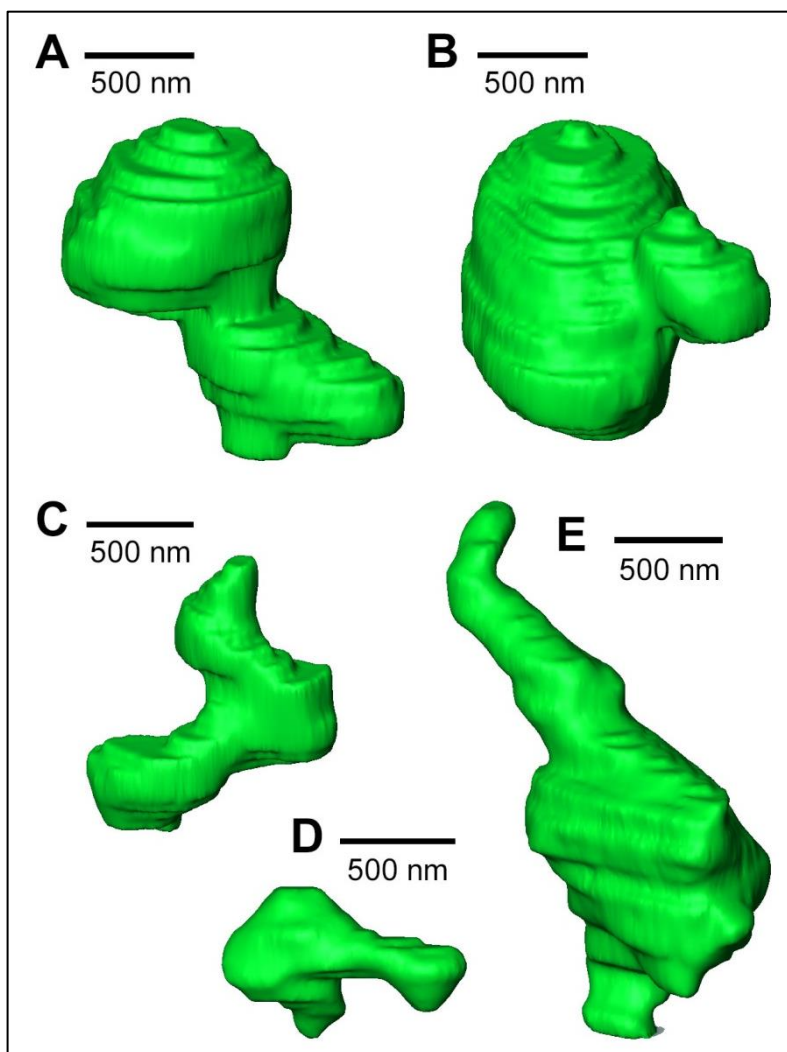


Abb. 4.6: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von kleinen Reninspeichervesikel-Netzwerken

A-B: Manche Reninspeichervesikel (RV) erwecken den Eindruck, als würde ein Vesikel aus einem anderen RV „ausknospen“ oder in das RV „aufgenommen“ werden und dadurch ein kleines Netzwerk auszubilden. **C-E:** Schlanke, „auseinander gezogen“ wirkende, kleine Netzwerke.

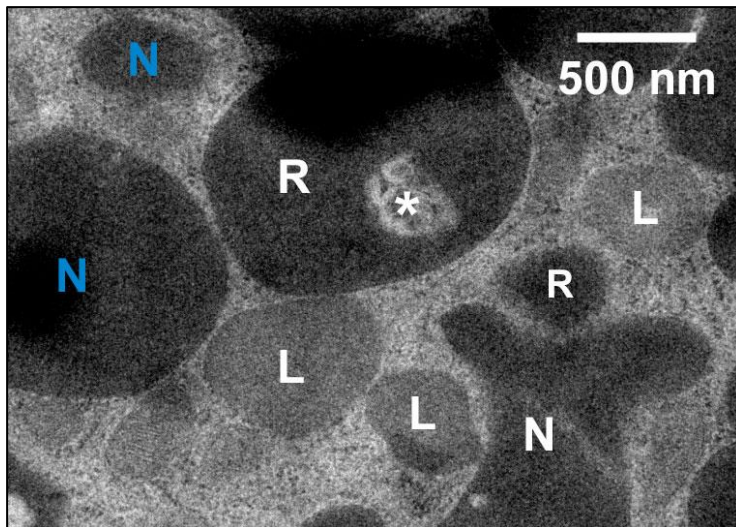


Abb. 4.7: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit Reninhaltigen Low-Density-Vesikeln (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Der JG-Zellausschnitt enthält neben klassischen, einzelnen elektronenmikroskopisch dichten Reninspeichervesikeln (R) und Speichernetzwerken (N) ebenfalls weniger elektronendichte, kleinere Reninhaltige Low-Density-Vesikel (L). Ein zusammenhängendes Netzwerk ist blau markiert. *Asterisk* Reninspeichervesikel-Einschluss.

4.1.4 Inhomogen elektronendichte Vesikel

Als **inhomogen elektronendichte Vesikel (IV)** werden in dieser Arbeit Vesikel bezeichnet, die entweder eine geringere oder eine unregelmäßigere Elektronendichte als RV haben und angesichts ihrer Größe oder Morphologie nicht als RV gewertet werden. Manche IV präsentieren sich als „klare“ oder inhomogen granulierte Vesikel (Abb. 4.9). Da ein Zusammenhang zu RV oder der Inhalt dieser IV anhand einer strukturellen Analyse der TEM-Aufnahmen nicht eindeutig geklärt

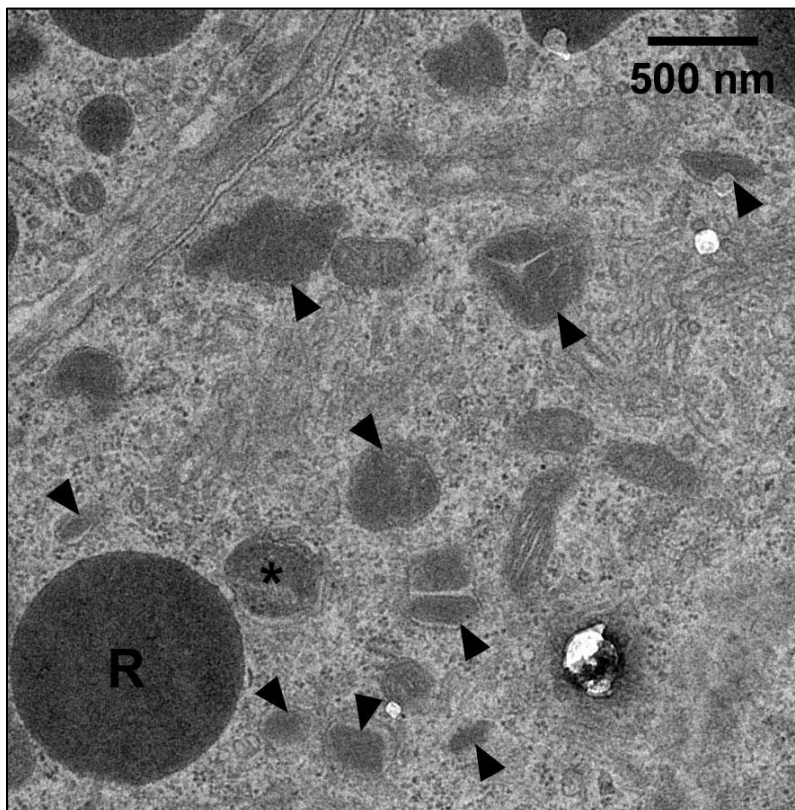


Abb. 4.8: Beispiel einer TEM-Aufnahme eines JG-Zellausschnittes mit Reninspeichervesikel-Vorstufen (Cx40-Knock-out, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Dieser Zellausschnitt zeigt ein klassisch rundes Reninspeichervesikel (R), rautenförmige Reninspeichervesikel-Vorstufen (*Pfeilspitzen*) und ein inhomogen elektronendichtes Vesikel (*Asterisk*). Manche RV-Vorstufen-Konglomerate werden von einer gemeinsamen Membran umrahmt.

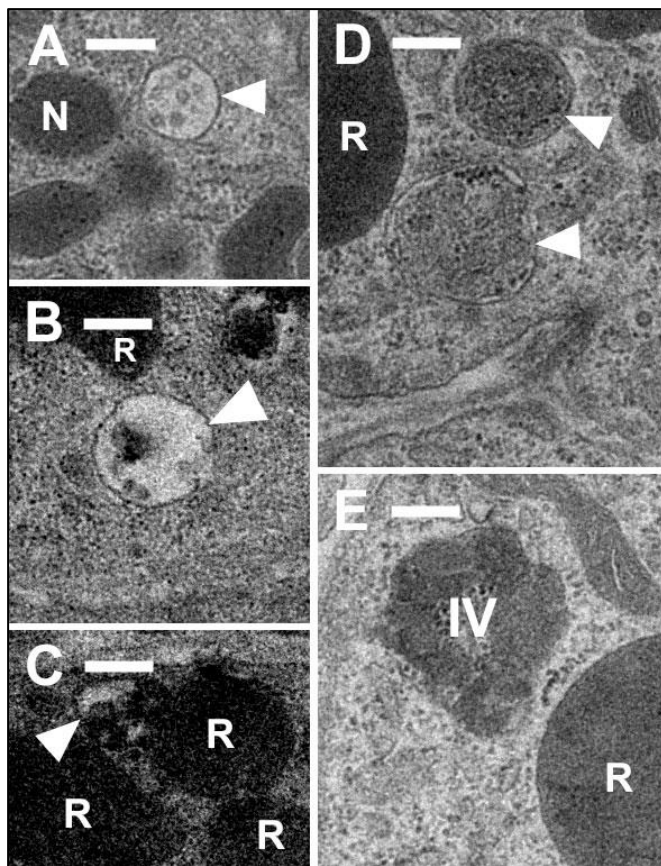


Abb. 4.9: Beispiele von TEM-Aufnahmen von JG-Zellausschnitten mit inhomogen elektronendichten Vesikeln (3800x)

A-C: „klare“ inhomogene Vesikel (Pfeilspitzen). **D-E:** gering elektronendichte, granuliert wirkende inhomogene Vesikel (Pfeilspitzen, IV). **R** klassische Reninspeichervesikel, **N** Reninspeichervesikel-Netzwerk. **A, D, E:** Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA. **B:** Wildtyp, Stimulation mit Iso. **C:** Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso. Maßstabsbalken 250 nm.

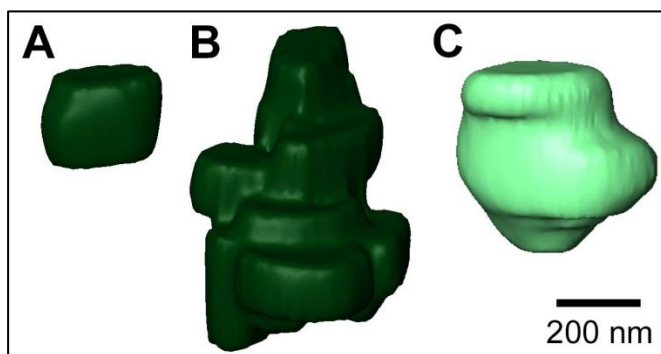


Abb. 4.10: Beispiel für die dreidimensionale Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Vorstufen (RV-V) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (IV)

A: einzelnes RV-V (schwarzgrün). **B:** 3D-Rekonstruktion einer Ansammlung von RV-V. **C:** inhomogen elektronendichtes Vesikel (hellgrün).

werden kann, sind diese Vesikel in der 3D-Rekonstruktion in einem anderen Grünton markiert (Abb. 4.10).

4.1.5 Reninspeichervesikel-Einschlüsse

In manchen Reninspeichervesikeln befinden sich elektronenmikroskopisch arme Einschlüsse, wobei die größeren Einschlüsse in ihrer Form und Elektronendichte teilweise manchen IV sehr ähnlich sind (Abb. 4.11, Abb. 4.12). Kleinere Einschlüsse stellen sich meist optisch als Bläschen mit eigener Membran dar. Diese **Reninspeichervesikel-Einschlüsse (RV-Einschlüsse)** sind in Zellen gesondert markiert, wenn entweder viele RV betroffen sind oder sehr große Einschlüsse beobachtet werden.

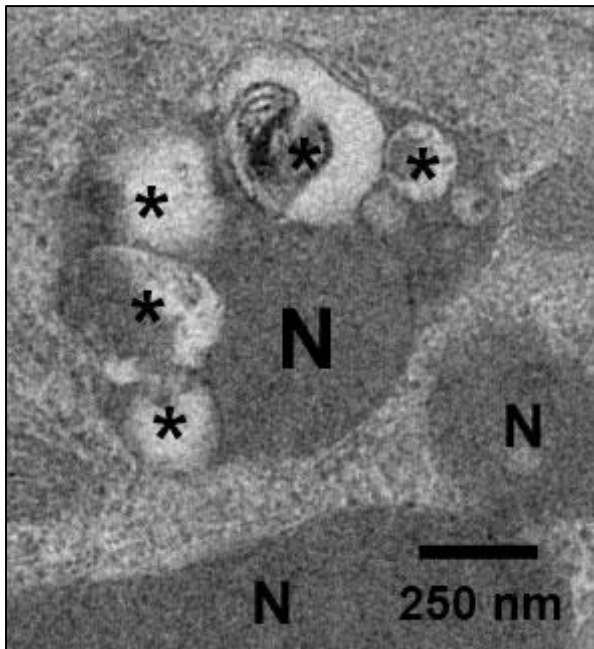


Abb. 4.11: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit einem Reninspeichervesikel-Netzwerk mit Einschlüssen (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Dieser JG-Zellausschnitt zeigt einen Teil eines Reninspeichervesikel-Netzwerkes (N), das inhomogen elektronendichte Einschlüsse (Asteriske) aufweist.

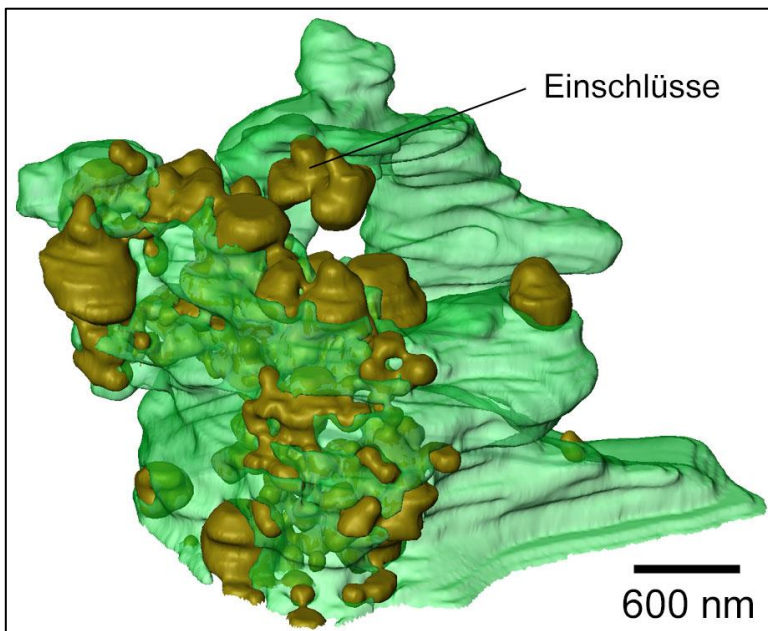


Abb. 4.12: Beispiel für die dreidimensionale Rekonstruktion eines Reninspeichervesikels mit Einschlüssen

Zur besseren Darstellung der Reninspeichervesikel-Einschlüsse (*dunkelgelb*) ist das Reninspeichervesikel (*grün*) in dieser Abbildung transparent dargestellt.

4.2 Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Cx40^{+/+}-Maus

Zur Untersuchung der Zellmorphologie wurde das Modell der isoliert perfundierten Niere verwendet. Nachdem die Nieren freipräpariert waren, wurden diese über die Nierenarterie unter konstantem Druck mit PBS gespült und anschließend entweder sofort mit Glutaraldehydlösung (2 %) fixiert oder zuvor zur Steigerung der RSR für 16 Minuten mit Iso (10 nM) oder EGTA (3,1 mM) stimuliert. Für die Transmissions-elektronenmikroskopie wurden die Nieren in Epoxidharz eingebettet und Serien mit 20 bis 144 Schnitten erstellt. Diese ca. 70 nm dicken Ultradünnschnitte wurden durch Uranylacetat (4 %, in PBS) kontrastiert und bei 3800-facher Vergrößerung fotografiert und digitalisiert. Mittels dieser TEM-Aufnahmen wurden die Zellausschnitte im Softwareprogramm *Amira* dreidimensional rekonstruiert, um morphologische Veränderungen der Reninspeichervesikel in den unterschiedlich stimulierten JG-Zellen betrachten zu können. Das Rekonstruktionsprogramm ermöglichte ebenfalls, für die Gesamtheit der RV von jedem rekonstruierten Zellausschnitt die durchschnittliche Vesikeloberfläche (in μm^2), das durchschnittliche Vesikelvolumen (in fL) und den Anteil von einfachen eRV und Vesikelnetzwerken am gesamten Vesikelvolumen (in %) als auch die Relation vom gesamten Vesikelvolumen zum Zytosolvolumen (in %) zu berechnen. In den gezeigten Graphen sind die errechneten Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

4.2.1 Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen

Zuerst wird die Morphologie der JG-Zellausschnitte von einer Wildtyp-Maus betrachtet, die nicht stimuliert wurde. Es wurden die TEM-Aufnahmen von drei JG-Zellen betrachtet und ein Zellausschnitt wurde dreidimensional rekonstruiert.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Sowohl auf den TEM-Aufnahmen als auch in der 3D-Rekonstruktion und bei den von *Amira* berechneten Messwerten des rekonstruierten Zellausschnittes ist erkennbar, dass die RV mit 33,45 % neben dem Zellkern einen großen Teil des Zellvolumens einnehmen (Abb. 4.13 - Abb. 4.16: A). Die RV sind überwiegend locker im Zytosol angeordnet, berühren sich jedoch häufig.

Hinsichtlich der Anordnung der Speichervesikel fällt in der 3D-Rekonstruktion auf, dass sich die NV tendenziell gemeinsam mittig in der Zelle befinden, während die

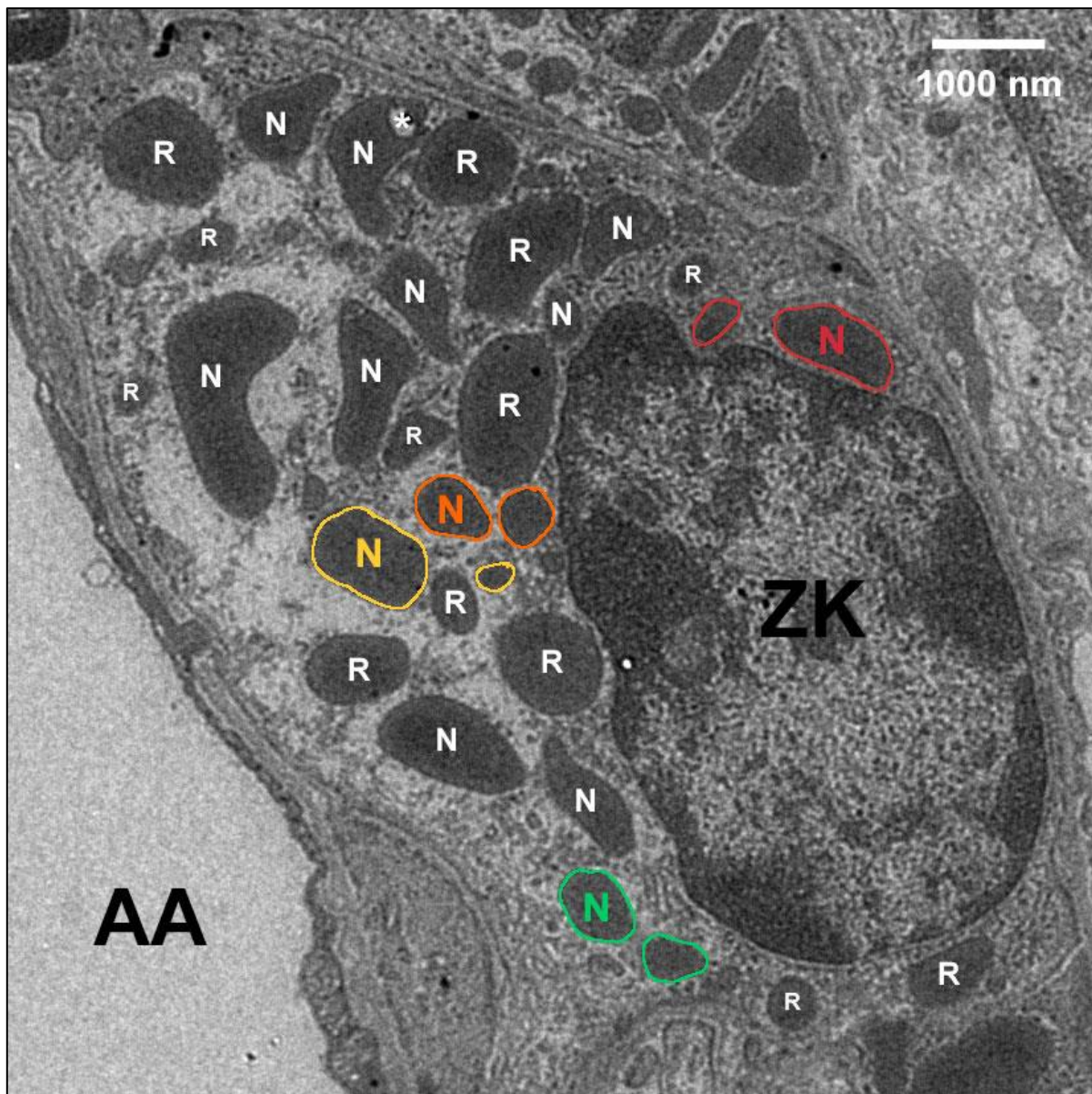


Abb. 4.13: TEM-Aufnahme des rekonstruierten JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Renin-haltige Speichervesikel (R) und komplexer geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). *Asterisk* Vesikeleinschluss, ZK Zellkern.

eRV auch näher an der Zellmembran lokalisiert sind und in der Zelle verstreut zwischen den NV oder in kleinen Gruppen lokal gehäuft auftreten (Abb. 4.16: C-E).

RV-Morphologie

In den TEM-Aufnahmen wirken die RV hinsichtlich ihrer Form mehrheitlich klassisch rund (Abb. 4.13 - Abb. 4.15). In der 3D-Rekonstruktion weisen einige RV jedoch eher eine in die Länge gezogene ovale und teilweise auch leicht „flache“ Form auf (Abb. 4.16: B). Vor allem in den zwei nicht rekonstruierten Zellausschnitten weisen manche RV aufgrund ihrer Länge ein sehr großes Volumen auf.

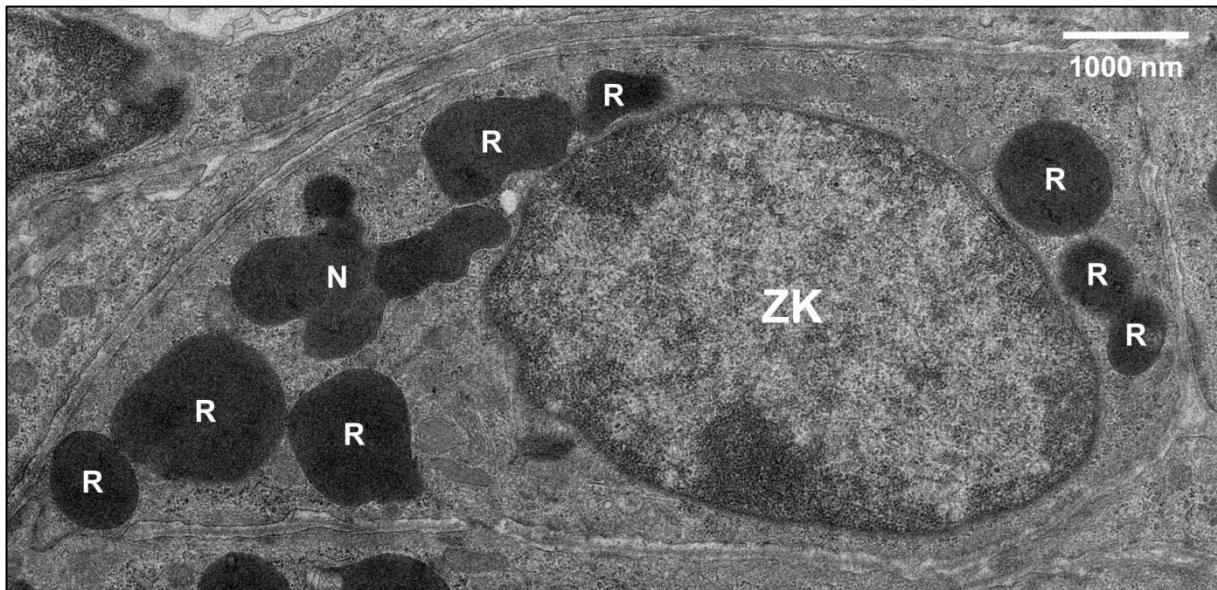


Abb. 4.14: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

Der JG-Zellausschnitt enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Reninspeichervesikel (R) und ein komplexer geformtes Reninspeichervesikel-Netzwerk (N), das unterschiedlich elektronendichte Abschnitte aufweist. ZK Zellkern.

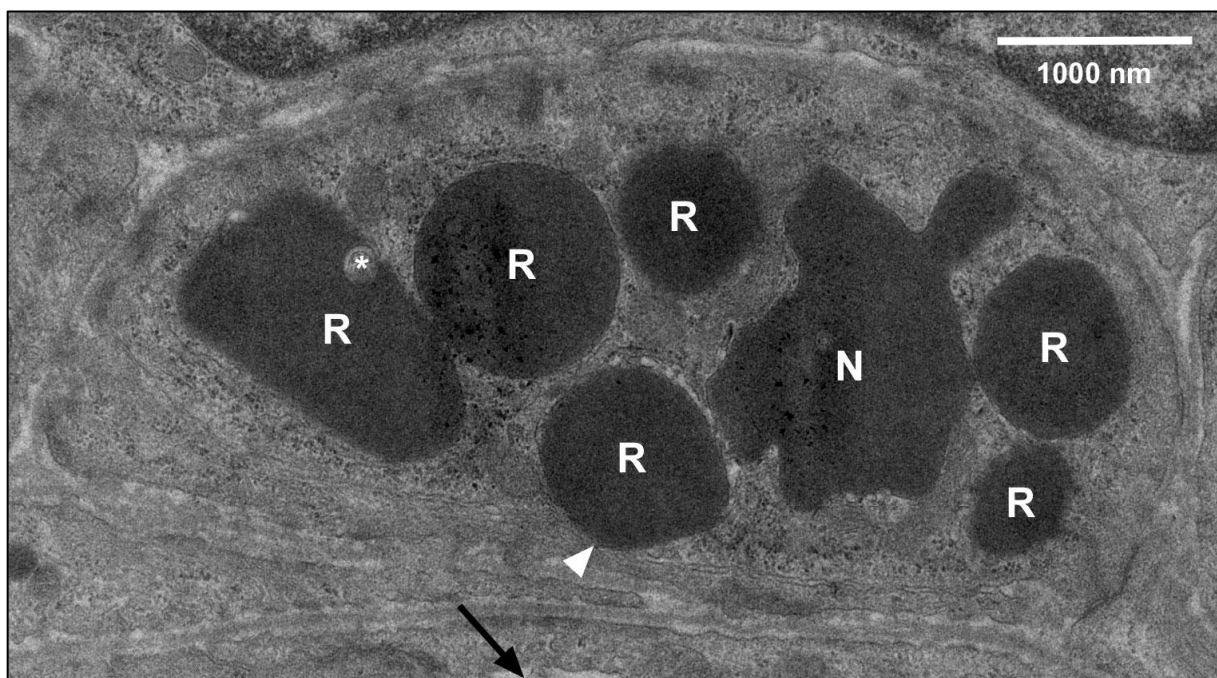


Abb. 4.15: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Renin-haltige Speichervesikel (R) und ein komplexer geformtes Reninspeichervesikel-Netzwerk (N). Dieser Zellausschnitt zeigt ein Reninspeichervesikel mit Zellmembran-Kontakt (*Pfeilspitze*). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (*schwarzer Pfeil*). Asterisk Vesikeleinschluss.

Alle JG-Zellausschnitte weisen NV auf, wobei in den nicht rekonstruierten Zellausschnitten nur sehr wenige, aber dafür große NV zu sehen sind. Die NV der rekonstruierten Zelle erscheinen im Vergleich dazu kleiner, irregulärer und

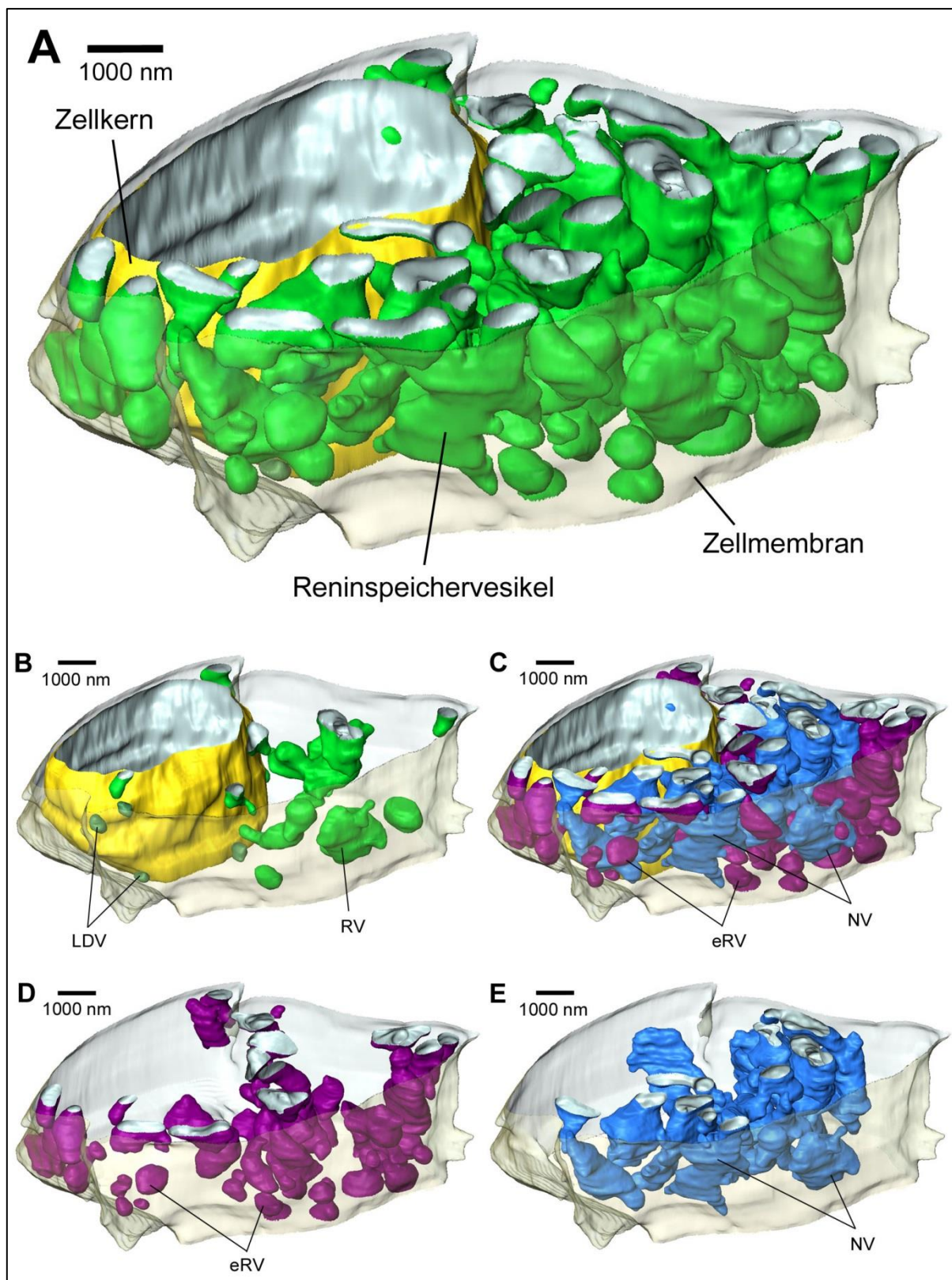


Abb. 4.16: Dreidimensionale Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*) und Reninspeichervesikeln (*grün*, RV). **B:** Auswahl von RV und Low-Density-Vesikeln (*dunkelgrün*, LDV) zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in klassische, einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt.

erscheinen in den einzelnen Schnittebenen eher abgeflacht, oval als rund. Die NV wirken, als ob sie aus der Fusion von mehreren normalen eRV entstehen.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Die durchschnittliche Oberfläche der RV beträgt $4,83 \mu\text{m}^2$ und das durchschnittliche Volumen $0,53 \text{ fL}$.

Die Mehrzahl der RV sind eRV. Mit $56,82 \%$ machen die NV hingegen den etwas größeren Volumenanteil der RV aus, da sie mit $1,28 \text{ fL}$ ein $4,3$ -fach höheres durchschnittliches Vesikelvolumen als die eRV ($0,30 \text{ fL}$) aufweisen.

Low-Density-Vesikel

Renin-haltige LDV sind in allen Zellausschnitten feststellbar, wobei deren durchschnittliche Oberfläche ($0,71 \mu\text{m}^2$) und Größe ($0,04 \text{ fL}$) in der 3D-Rekonstruktion und auch in allen TEM-Aufnahmen deutlich kleiner sind, als die der meisten „normal“ elektronendichten RV (vgl. Abb. 4.16: B).

Allgemeine Zellmorphologie

Einschlüsse wurden in den RV nur vereinzelt beobachtet, weshalb auf deren Rekonstruktion verzichtet wurde. RV-V und nicht Renin-haltige „klare“ und inhomogene Vesikel waren bei der 3D-Rekonstruktion nicht eindeutig erkennbar.

4.2.2 Untersuchung von stimulierten JG-Zellen

Um die Morphologie von stimulierten JG-Zellen einer Wildtyp-Maus zu betrachten, wurden die Nieren, wie im Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben mit 10 nM Iso oder $3,1 \text{ mM}$ EGTA für 16 Minuten stimuliert.

Bei Iso handelt es sich um einen β -Adrenorezeptor-Agonisten, der durch Aktivierung des β_1 -Adrenorezeptors eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in den JG-Zellen bewirkt. EGTA führt durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen zur Abnahme der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Beide Stoffe stimulieren durch ihren jeweiligen Wirkmechanismus die Reninsekretion.

4.2.2.1 Messung der Reninsekretionsrate

Im Vergleich zu den Kontrollwerten im unstimulierten Zustand mit einem Mittelwert von $44,6 \pm 4,8 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$ zeigt sich beim Wildtyp unter Stimulation mit 10 nM Iso nach 12 Minuten eine $15,5$ -fache Steigerung der RSR auf $693,8 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$ (Abb. 4.17) und nach 16 Minuten eine $20,3$ -fache Steigerung der RSR auf $907,7 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$. Unter Stimulation mit $3,1$

mM EGTA steigt die RSR verglichen mit den Kontrollwerten von $42,7 \pm 21,7$ ng Angiotensin I / (h*min*g) nach 12 Minuten auf den 15,2-fachen Wert von 650,7 ng Angiotensin I / (h*min*g) und nach 16 Minuten auf das 16,8-fache mit 718,7 ng Angiotensin I / (h*min*g), (Abb. 4.18).

4.2.2.2 16-minütige Stimulation mit Isoproterenol

Zuerst wird die Morphologie von drei Wildtyp-JG-Zellausschnitten betrachtet, die während eines Zeitraums von 16 Minuten mit 10 nM Iso stimuliert wurden.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Auf den TEM-Aufnahmen und in den 3D-Rekonstruktionen ist erkennbar, dass die RV mit einem Mittelwert von $36,53 \pm 4,43$ % neben dem Zellkern einen ähnlich großen Teil des Zellvolumens einnehmen wie im unstimulierten Wildtyp (Abb. 4.19 - Abb. 4.22, Abb.: 4.23: A - Abb. 4.25: A). Da jedoch lediglich zu einer unstimulierten

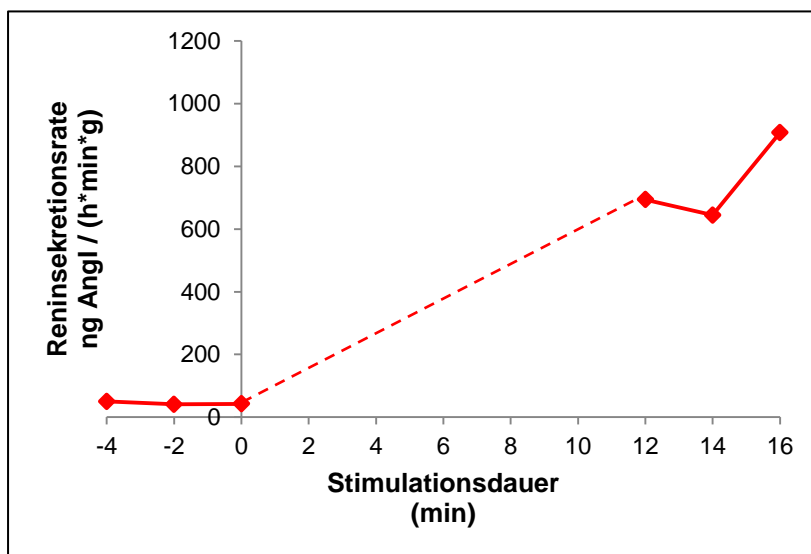


Abb. 4.17: IPN-Protokoll der Stimulation einer Wildtyp-Niere mit Isoproterenol

Nach Stabilisierung der Durchflussrate des Dialysats und nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt: 0 Minuten) erfolgt die 16-minütige Stimulation mit 10 nM Isoproterenol. Die Reninsekretionsrate wurde erneut nach 12 Minuten, 14 Minuten und 16 Minuten gemessen.

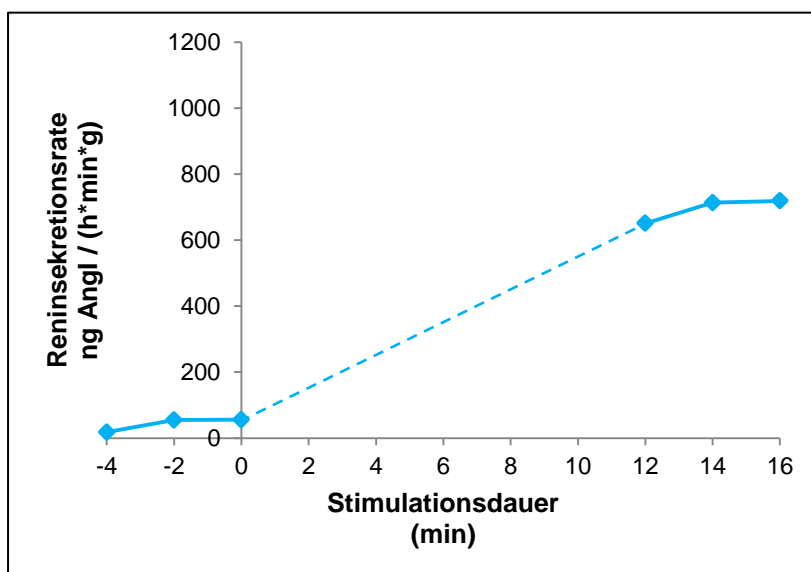


Abb. 4.18: IPN-Protokoll der Stimulation einer Wildtyp-Niere mit EGTA

Nach Stabilisierung der Durchflussrate des Dialysats und nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt: 0 Minuten) erfolgt die 16-minütige Stimulation mit 3,1 mM EGTA. Die Reninsekretionsrate wurde erneut nach 12 Minuten, 14 Minuten und 16 Minuten gemessen.

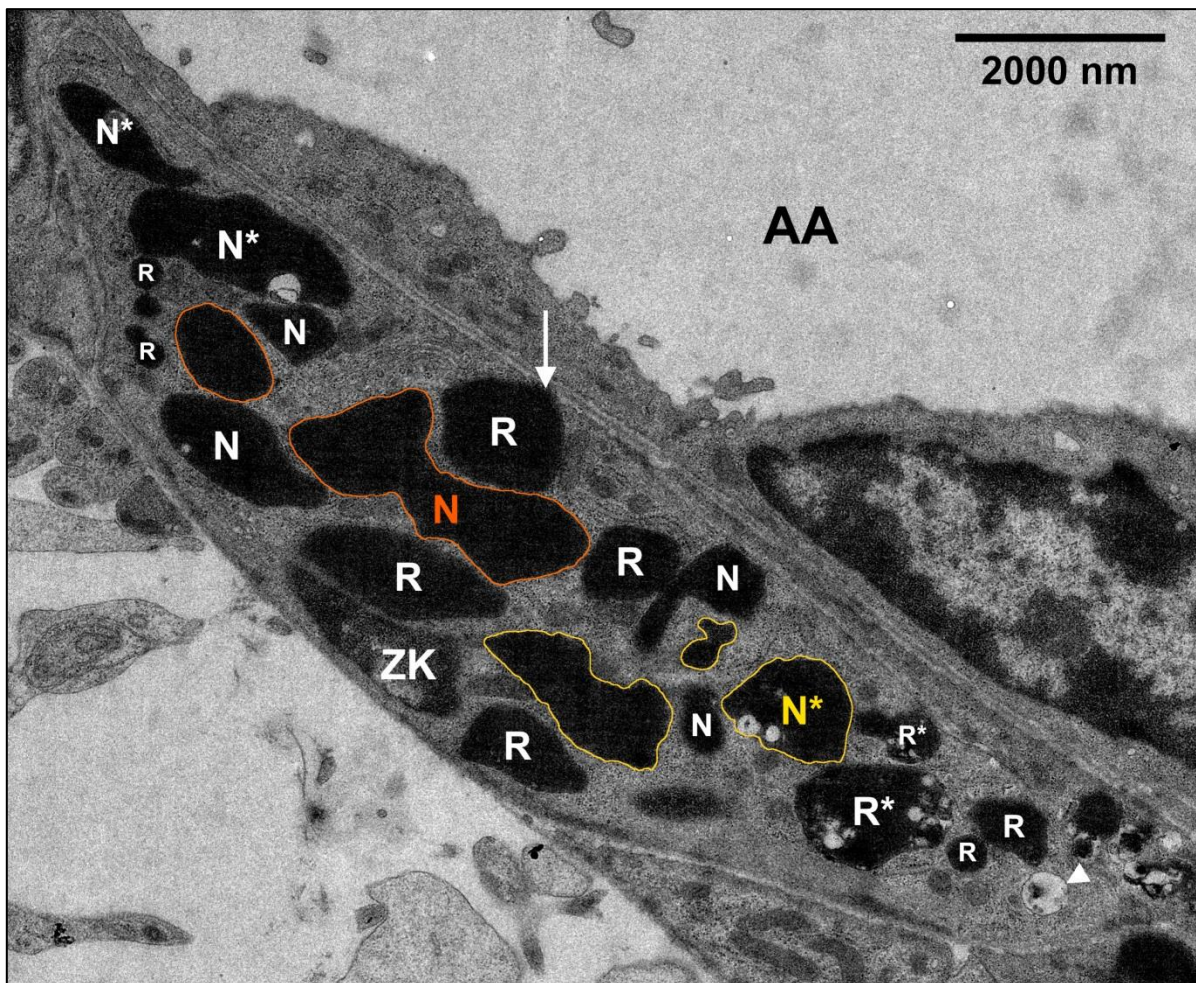


Abb. 4.19: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplexer geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Ebenfalls zu erkennen sind Reninspeichervesikel mit vermehrten Vesikeleinschlüssen (*mit Asterisken markiert*), ein Reninspeichervesikel mit Zellmembran-Kontakt (*weißer Pfeil*) und ein nicht Renin-haltiges „klares“ Vesikel (*Pfeilspitze*). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). ZK Zellkern.

JG-Zelle Berechnungen vorliegen, ist die Aussagekraft dieser ähnlichen Messwerte beschränkt. Die RV sind wie im unstimulierten Wildtyp überwiegend locker im Zytosol angeordnet, berühren sich jedoch vereinzelt.

Hinsichtlich der Anordnung der Speichervesikel fällt auf, dass sich die NV tendenziell alle gemeinsam im Zytosol ansammeln, während die eRV meist in der Zelle verstreut zwischen den NV oder in kleinen Gruppen lokal gehäuft auftreten (Abb. 4.23: C-E - Abb. 4.25:C-E).

RV-Morphologie

Während in den Zellausschnitten 2 und 3 die RV mehrheitlich eine klassische Kugelform aufweisen, haben die RV der Zelle 1 eine eher in die Länge gezogene ovale oder irreguläre Form (Abb. 4.19 - Abb. 4.22, Abb. 4.23: B - Abb. 4.25: B). In

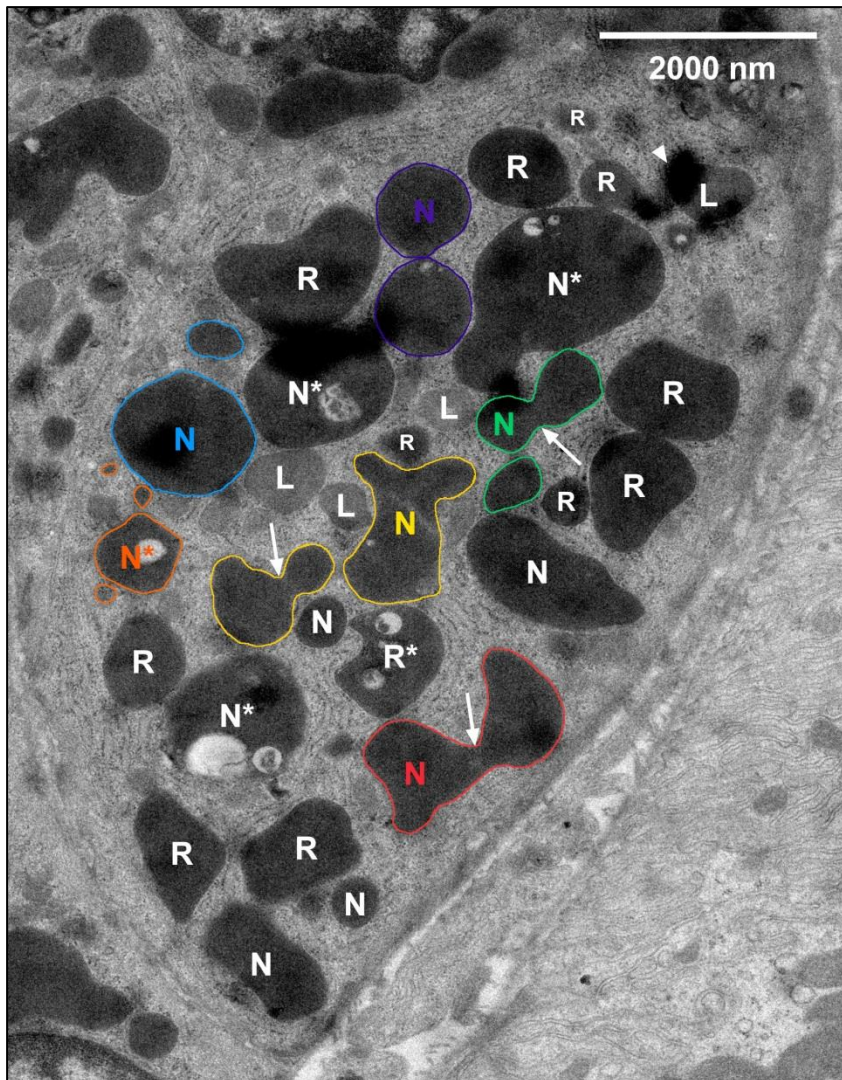


Abb. 4.20: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Reninspeichervesikel (R) und komplexer geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Ebenfalls zu erkennen sind weniger elektronendichte Renin-haltige Low-Density-Vesikel (L), Reninspeichervesikel mit vermehrten Vesikeleinschlüssen (*mit Asterisken markiert*) und mehrere Netzwerke, die aus fusionierenden Reninspeichervesikeln zu entstehen scheinen (*Pfeile*). Pfeilspitze Artefakt.

allen Zellausschnitten erscheinen die NV, als ob sie aus der Fusion von mehreren eRV entstehen. Insgesamt wirken die RV vor allem in den Zellen 2 und 3 stärker klassisch rund als die Speichervesikel der nicht stimulierten Wildtyp-JG-Zelle.

Manche NV weisen eine leicht inhomogene Elektronendichte auf. Davon sind vor allem diejenigen NV betroffen, die eine größere Anhäufung von RV-Einschlüssen aufweisen.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Der Messwert der durchschnittlichen Oberfläche der RV beträgt mit $6,69 \pm 0,23 \mu\text{m}^2$ das 1,4-fache und das durchschnittliche Volumen mit $0,86 \pm 0,04 \text{ fL}$ das 1,6-fache der durchschnittlichen Messwerte der rekonstruierten unstimulierten Wildtyp-JG-Zelle.

Die Mehrzahl der RV sind große eRV, wohingegen die NV mit $64,28 \pm 12,78 \%$ den insgesamt größeren Volumenanteil der RV ausmachen, da sie mit $2,00 \pm 0,16 \text{ fL}$ ein

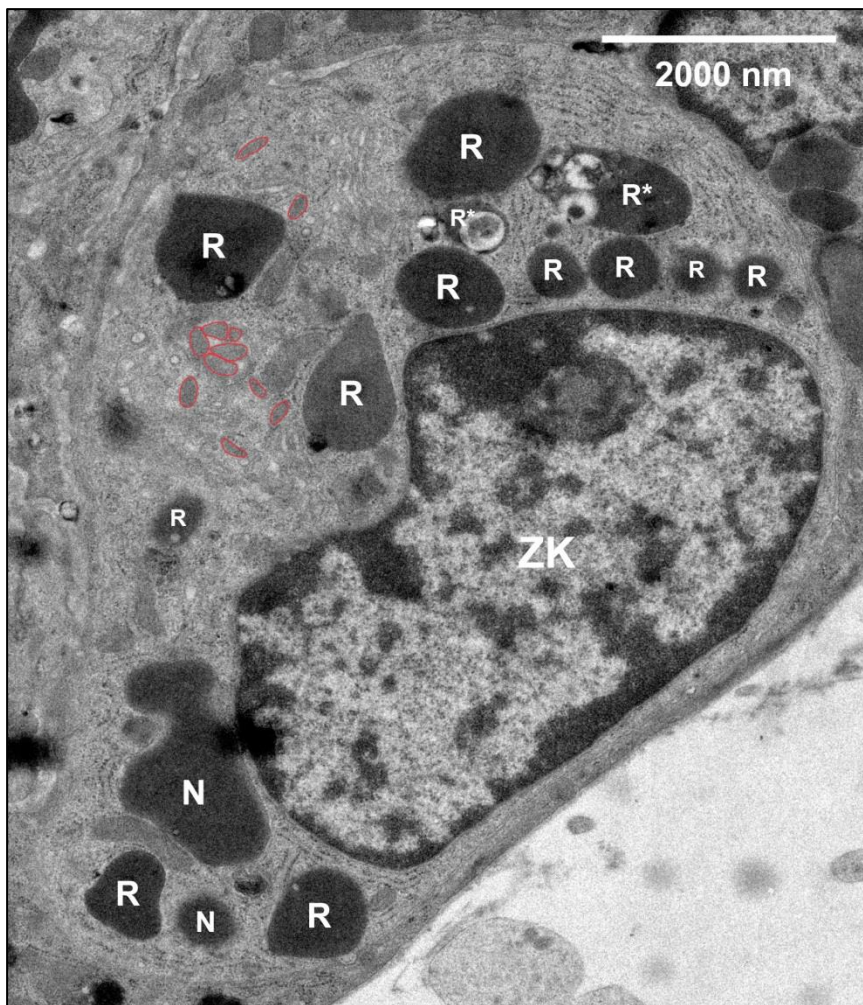


Abb. 4.21: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und ein komplexer geformtes Reninspeichervesikel-Netzwerk (N). Ebenfalls zu erkennen sind rautenförmige Reninspeichervesikel-Vorstufen (*hellrot umrandet*) und Reninspeichervesikel mit vermehrten Vesikeleinschlüssen (*mit Asterisken markiert*). ZK Zellkern.

4,1-fach höheres durchschnittliches Vesikelvolumen als die eRV ($0,49 \pm 0,06$ fL) aufweisen. Verglichen mit dem unstimulierten Wildtyp ist der prozentuale Anteil der NV tendenziell höher, das durchschnittliche Volumen der NV ist um den Faktor 1,6 und das durchschnittliche Volumen der eRV um den Faktor 1,7 größer.

Low-Density-Vesikel

Renin-haltige LDV sind in allen Zellausschnitten feststellbar, wobei deren durchschnittlichen Volumina ($0,12 \pm 0,10$ fL) und Oberflächen ($1,50 \pm 0,97 \mu\text{m}^2$) variieren (vgl. Abb. 4.20, Abb. 4.22, Abb. 4.23: F - Abb. 4.25: F).

Allgemeine Zellmorphologie

Alle in den Zellen vorkommenden Vesikeleinschlüsse sind tendenziell klein und in einzelne RV versprengt (vgl. Abb. 4.19 - Abb. 4.22, Abb. 4.23: F - Abb. 4.25: F). Vereinzelt kommen jedoch auch RV mit mehreren großen Einschlüssen vor. RV-V sind vor allem in den Zellen 2 und 3 zahlreich zu sehen (vgl. Abb. 4.21, Abb. 4.22, Abb. 4.24: F, Abb. 4.25: F). Ebenso weisen die Zellausschnitte vereinzelt „klare“ und inhomogene Vesikel auf.

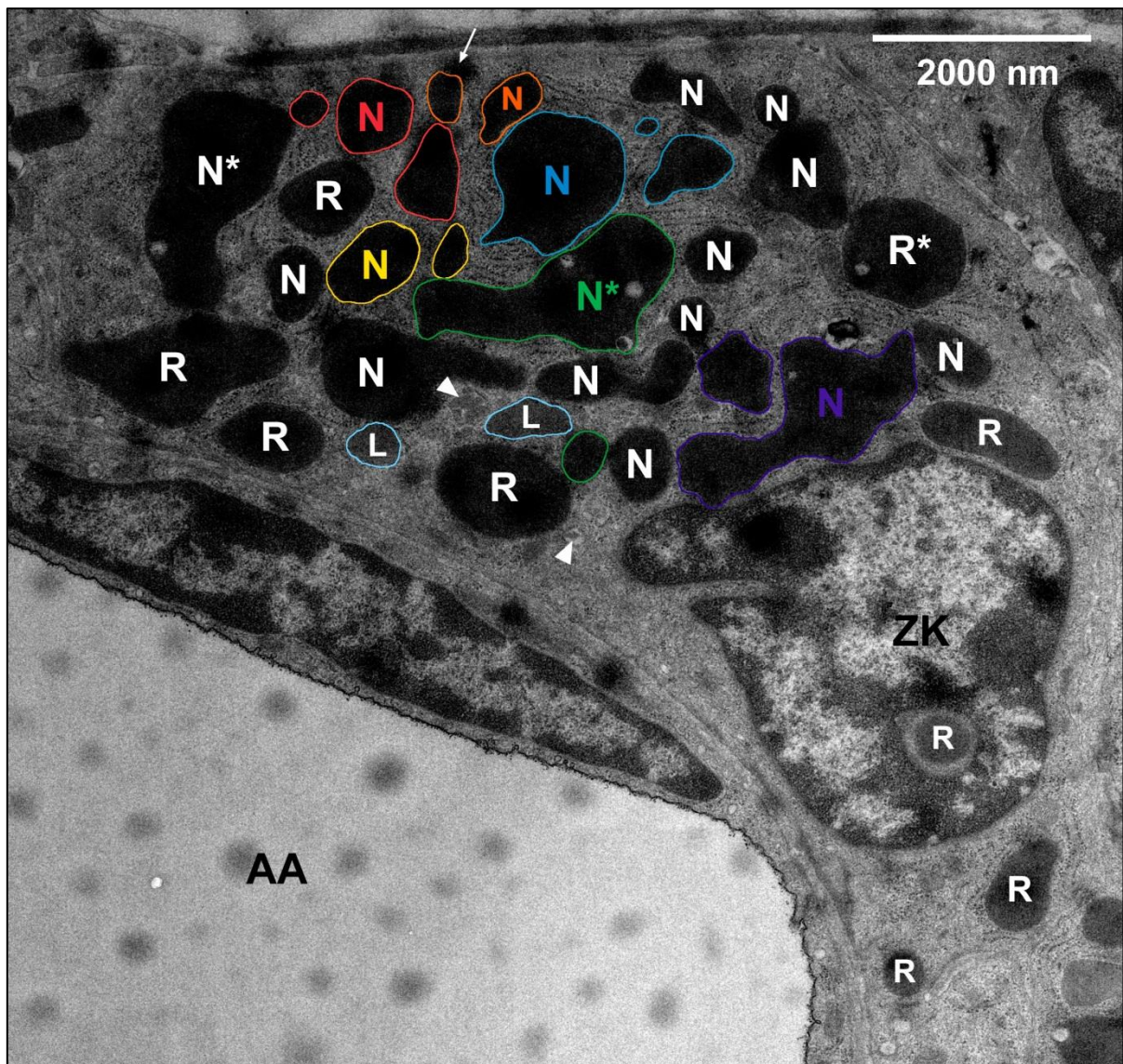


Abb. 4.22: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplexer geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Ebenfalls zu erkennen sind weniger elektronendichte Renin-haltige Low-Density-Vesikel (L), rautenförmige Reninspeichervesikel-Vorstufen (*Pfeilspitzen*) und Reninspeichervesikel mit vermehrten Vesikeleinschlüssen (*mit Asterisken markiert*). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). ZK Zellkern, *Pfeil* Artefakt.

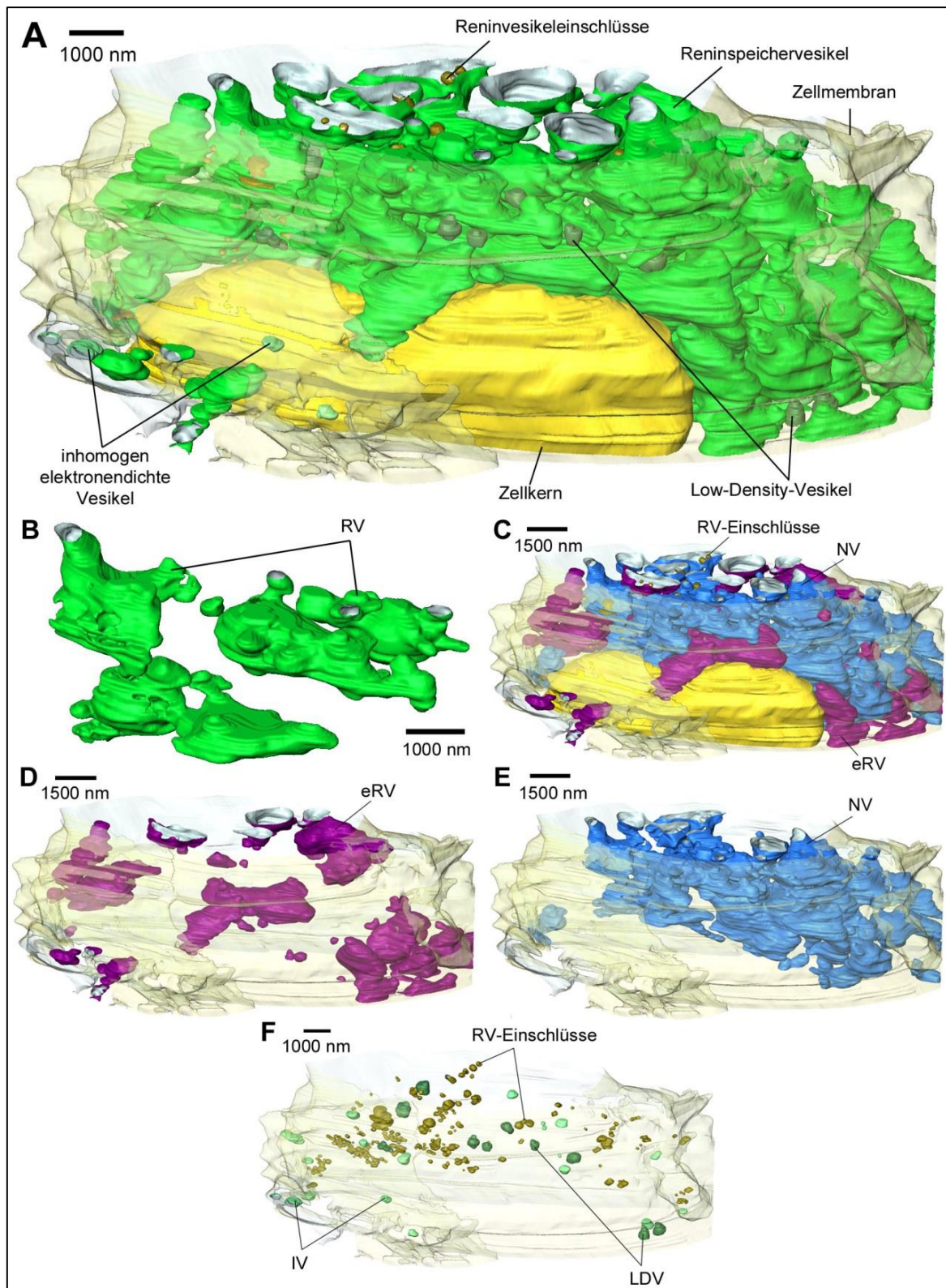


Abb. 4.23: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), Low-Density-Vesikeln (*dunkelgrün*, LDV), RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der LDV, RV-Einschlüsse und IV.

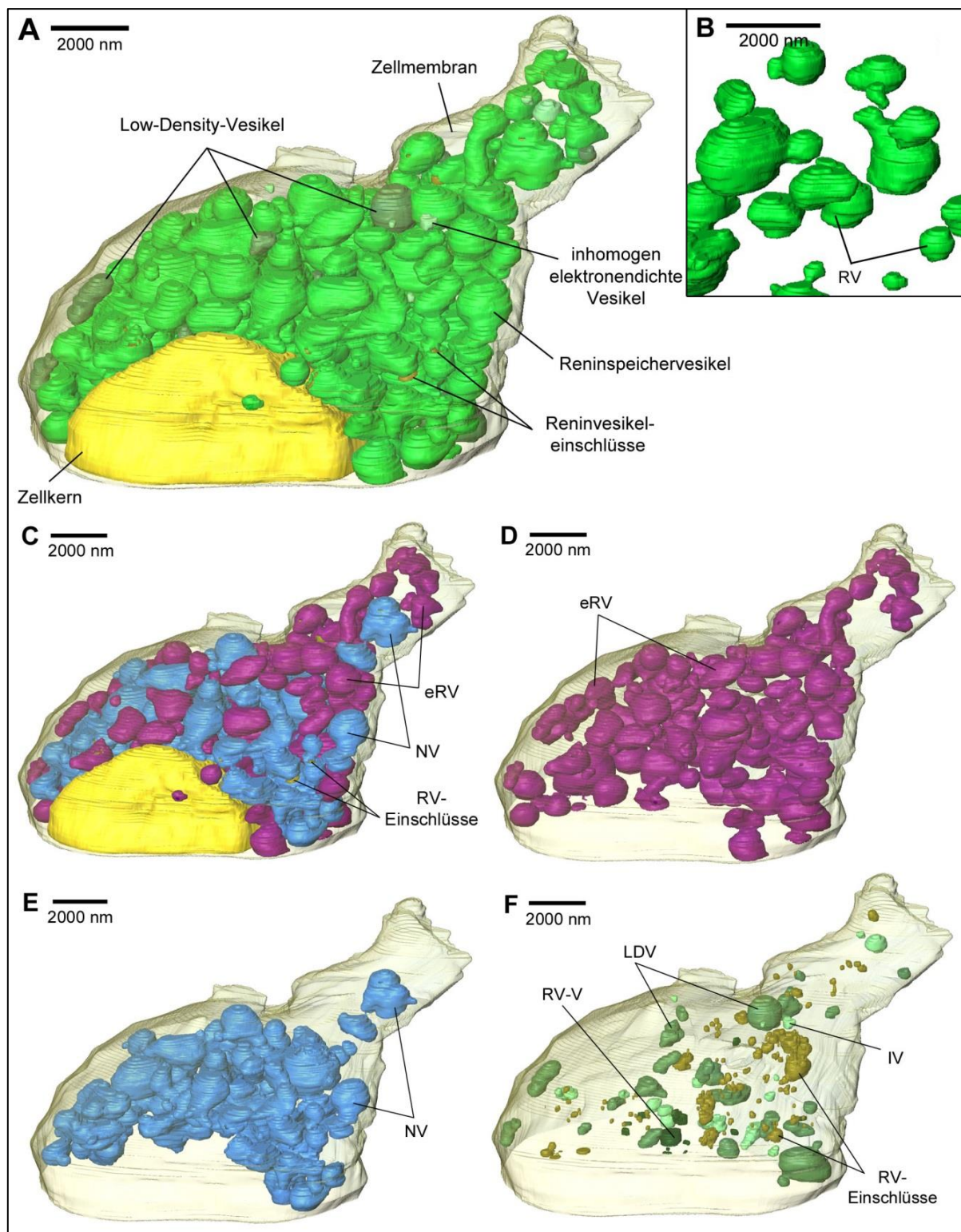


Abb. 4.24: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (transparent), Zellkern (gelb), Reninspeichervesikeln (grün, RV), Low-Density-Vesikeln (dunkelgrün, LDV), RV-Einschlüssen (dunkelgelb) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (hellgrün, IV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (violett, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (blau, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der LDV, RV-Vorstufen (schwarzgrün, RV-V), RV-Einschlüsse und IV.

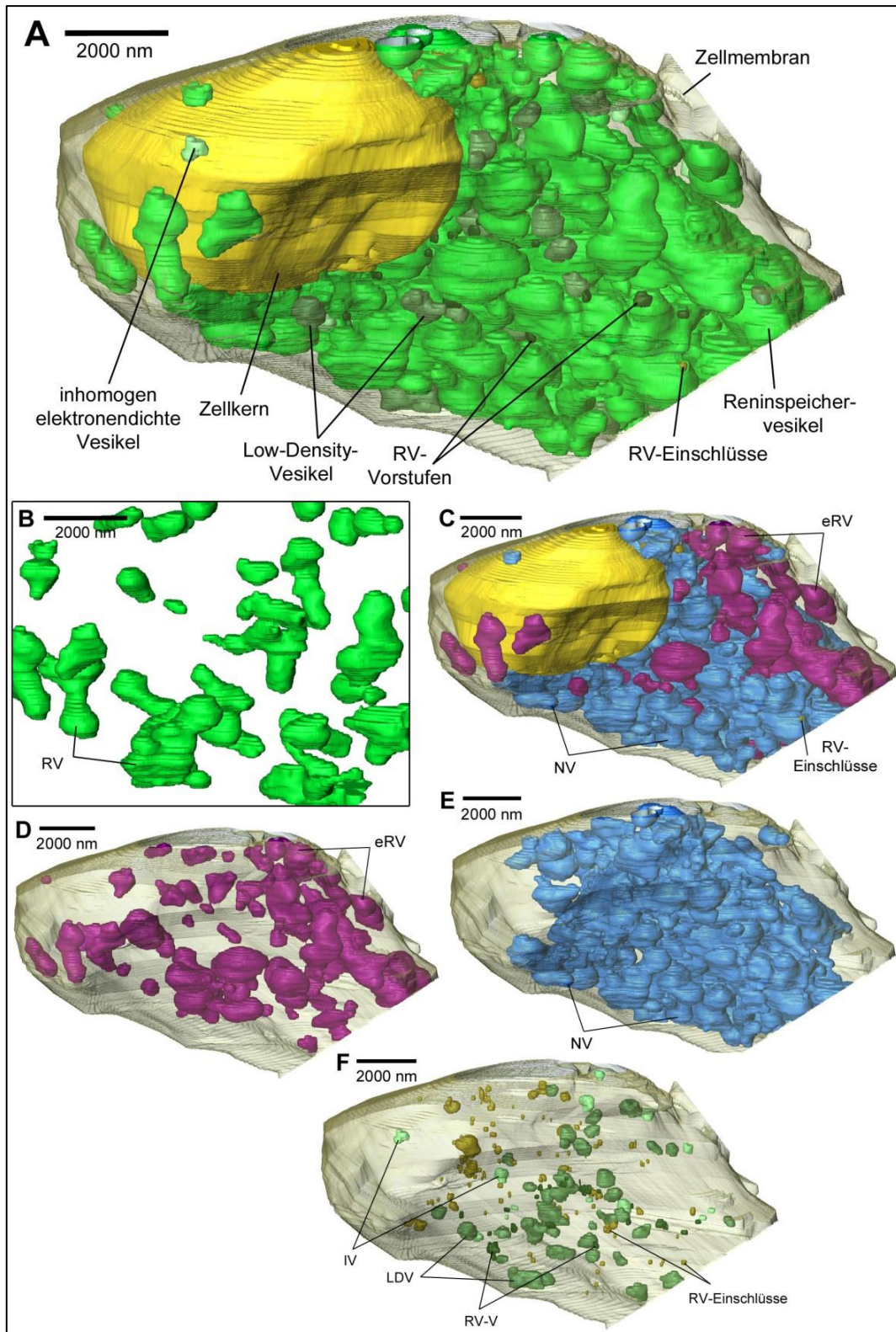


Abb. 4.25: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*), Low-Density-Vesikeln (*dunkelgrün*, LDV), Reninspeichervesikel-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V), RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von Reninspeichervesikeln (RV) zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der LDV, RV-V, RV-Einschlüsse und IV.

4.2.2.3 16-minütige Stimulation mit EGTA

Als Nächstes wird die Morphologie der JG-Zellausschnitte einer Wildtyp-Maus betrachtet, die für 16 Minuten mit 3,1 mM EGTA stimuliert wurde. Es wurden von drei ausgewählten Zellen lediglich zwei Zellen rekonstruiert. Für die Zelle 2 wurden zwei Teilausschnitte, 2.1 und 2.2, getrennt voneinander rekonstruiert, da beim Herstellen der Ultradünnschnitte mehrere Zwischenschnitte zu stark beschädigt wurden, um diese strukturell als einen Zellausschnitt darstellen zu können. Die Messwerte der Zelle 2 wurden zusammengefasst.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Sowohl auf den TEM-Aufnahmen als auch in den 3D-Rekonstruktionen der Zellausschnitte von Zelle 1 und 2 erkennt man, dass die RV neben dem Zellkern wieder einen großen Teil des Zellvolumens einnehmen (Abb. 4.26 - Abb. 4.28, Abb. 4.30: A - Abb. 4.32: A). Im Gegensatz zu den mit Iso stimulierten Wildtypzellen nehmen die RV jedoch mit $27,76 \pm 3,22$ % ein um 8,8 % geringeres Volumen der rekonstruierten Zellausschnitte ein (Tab. 1, Abb. 4.29: A).

Hinsichtlich der Anordnung wirken die Speichervesikel ein wenig gleichmäßiger im Zytosol verteilt, wobei sich die eRV und NV tendenziell in kleineren Gruppen lokal anhäufen (Abb. 4.30: B-D, Abb. 4.31: C-E, Abb. 4.32: B-D). Ob sich die NV in den mit EGTA stimulierten Wildtypzellen eher in der Mitte der Zelle vermehrt ansammeln, kann aufgrund der kleineren Zellausschnitte und der geringeren Anzahl der Vesikel nicht eindeutig festgestellt werden.

Tab. 1: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Wildtyps

	Unstimuliert n = 1	Isoproterenol n = 3	EGTA n = 2
Gesamtvesikelvolumen/ Zytosolvolumen (%)	33,45	$36,53 \pm 4,43$	$27,76 \pm 3,22$
Durchschnittliche Vesikeloberfläche (μm^2)	4,83	$6,69 \pm 0,23$	$4,17 \pm 0,98$
Durchschnittliches Vesikelvolumen (fL)	0,53	$0,86 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,19$
NV-Volumen/ Gesamtvesikelvolumen (%)	56,82	$64,28 \pm 12,78$	$80,59 \pm 3,44$
Durchschnittliches eRV-Volumen (fL)	0,30	$0,49 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,06$
Durchschnittliches NV-Volumen (fL)	1,28	$2,00 \pm 0,16$	$1,09 \pm 0,77$
Durchschnittliche LDV-Oberfläche (μm^2)	0,71	$1,50 \pm 0,97$	$7,25 \pm 3,83$
Durchschnittliches LDV-Volumen (fL)	0,04	$0,12 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,63$

Vergleich verschiedener Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung einer unstimulierten JG-Zelle (n=1) mit JG-Zellen, die für eine Dauer von 16 Minuten mit Isoproterenol (n=3) oder EGTA (n=2) stimuliert wurden. Von oben nach unten: MW des prozentualen Anteils der Reninspeichervesikel (RV) am Gesamtvolumen des Zytosols; MW der durchschnittlichen Vesikeloberflächen und -volumina aller RV; MW des prozentualen Anteils der Reninspeichervesikel-Netzwerke (NV) am Gesamtvolumen der RV; MW der durchschnittlichen Vesikelvolumina der einzelnen Reninspeichervesikel (eRV) und NV; MW der durchschnittlichen Vesikelvolumina der Low-Density-Vesikel (LDV). Die LDV sind bei allen Messwerten eingerechnet, das Very-Low-Density-Vesikel wird bei allen Messwerten außer dem durchschnittlichen Vesikelvolumen der LDV berücksichtigt.

RV-Morphologie

Hinsichtlich der Morphologie fällt in allen Zellen auf, dass die eRV ihre klassische Kugelform fast vollständig verloren haben und deutlich irregulär geformt sind (Abb. 4.26 - Abb. 4.28, Abb. 4.30: A, Abb. 4.31: B, Abb. 4.32: A). Dies gilt auch für die NV. Vor allem im Zellausschnitt 2.1 sind die NV stärker verzweigt und wirken, als bestünden sie aus vielen kleineren fusionierten Kugeln.

Die Abstände zwischen den RV sind geringer und Berührungen zwischen den Speichervesikeln können im Vergleich zum mit Iso stimulierten Wildtyp häufiger festgestellt werden. In der Zelle 2 kommen sich manche RV so nahe, dass die Grenzen zwischen den einzelnen Vesikeln teils schwer zu erkennen sind.

Generell weisen die RV in den TEM-Aufnahmen oft eine inhomogene Elektronendichte und sehr viele Einschlüsse auf. Dies betrifft vor allem die NV, die teilweise weniger wie ein zusammenhängendes Vesikel wirken, sondern eher einem inhomogenen Vesikel-Konglomerat ähneln, in dem unterschiedlich elektronendichte RV eingeschlossen wurden.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Der Messwert der durchschnittlichen Oberfläche der RV beträgt mit $4,17 \pm 0,98 \mu\text{m}^2$ um 38 % weniger und das durchschnittliche Volumen ist mit $0,40 \pm 0,19 \text{ fL}$ sogar um 53 % geringer als die durchschnittlichen Messwerte der mit Iso stimulierten Wildtyp-JG-Zellen (Tab. 1, Abb. 4.29: B, D).

Die Mehrzahl der RV sind eRV, wobei die NV bei den mit EGTA stimulierten Wildtypzellen mit $80,59 \pm 3,44 \%$ insgesamt einen noch größeren Volumenanteil der RV ausmachen als in den unstimulierten und mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen (Tab. 1, Abb. 4.29: C-D). Das Volumen der eRV ist mit $0,12 \pm 0,06 \text{ fL}$ jedoch im Vergleich zu den mit Iso stimulierten Wildtypen durchschnittlich um 76 % kleiner und das Volumen der NV mit $1,09 \pm 0,77 \text{ fL}$ um 46 % geringer.

Low-Density-Vesikel

Im Vergleich zu den eher kleinen LDV in den mit Iso stimulierten Wildtypzellen weisen in den mit EGTA stimulierten Wildtypzellen vor allem größere Netzwerke eine sehr inhomogene und geringe Elektronendichte auf (Abb. 4.26: B-C, Abb. 4.27: A, Abb. 4.30: E, Abb. 4.31: F). Dadurch ergeben sich für das durchschnittliche Volumen der LDV ($0,79 \pm 0,63 \text{ fL}$) um das 6,5-fach höhere Werte als bei den mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen und für die durchschnittliche Oberfläche ($7,25 \pm 3,83 \mu\text{m}^2$)

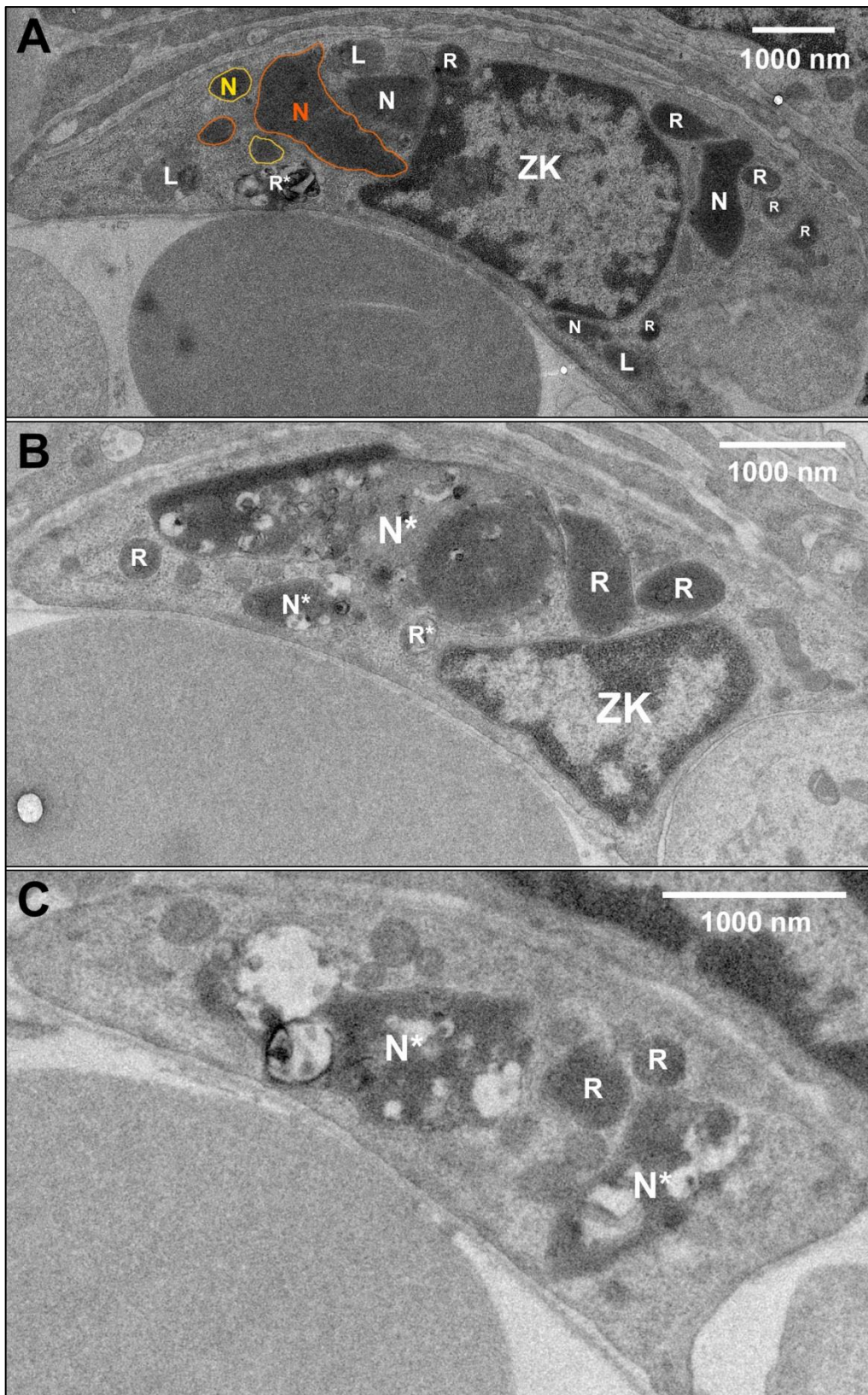


Abb. 4.26: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält vorwiegend irreguläre elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und irregulär geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Neben den weniger elektronendichten Renin-haltigen Low-Density-Vesikel (L) weist der mit EGTA stimulierte Wildtyp auch Reninspeichervesikel auf, die eine stark inhomogene Elektronendichte und vermehrt Vesikeleinschlüsse aufweisen (e*, N*). **B:** Das große N* wirkt wie ein inhomogenes Vesikel-Konglomerat. ZK Zellkern.

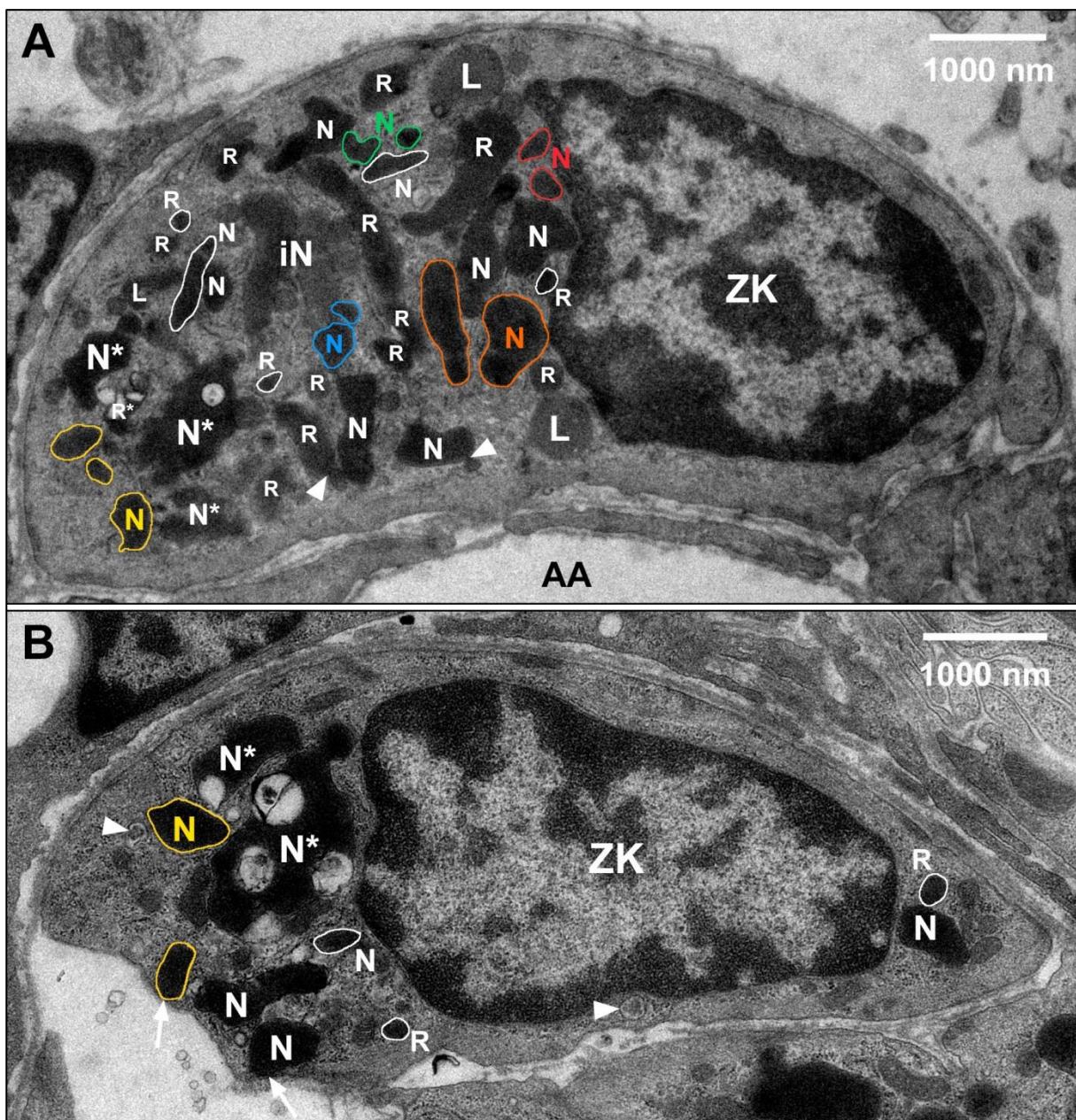


Abb. 4.27: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält vorwiegend irreguläre elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und irregulär geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. **A:** Manche Reninspeichervesikel weisen in diesem Schnitt kleine „ausknospende“ Vesikel auf (*Pfeilspitzen*). Neben den weniger elektronendichten Renin-haltigen Low-Density-Vesikeln (L) weist der mit EGTA stimulierte Wildtyp auch ein Netzwerk auf, das eine stark inhomogene Elektronendichte aufweist (iN). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2.1. **B:** Dieser Zellausschnitt zeigt zwei Netzwerke mit Zellmembran-Kontakt (*Pfeile*) und inhomogen elektronendichte Vesikel (*Pfeilspitzen*). TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2.2. Asteriske Reninspeichervesikel mit sichtbaren Einschlüssen in der TEM-Aufnahme, ZK Zellkern.

der LDV 4,8-fach höhere Messwerte (Tab. 1, Abb. 4.29: D).

Im Zellausschnitt 2.2 befindet sich ein in der 3D-Rekonstruktion nicht vollständig abgebildetes großes Vesikel sehr geringer Elektronendichte mit 9,53 fL und 33,52 μm^2 ,

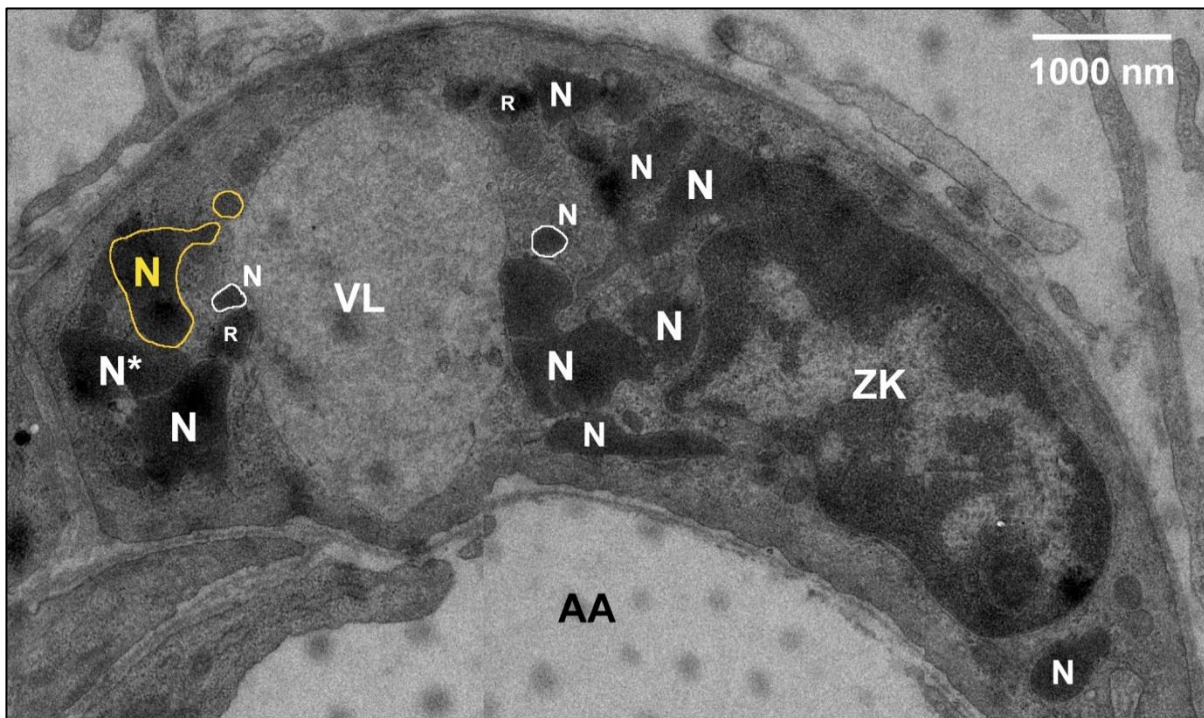


Abb. 4.28: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 2.2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält vorwiegend irreguläre elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und irregulär geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Dieser Zellausschnitt weist zudem ein großes Very-Low-Density-Vesikel (VL) auf. Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. Asterisk Reninspeichervesikel mit sichtbaren Einschlüssen in der TEM-Aufnahme, AA afferente Arteriole, ZK Zellkern.

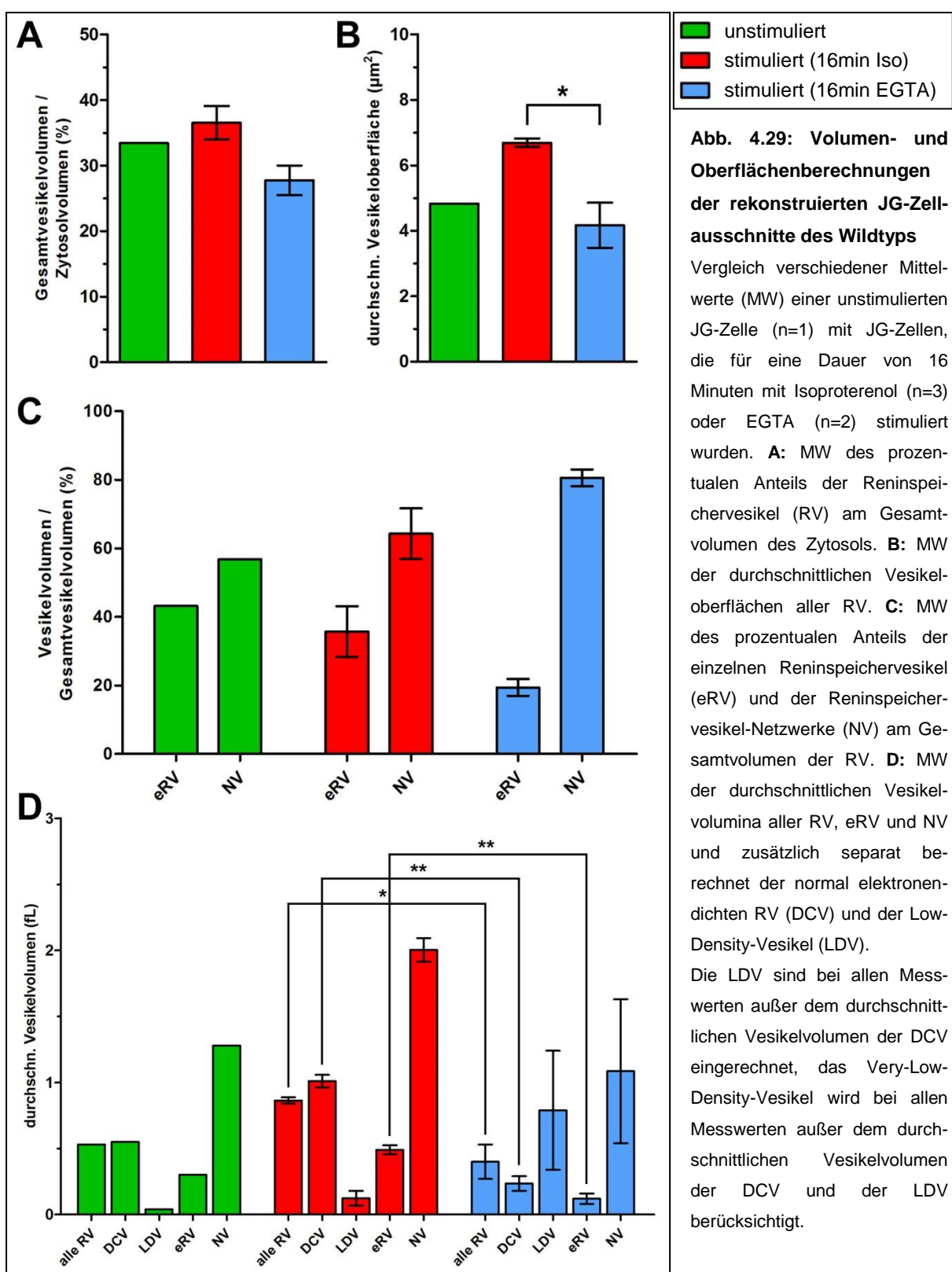
das als ein weitgehend entleertes RV gewertet wird (Abb. 4.28, Abb. 4.32: A). Dieses Very-Low-Density-Vesikel (VLDV) nimmt 26 % des Gesamtvolumens aller RV dieses Zellausschnittes ein.

Allgemeine Zellmorphologie

Die mit EGTA stimulierten Wildtyp-Zellen weisen vermehrt RV-Einschlüsse auf, die im Vergleich zu den mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen in einzelnen RV teilweise stark angehäuft auftreten (vgl. Abb. 4.26 - Abb. 4.28, Abb. 4.30: E, Abb. 4.31: F, Abb. 4.32: A). RV-V werden in den Zellausschnitten nicht festgestellt und auch die nicht Renin-haltigen „klaren“ und inhomogenen Vesikel können nur vereinzelt beobachtet werden.

Morphologie des nicht rekonstruierten Zellausschnittes 3

Der Zellausschnitt 3 konnte nicht rekonstruiert werden, da keine normalen RV erkennbar sind (Abb. 4.33). Stattdessen wird der Großteil des Zellvolumens von kleinen, Schaum-ähnlichen Vesikeln unterschiedlicher Elektronendichte und Größe



gefüllt. Da die benachbarten Zellen sich normal präsentieren, kann ein Artefakt ausgeschlossen werden.

Manche Bläschen haben die Elektronendichte normaler RV und andere ähneln großen Vesikeleinschlüssen. Hinsichtlich der Form weisen die „Reninspeichervesikel“

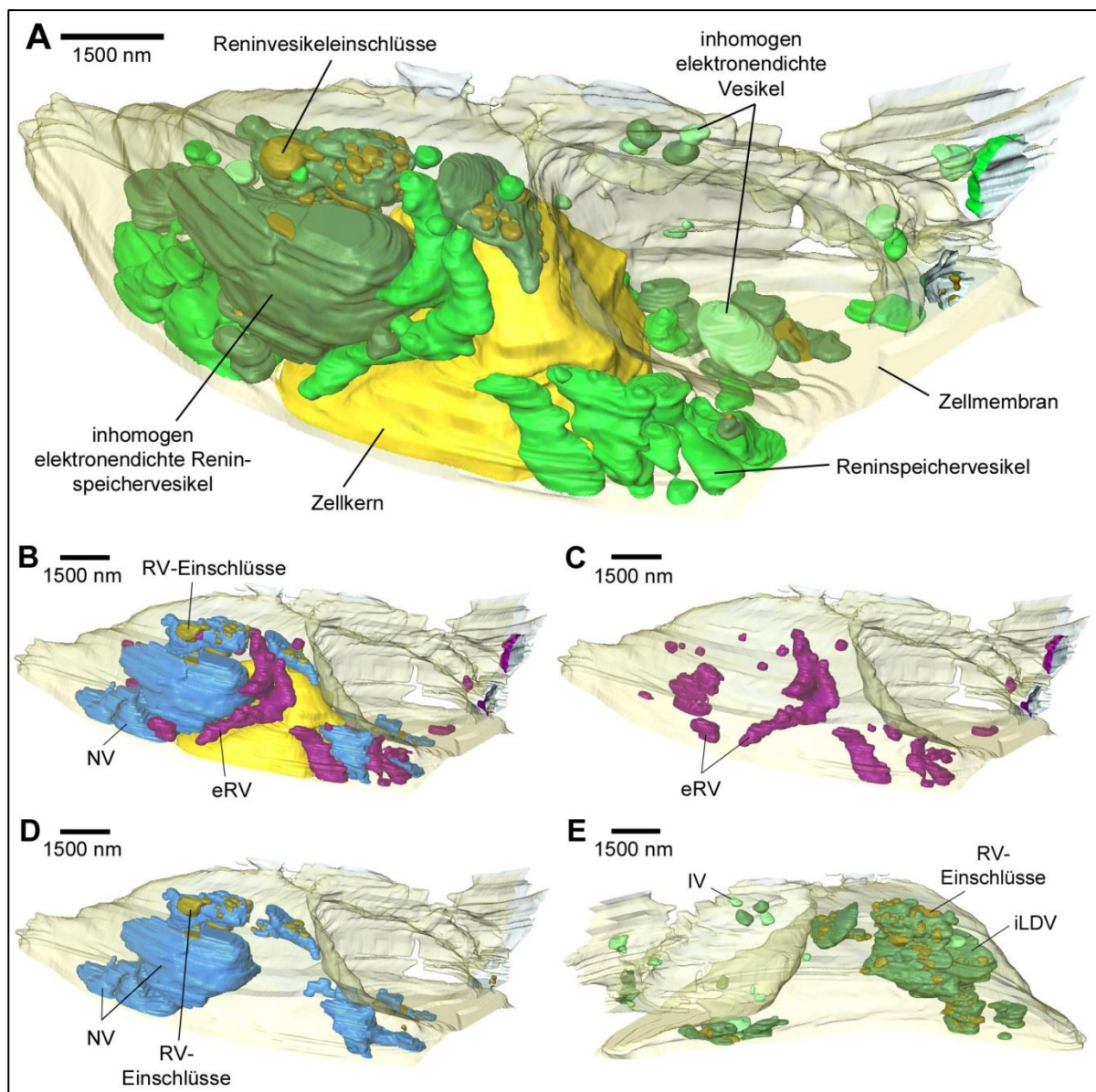


Abb. 4.30: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), inhomogen elektronendichten RV bzw. Low-Density-Vesikeln (*dunkelgrün*, iLDV), RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **C-D:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **E:** Darstellung der iLDV, RV-Einschlüsse und IV.

tendenziell Ähnlichkeiten zu den RV des Zellausschnittes 2 auf. Die Inhomogenität der Elektronendichte mancher RV konnte nicht nur in diesem Zellausschnitt, sondern ebenfalls in den anderen beiden dreidimensional rekonstruierten Zellen festgestellt werden. Auch die wie Vesikeleinschlüsse-wirkende Bläschen ähneln morphologisch den RV-Einschlüssen der beiden anderen, mit EGTA stimulierten JG-Zellen.

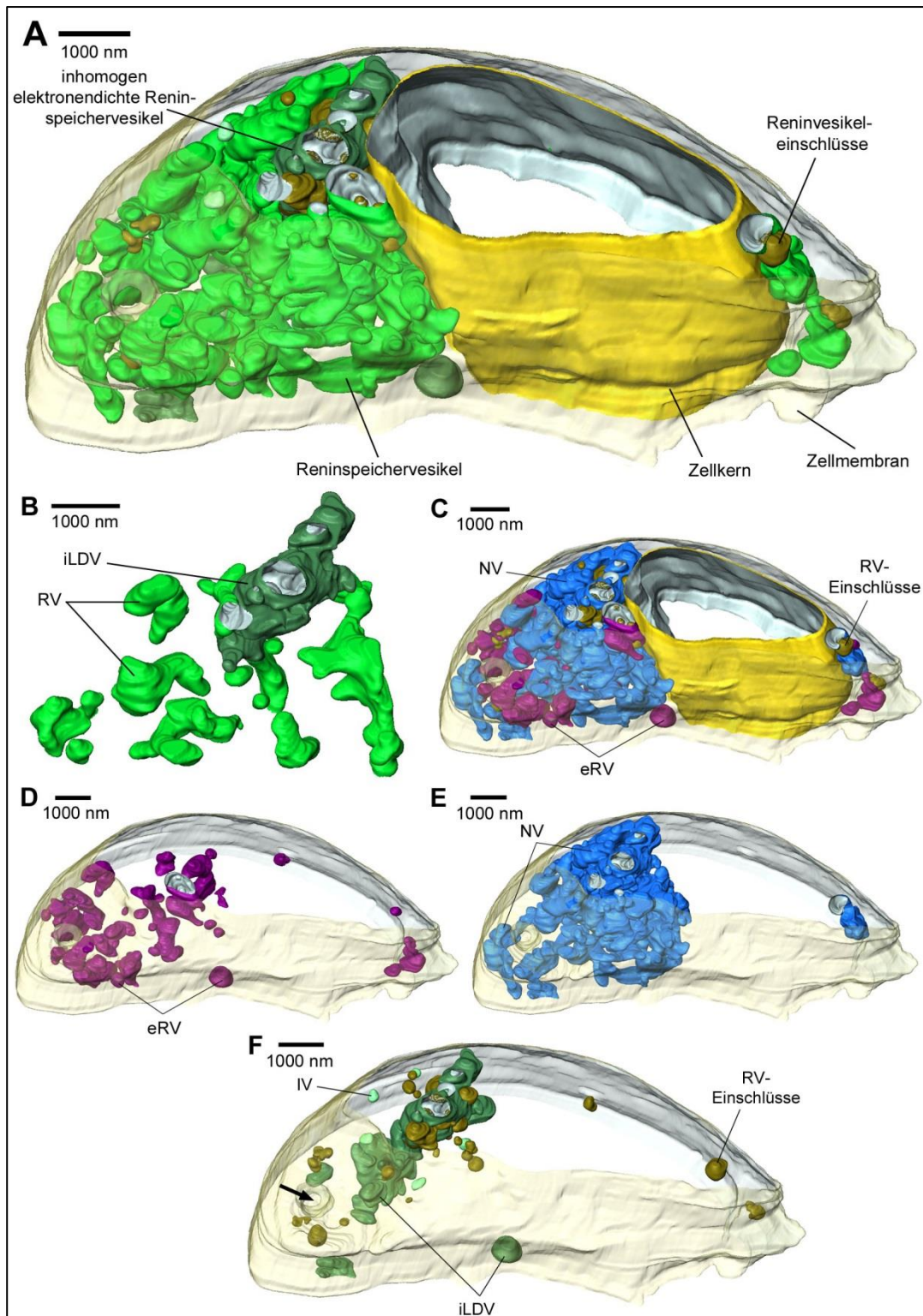


Abb. 4.31: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2.1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), inhomogen elektronendichten RV bzw. Low-Density-Vesikeln (*dunkelgrün*, iLDV), RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von RV und iLDV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der iLDV, RV-Einschlüsse und IV. Der Pfeil weist auf eine Einstülpung der Zellmembran.

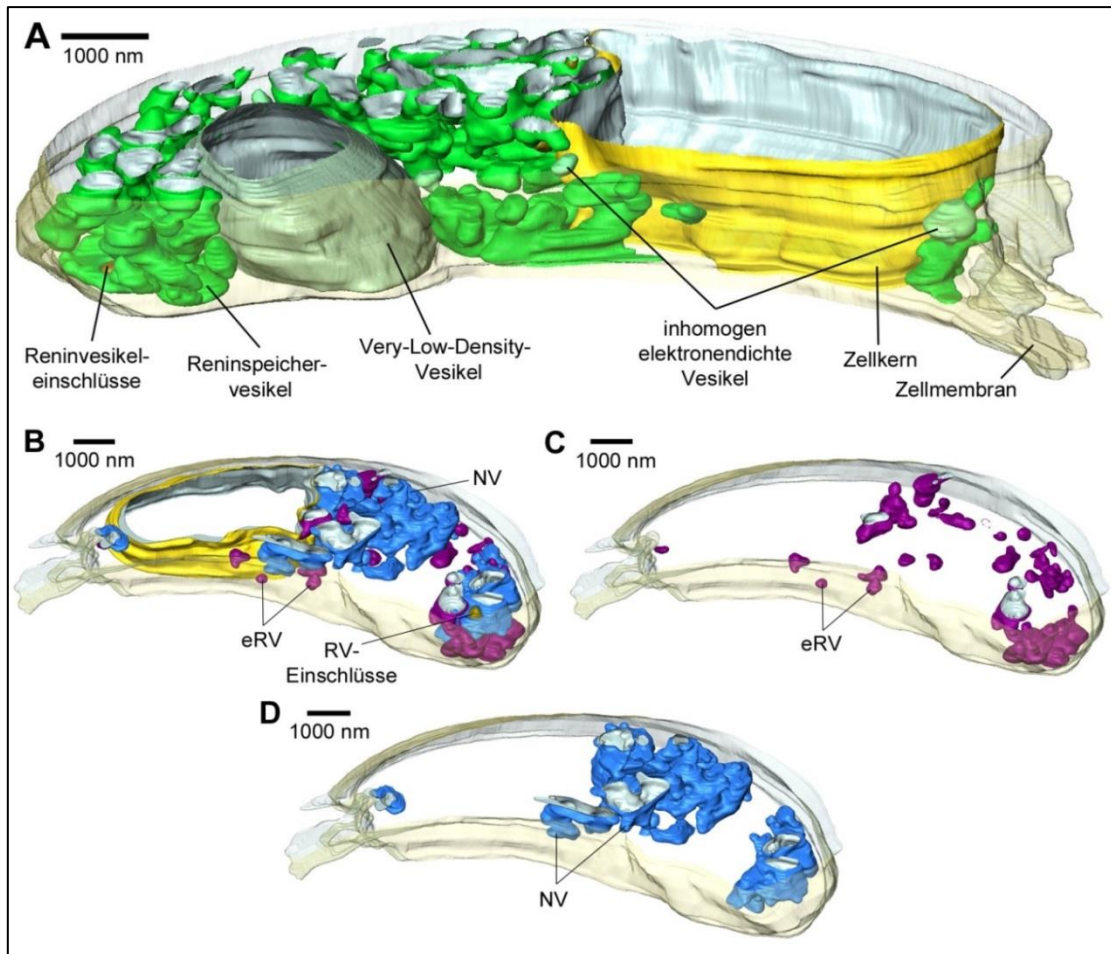


Abb. 4.32: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2.2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), einem Very-Low-Density-Vesikel (*graugrün*), RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **C-D:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt.

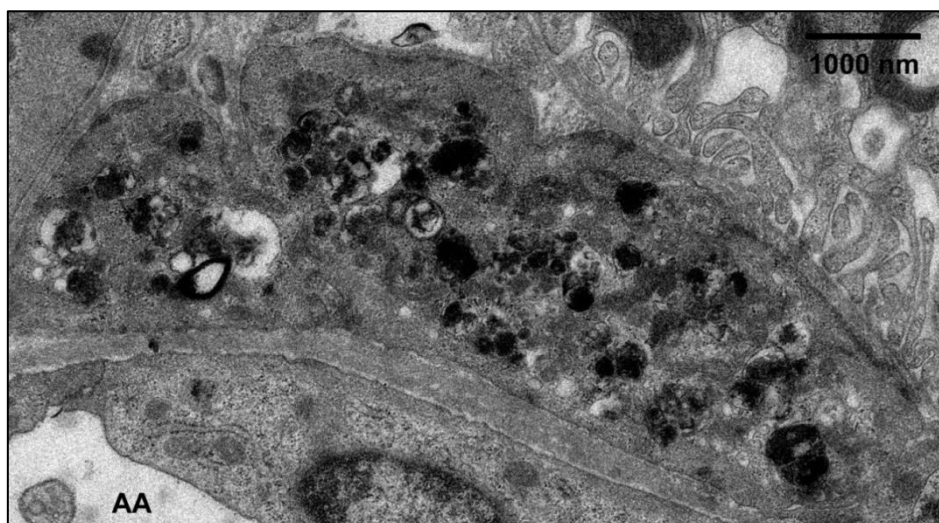


Abb. 4.33: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält keine klassischen elektronendichten Reninspeichervesikel, sondern viele kleine Bläschen-ähnliche Vesikel unterschiedlicher Elektronendichte. Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA).

4.3 Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen einer Cx40^{-/-}-Maus

Wie im Abschnitt 2.5.3 bereits erwähnt, sind JG-Zellen sowohl untereinander als auch mit benachbarten Endothel-, glatten Muskel- oder extraglomerulären Mesangialzellen durch Gap Junctions verbunden. Diese Kanäle setzen sich bei Renin produzierenden Zellen überwiegend aus Cx40 zusammen.

Cx40^{-/-}-Mäuse weisen unter anderem Bluthochdruck, einen Anstieg der Reninsynthese und des Plasmaprenins und einen defekten Barorezeptorreflex auf. Dies weist darauf hin, dass Cx40 bei der Übermittlung inhibitorischer Signale auf JG-Zellen eine Rolle spielt. In JG-Zellen wird die Hauptinhibition der Reninsekretion durch die Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration vermittelt. Aufgrund dieser Beobachtungen erschien es sinnvoll, die Morphologie der RV in unstimulierten und mit Iso oder EGTA stimulierten JG-Zellen von Cx40^{-/-}-Mäusen näher zu betrachten.

4.3.1 Untersuchung einer unstimulierten JG-Zelle

Zuerst wird die Morphologie der JG-Zellausschnitte einer unstimulierten Cx40^{-/-}-Maus anhand von TEM-Aufnahmen und der 3D-Rekonstruktion einer Knockout-JG-Zelle betrachtet.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Sowohl auf den TEM-Aufnahmen als auch in der 3D-Rekonstruktion und bei den von *Amira* berechneten Messwerten des rekonstruierten Zellausschnittes ist erkennbar, dass die RV mit 46,66 % neben dem Zellkern einen großen Teil des Zellvolumens einnehmen, der ungefähr 13 % größer ist als im unstimulierten Wildtyp (Abb. 4.34, Abb. 4.35: A). Da jeweils nur für eine unstimulierte JG-Zelle Messwerte vorliegen, können jedoch keine aussagekräftigen Angaben zur Signifikanz gemacht werden. Auf den TEM-Aufnahmen kann beobachtet werden, dass der Zellausschnitt dichter mit RV gefüllt ist als die etwas lockerere Anordnung der RV im unstimulierten Wildtyp. Die RV scheinen sich jedoch im Vergleich nicht häufiger zu berühren.

Hinsichtlich der Anordnung der Speichervesikel fällt keine spezielle Verteilung im Zytosol auf (Abb. 4.35: C-D). Erkennbar sind nur zwei NV und davon befindet sich eines nahe der Zellmembran und eines mittig im Zellausschnitt.

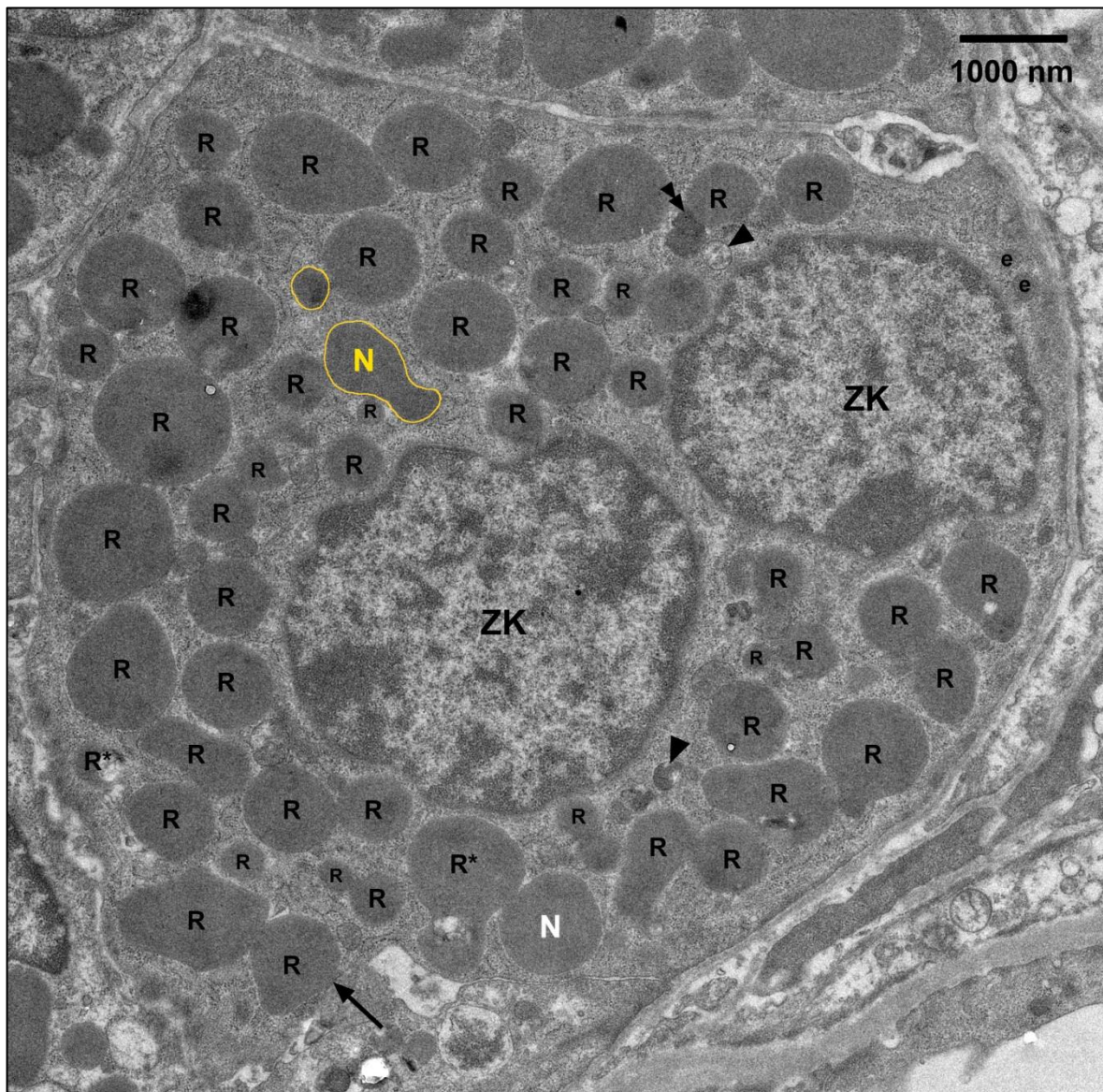


Abb. 4.34: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts (Cx40-Knockout, unstimuliert, 3800x)

Die JG-Zelle enthält klassische elektronenmikroskopisch dichte Renin-haltige Speichervesikel (R) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Dieser Zellausschnitt zeigt ein Reninspeichervesikel mit Zellmembran-Kontakt (*Pfeil*). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). *Asterisk* Reninspeichervesikel mit Vesikeleinschluss, *Pfeilspitzen* inhomogen elektronendichte Vesikel, *Doppelpfeil* Reninspeichervesikel mit variierender Elektronendichte, *ZK* Zellkern.

RV-Morphologie

Die eRV weisen fast ausschließlich eine klassische Kugelform oder eine leicht in die Länge gezogene ovale Form auf (Abb. 4.34, Abb. 4.35: B). NV konnten kaum festgestellt werden und weisen ebenfalls eine runde oder ovale Form und keine großen Verzweigungen auf. Auch hier entsteht der Eindruck, dass die NV durch die Fusion von einzelnen eRV entstehen. Im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp ist die

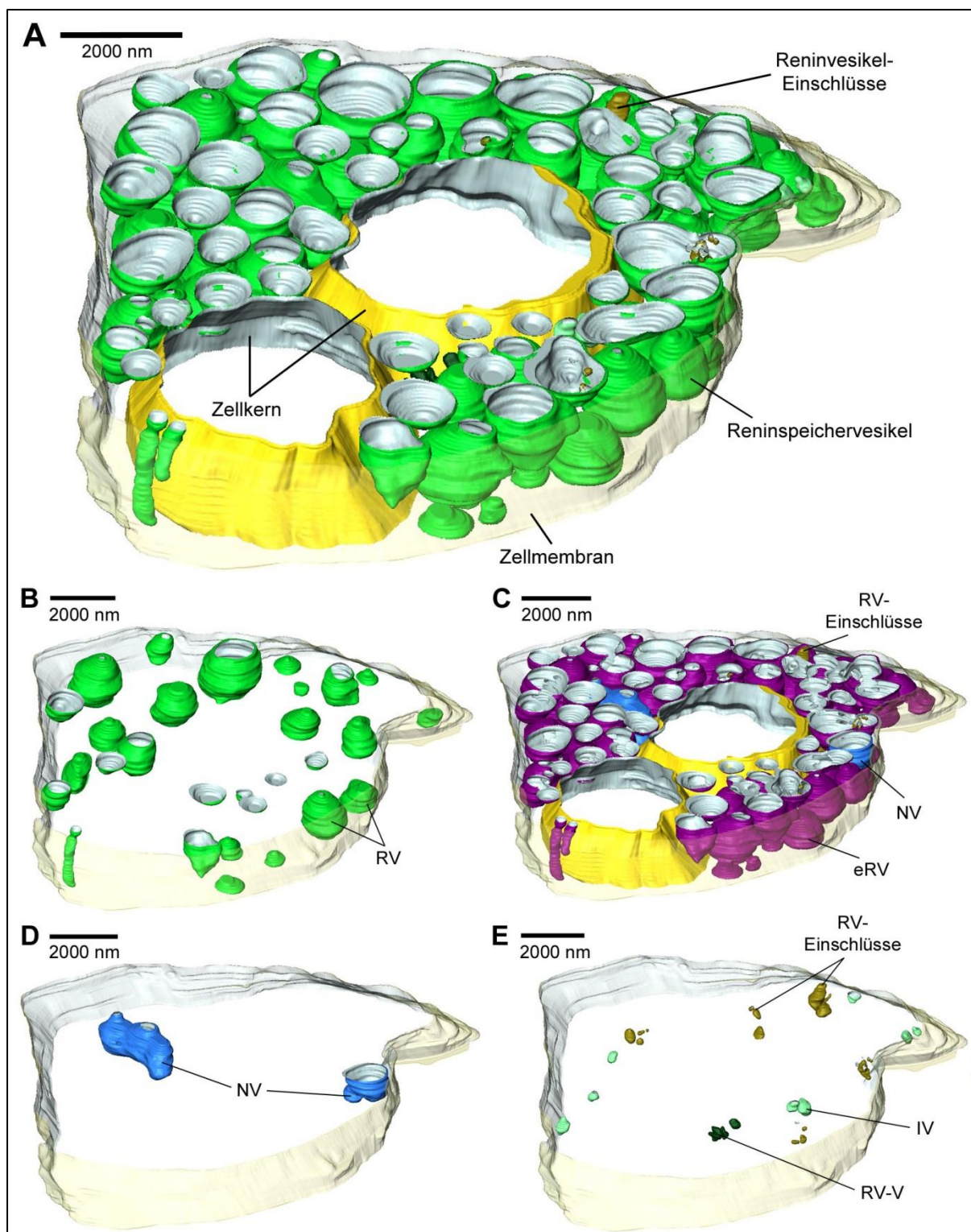


Abb. 4.35: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts (CX40-Knockout, unstimuliert, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV) und RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*). **B:** Auswahl von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in klassische einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D:** Darstellung der NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **E:** Darstellung der RV-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V), RV-Einschlüsse und der inhomogen elektronendichte Vesikel (*hellgrün*, IV).

Form der RV im unstimulierten Knockout noch „klassischer“, kugelförmiger und auch die NV sind kaum irregulär. Es gibt keine nennenswerten Inhomogenitäten hinsichtlich der Elektronendichte der RV in den TEM-Aufnahmen.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Mit $4,49 \mu\text{m}^2$ und $0,52 \text{ fL}$ sind die Messwerte der durchschnittlichen Oberfläche und des durchschnittlichen Volumens der RV den Werten der unstimulierten Wildtyp-Zelle nahezu identisch.

Die große Mehrheit der RV sind eRV, die mit $94,89 \%$ auch den eindeutig überwiegenden Volumenanteil der RV ausmachen. Dieser Wert unterscheidet sich deutlich von allen rekonstruierten Wildtyp-JG-Zellen, bei denen stets die NV den größeren Volumenanteil der RV aufweisen. Mit einem durchschnittlichen eRV-Volumen von $0,50 \text{ fL}$ und NV-Volumen von $1,36 \text{ fL}$ unterscheiden sich die Volumina um den Faktor 2,7. Damit ist der Unterschied zwischen eRV und NV geringer als beim unstimulierten Wildtyp, die durchschnittlichen Speichervesikel-Volumina sind jedoch tendenziell größer.

Low-Density-Vesikel

Renin-haltige LDV konnten im Zellausschnitt des unstimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ nicht festgestellt werden.

Allgemeine Zellmorphologie

Generell wurden RV-Einschlüsse nur vereinzelt beobachtet. Exemplarisch wurden die wenigen Einschlüsse in diesem Zellausschnitt rekonstruiert. Vereinzelt konnten RV-V und „klare“ oder inhomogene, nicht Renin-haltige Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 4.34, Abb. 4.35: E).

4.3.2 Untersuchung von stimulierten JG-Zellen

4.3.2.1 Messung der Reninsekretionsrate

Auch für den Knockout wurden Reninsekretionsraten gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollwerten im unstimulierten Zustand mit einem Mittelwert von $63,2 \pm 3,1 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$ zeigt sich beim Knockout unter Stimulation mit 10 nM Iso nach 12 Minuten eine 17,7-fache Steigerung der RSR auf $1120,7 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$ und nach 16 Minuten eine 18,3-fache Steigerung auf $1157,9 \text{ ng Angiotensin I / (h*min*g)}$ (Abb. 4.36). Im Vergleich zum Wildtyp sind die Absolutwerte

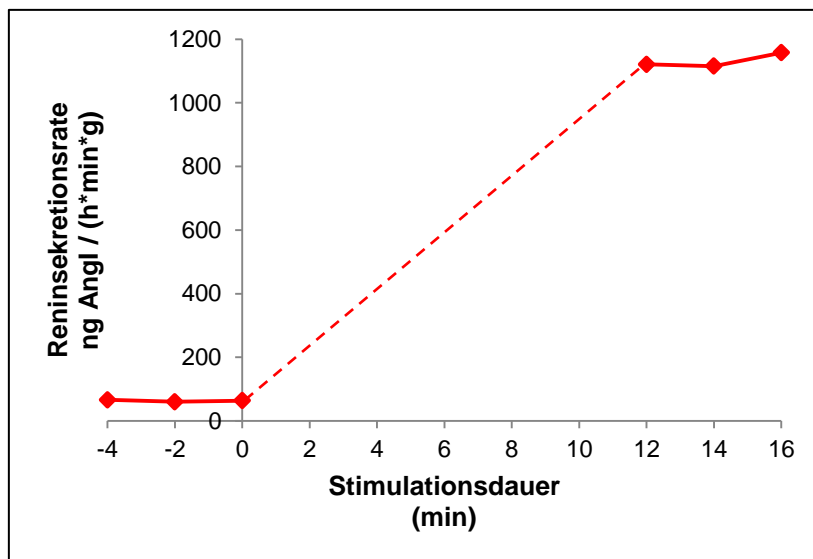


Abb. 4.36: IPN-Protokoll der Stimulation einer Cx40-Knock-out-Niere mit Isoproterenol

Nach Stabilisierung der Durchflussrate des Dialysats und nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt: 0 Minuten) erfolgt die 16-minütige Stimulation mit 10 nM Isoproterenol. Die Reninsekretionsrate wurde erneut nach 12 Minuten, 14 Minuten und 16 Minuten gemessen.

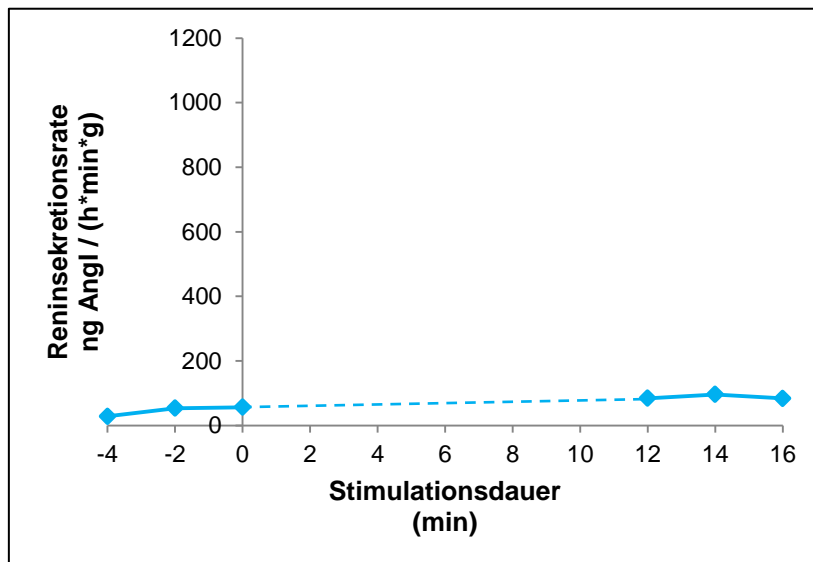


Abb. 4.37: IPN-Protokoll der Stimulation einer Cx40-Knock-out-Niere mit EGTA

Nach Stabilisierung der Durchflussrate des Dialysats und nach Beendigung des Kontrollabschnitts (Zeitpunkt: 0 Minuten) erfolgt die 16-minütige Stimulation mit 3,1 mM EGTA. Die Reninsekretionsrate wurde erneut nach 12 Minuten, 14 Minuten und 16 Minuten gemessen.

der RSR beim Cx40^{-/-} höher, die Steigerung der RSR während der Behandlung mit Iso ähnelt sich jedoch.

Nach Stimulation mit 3,1 mM EGTA, die zur Abnahme der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt, steigt die RSR des Knockouts verglichen mit den Kontrollwerten von $46,1 \pm 15,5$ ng Angiotensin I / (h*min*g) nach 12 Minuten kaum merklich auf den nur knapp 1,8-fachen Wert von $84,3$ ng Angiotensin I / (h*min*g), wobei nach 14 und 16 Minuten die Werte nahezu identisch sind und auf keine weitere Steigerung der Sekretion schließen lassen (Abb. 4.37). Damit ist die RSR des Cx40^{-/-} nach 16-minütiger Stimulation mit EGTA um den Faktor 8,5 geringer als die RSR des mit EGTA stimulierten Wildtyp.

4.3.2.2 16-minütige Stimulation mit Isoproterenol

Zur Betrachtung der Morphologie der mit 10 nM Iso stimulierten JG-Zellausschnitten einer Cx40^{-/-}-Maus wurden drei Zellausschnitte rekonstruiert.

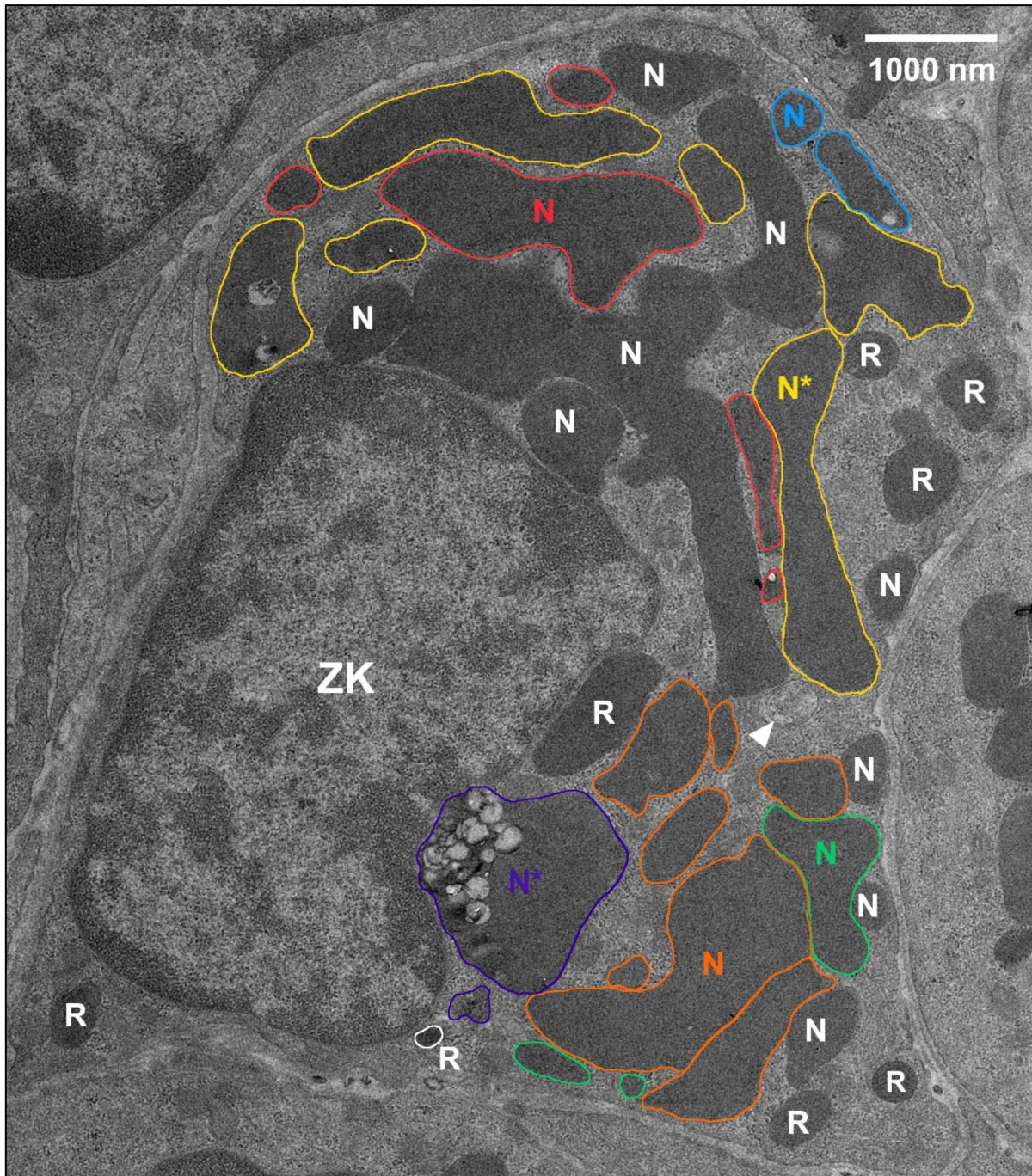


Abb. 4.38: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder irregulär geformte, elektronenmikroskopisch dichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. *Asteriske* Reninspeichervesikel mit sichtbaren Einschlüssen in der TEM-Aufnahme, *Pfeilspitze* inhomogen elektronendichtes Vesikel, ZK Zellkern.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Sowohl die TEM-Aufnahmen als auch die 3D-Rekonstruktionen und die von *Amira* berechneten Messwerte der Zellausschnitte lassen erkennen, dass die RV mit einem Mittelwert von $42,11 \pm 11,98$ % neben dem Zellkern einen nur leicht geringeren Anteil des Zellvolumens einnehmen als beim unstimulierten Knockout (Abb. 4.38 - Abb. 4.40, Abb. 4.41: A - Abb. 4.43: A). Da die Werte der einzelnen Zellausschnitte jedoch recht breit streuen und für die unstimulierte Knockout-Zelle nur ein Zellausschnitt vorliegt, kann kein eindeutiger Unterschied festgestellt werden. Im Vergleich ist der Mittelwert des mit Iso stimulierten Wildtyps um 5,6 % niedriger und variiert weniger. Die Zellausschnitte sind vor allem in Zelle 1, ähnlich dem unstimulierten Knockout, vergleichsweise dicht mit RV gefüllt, wobei sich die RV verhältnismäßig häufig berühren. In Zelle 2 scheinen die Speichervesikel etwas lockerer angeordnet zu sein. Im Vergleich zu allen bisher betrachteten Knockout- und Wildtyp-Zellen erscheint der mittlere Abstand der RV zueinander in den mit Iso stimulierten $Cx40^{-/-}$ -Zellen geringer als sonst.

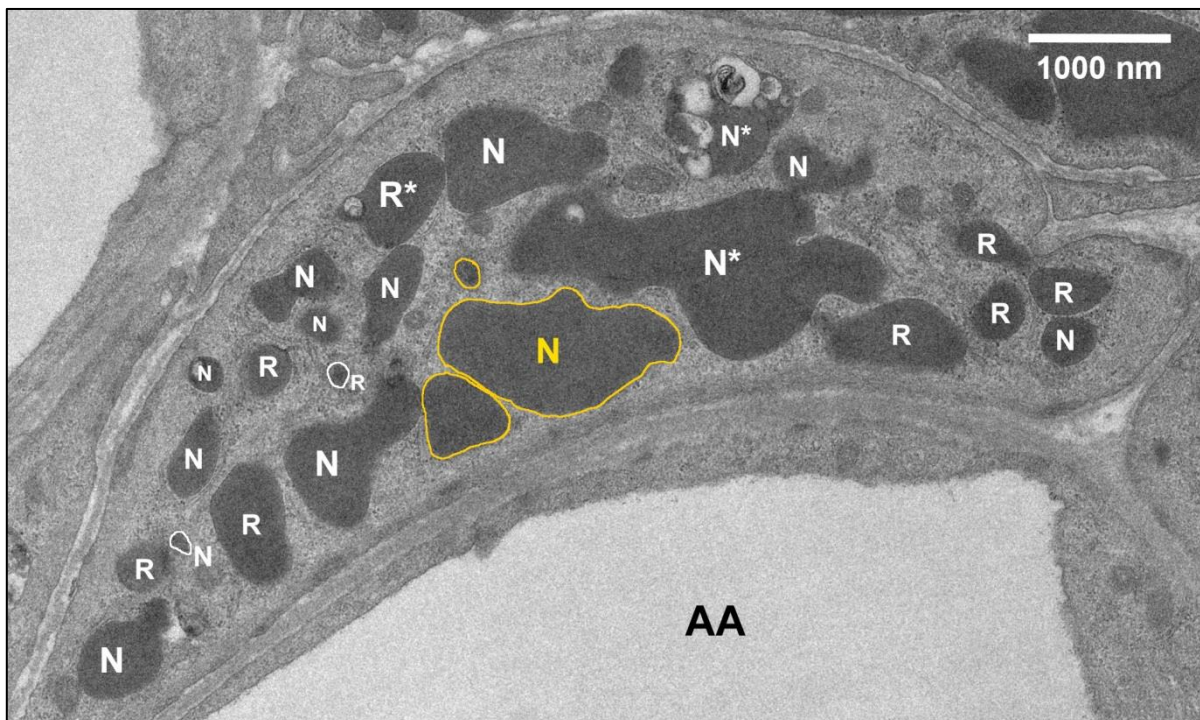


Abb. 4.39: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). Asteriske Reninspeichervesikel mit Vesikeleinschlüssen in der TEM-Aufnahme.

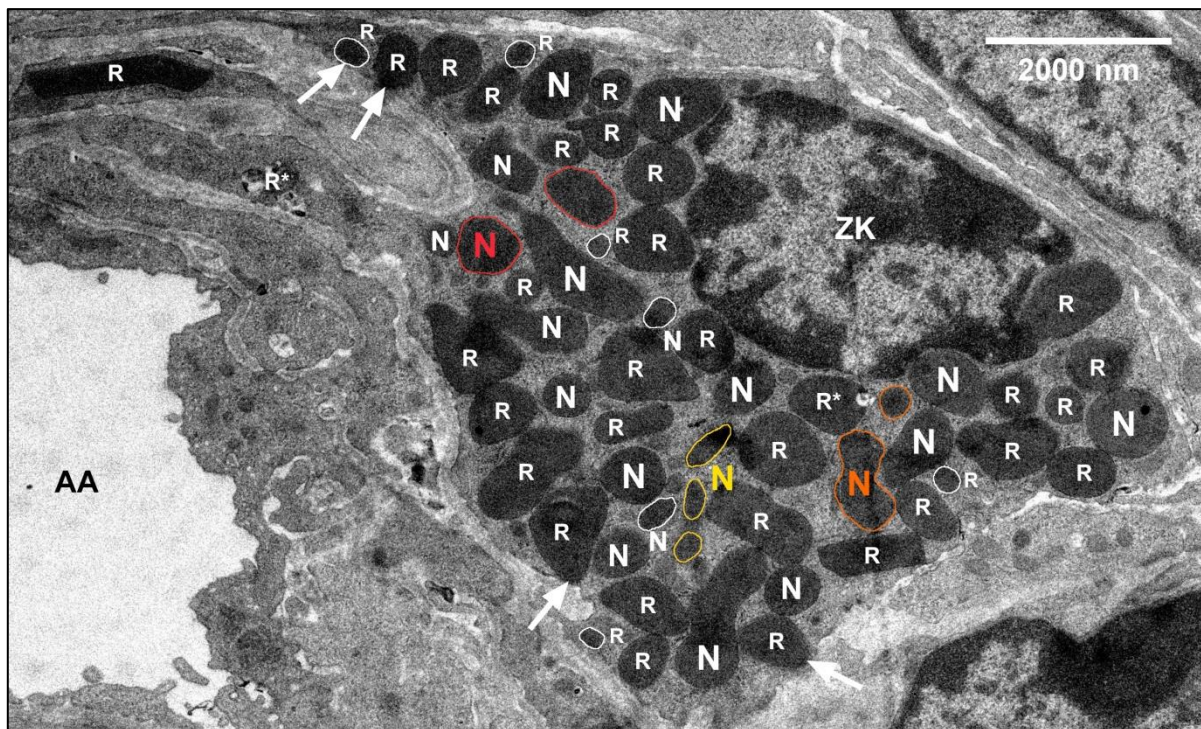


Abb. 4.40: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. Dieser Zellausschnitt zeigt Reninspeichervesikel mit Kontakt zur Zellmembran (*Pfeile*). Die Zelle liegt nahe am Lumen einer afferenten Arteriole (AA). *Asteriske* Reninspeichervesikel mit Vesikeleinschlüssen in der TEM-Aufnahme, ZK Zellkern.

Hinsichtlich der Anordnung der Speichervesikel fällt auf, dass die NV eine große Ansammlung im Zytosol bilden, während sich die eRV tendenziell in der Zelle verstreuen oder in kleinen Gruppen lokal gehäuft auftreten (Abb. 4.41: D-F, Abb. 4.42: C-E, Abb. 4.43: C-E). Der Zellmembran kommen sowohl die eRV als auch die NV immer wieder sehr nahe.

RV-Morphologie

Wie bereits im unstimulierten Knockout, ist die Elektronendichte der RV im Gegensatz zum mit Iso stimulierten Wildtyp sehr homogen. Die Morphologie der RV variiert jedoch sehr stark zwischen den einzelnen Zellrekonstruktionen. Die meisten eRV weisen eine eher in die Länge gezogene ovale oder leicht irreguläre Form auf (Abb. 4.38 - Abb. 4.40, Abb. 4.41: B-C, Abb. 4.42: B, Abb. 4.43: B). Jedoch sind, vor allem in Zelle 3, auch klassisch runde RV zu sehen.

Viele NV weisen eine stärker irreguläre Form als die eRV auf. Mit Ausnahme von Zelle 3 entsteht bei den beiden anderen Zellausschnitten nicht zwangsläufig der

Eindruck, als ob die NV durch die Fusion von einzelnen eRV entstehen. In Zelle 1 befinden sich mehrheitlich übergroße Netzwerke, die sehr stark verzweigt sind.

Generell unterscheidet sich die RV-Morphologie im Vergleich zum mit Iso stimulierten Wildtyp und dem unstimulierten Knockout, der fast ausschließlich runde RV aufweist. Jedoch variiert auch beim mit Iso stimulierten Wildtyp die Morphologie der RV sehr stark.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Der Messwert der durchschnittlichen Oberfläche der RV beträgt mit $7,05 \pm 4,41 \mu\text{m}^2$ das 1,6-fache und das durchschnittliche Volumen mit $0,76 \pm 0,53 \text{ fL}$ das 1,5-fache der durchschnittlichen Messwerte des einen rekonstruierten unstimulierten Knockout-JG-Zellausschnitts. Damit ist der Anstieg der Werte der Knockout-Zellen mit dem der Wildtyp-Zellen nach Stimulation mit Iso vergleichbar. Die durchschnittlichen Oberflächen- und Volumenwerte sind nur tendenziell geringer.

Die Mehrzahl der RV sind eRV, wohingegen die NV mit $67,62 \pm 27,59 \%$ den insgesamt größeren Volumenanteil der RV ausmachen, da sie mit $1,65 \pm 1,57 \text{ fL}$ ein 6,1-fach höheres durchschnittliches Vesikelvolumen als die eRV ($0,27 \pm 0,1 \text{ fL}$) aufweisen. Einzig im Zellausschnitt 3 nehmen die NV mit $36,27 \%$ einen deutlich geringeren Anteil der RV ein. Im Vergleich zum mit Iso stimulierten Wildtyp ist der Mittelwert der prozentuellen Verteilung von eRV und NV vergleichbar, die Werte des Knockout streuen jedoch stärker. Verglichen mit dem unstimulierten Knockout ist der prozentuale Anteil der NV sehr stark angestiegen, durchschnittlich um den Faktor 13,2. Die durchschnittlichen Volumina der NV des Knockout sind nur um 18 % geringer, die der eRV jedoch um 46 % geringer als die des mit Iso stimulierten Wildtyps. Verglichen mit dem unstimulierten Cx40^{-/-} sind im mit Iso stimulierten Knockout die NV tendenziell größer, die eRV durchschnittlich um 47 % geringer.

Low-Density-Vesikel

Renin-haltige LDV sind in den Zellausschnitten des Cx40^{-/-} nicht zu beobachten.

Allgemeine Zellmorphologie

Vesikeleinschlüsse kommen in den Zellausschnitten 2 und 3 nur vereinzelt vor. In Zelle 1 befindet sich in einem der NV jedoch eine sehr große Anhäufung von Vesikeleinschlüssen (vgl. Abb. 4.38 - Abb. 4.40, Abb. 4.41: G, Abb. 4.42: F, Abb. 4.43: F). Insgesamt sind ähnlich dem unstimulierten Knockout deutlich weniger RV von Einschlüssen betroffen als im mit Iso stimulierten Wildtyp.

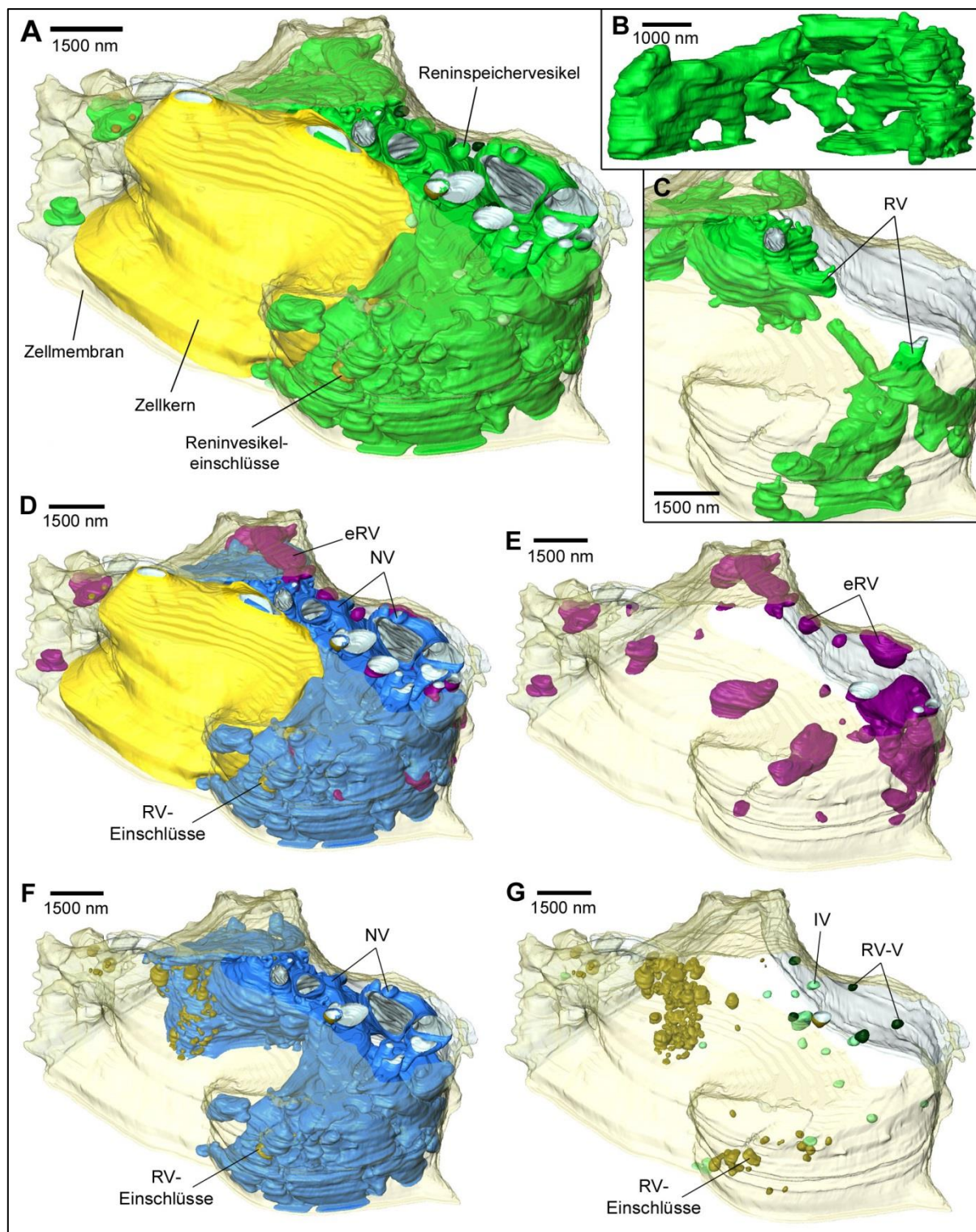


Abb. 4.41: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV) und RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*). **B-C:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **D:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **E-F:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **G:** Darstellung der Reninspeichervesikel-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V), RV-Einschlüsse und der inhomogen elektronendichten Vesikel (*hellgrün*, IV).

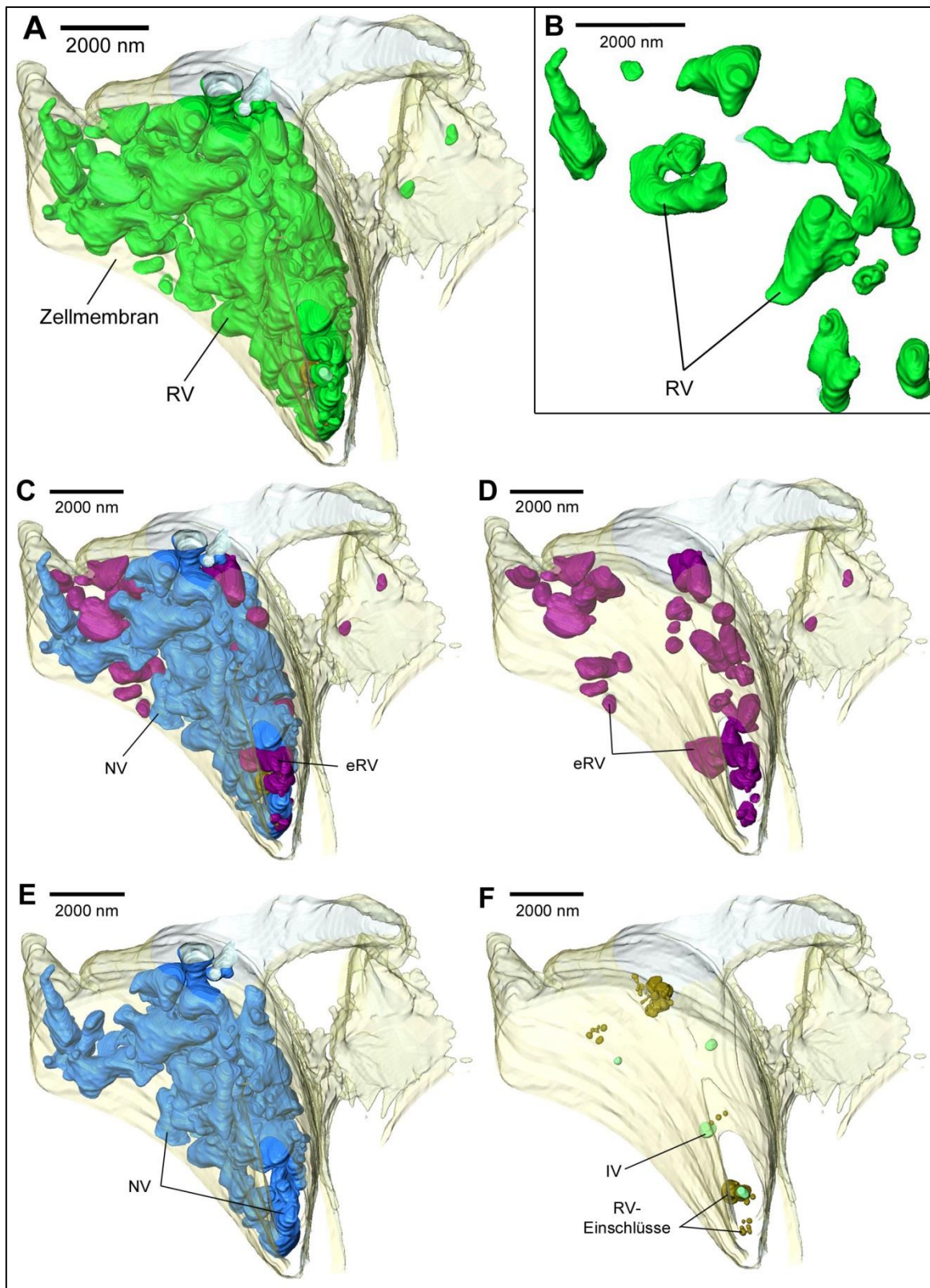


Abb. 4.42: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV) und RV-Einschlüssen (*dunkelgelb*). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der RV-Einschlüsse und der inhomogen elektronendichten Vesikel (*hellgrün*, IV).

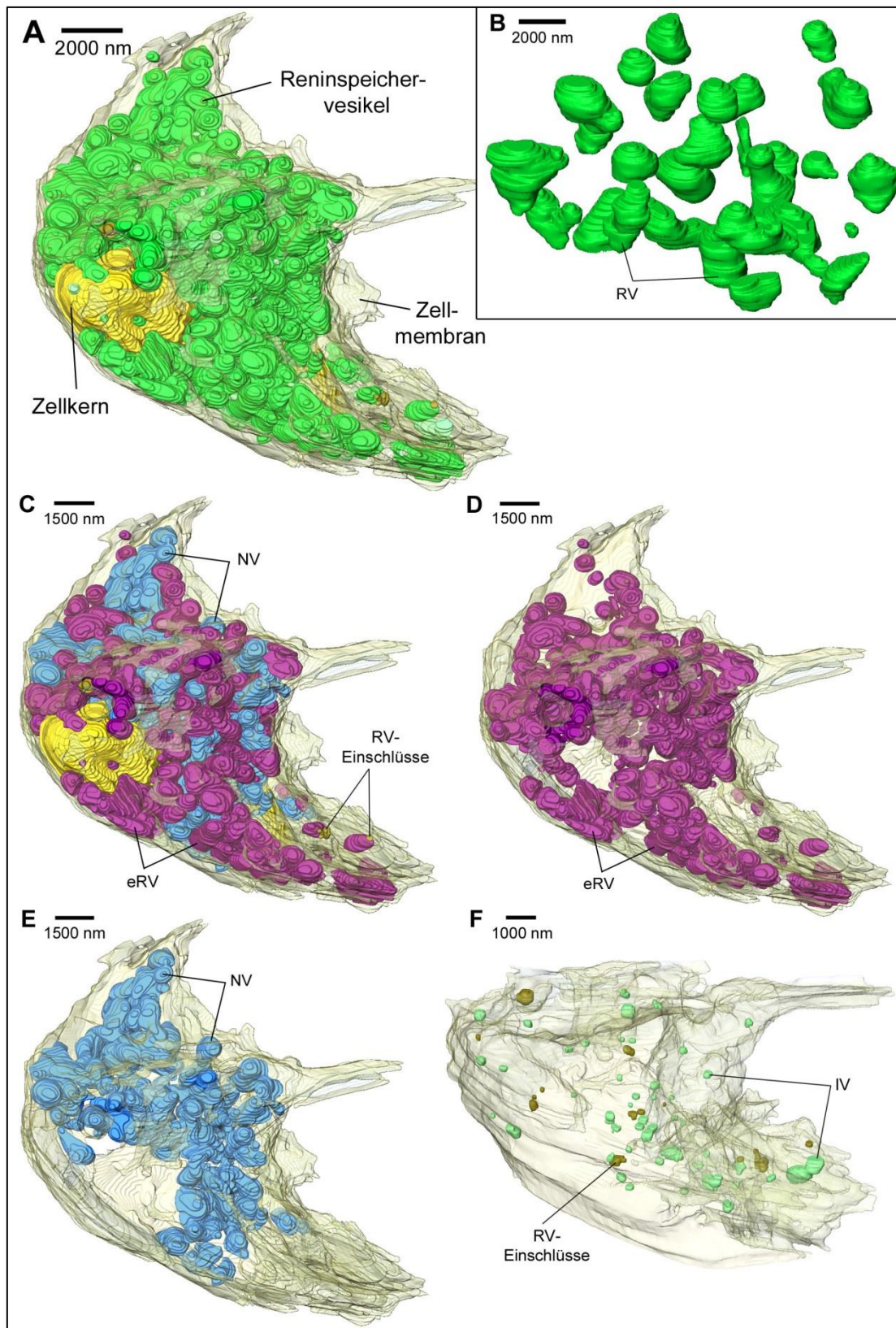


Abb. 4.43: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten JG-Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), und Reninspeichervesikeln (*grün*, RV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der RV-Einschlüsse (*dunkelgelb*) und der inhomogen elektronendichten Vesikel (*hellgrün*, IV).

Vereinzelt konnten RV-V und „klare“ oder inhomogene Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 4.41: G, Abb. 4.42: F, Abb. 4.43: F). Im Zellausschnitt 3 sind im Vergleich zu den anderen Zellausschnitten viele „klare“ Vesikel zu beobachten.

4.3.2.3 16-minütige Stimulation mit EGTA

Als Letztes wird die Morphologie der JG-Zellausschnitte einer Cx40^{-/-}-Maus betrachtet, die mit 3,1 mM EGTA stimuliert wurde. Es wurden ebenfalls drei 3D-Rekonstruktionen erstellt.

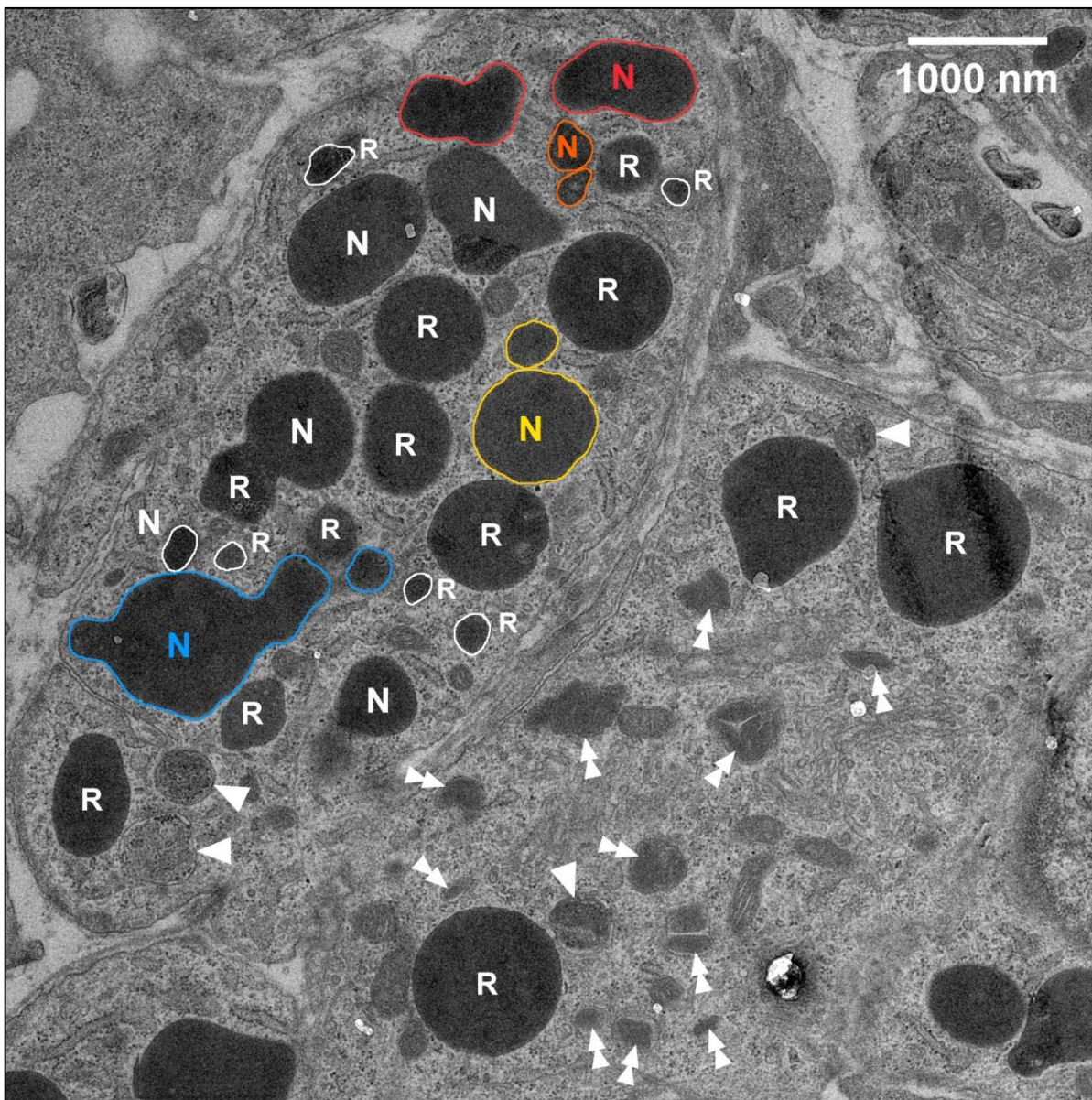


Abb. 4.44: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder leicht irregulär geformte elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. *Doppelpfeile* Reninspeichervesikel-Vorstufen, *Pfeilspitzen* inhomogen elektronendichte, granulierten Vesikel.

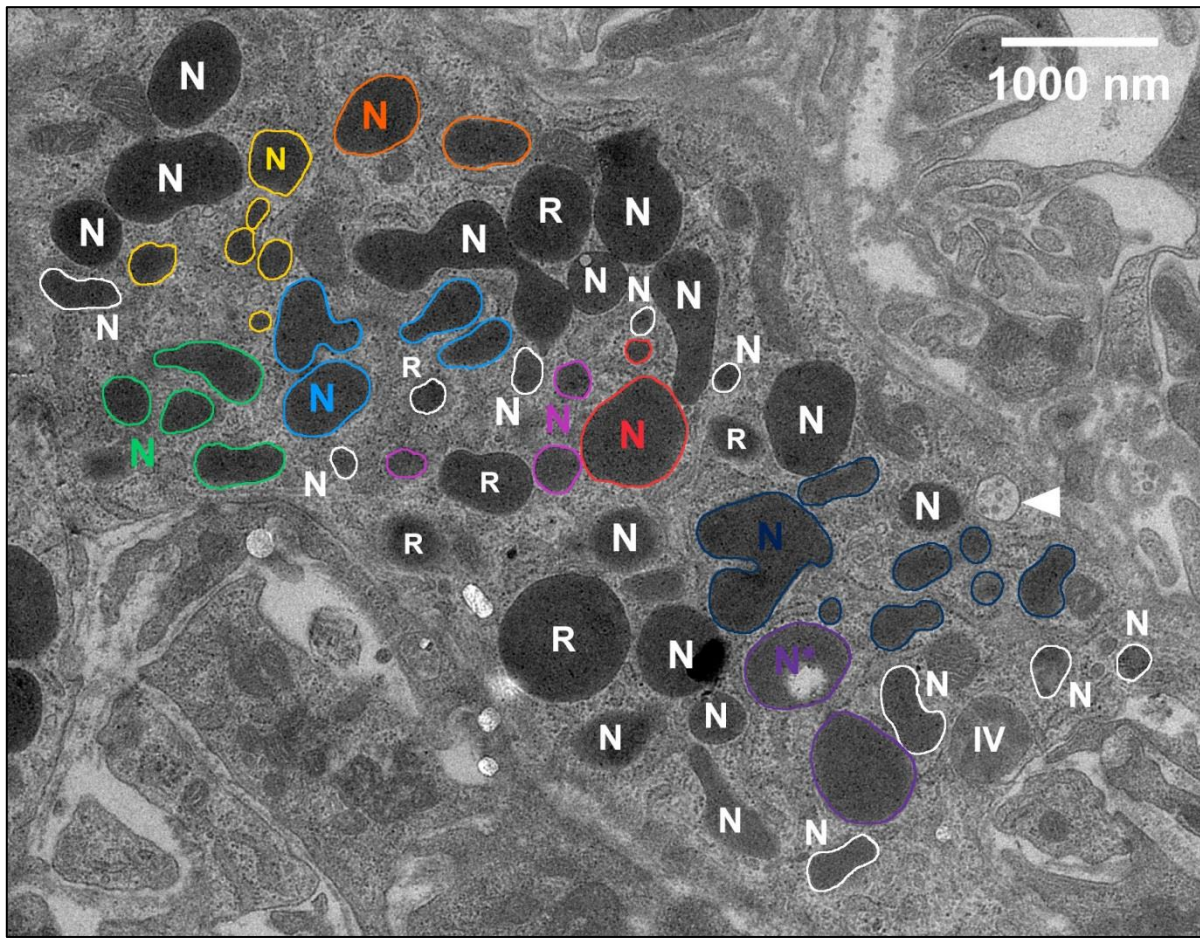


Abb. 4.45: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder leicht irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. IV inhomogen elektronendichte, granuliert Vesikel, Pfeilspitzen „klare“ elektronenarme Vesikel.

Verteilung der RV in der JG-Zelle

Sowohl in den TEM-Aufnahmen als auch in den 3D-Rekonstruktionen der Zellausschnitte erkennt man, dass die RV neben dem Zellkern einen großen Teil des Zellvolumens einnehmen (Abb. 4.44 - Abb. 4.47, Abb. 4.49: A - Abb. 4.51: A). Im Gegensatz zu den mit Iso stimulierten Knockout-Zellen nehmen die RV jedoch mit $24,38 \pm 4,09$ % ein um 42 % geringeres Volumen der rekonstruierten Zellausschnitte ein (Tab. 2, Abb. 4.48: A). Die Volumenverhältnisse der mit EGTA stimulierten Wildtyp- und Knockout-Zellen unterscheiden sich hingegen kaum.

Im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp sind die RV lockerer im Zytosol angeordnet und die Abstände zwischen den RV sind im Durchschnitt deutlich größer. Folglich sind Berührungen zwischen den Speichervesikeln seltener zu beobachten.

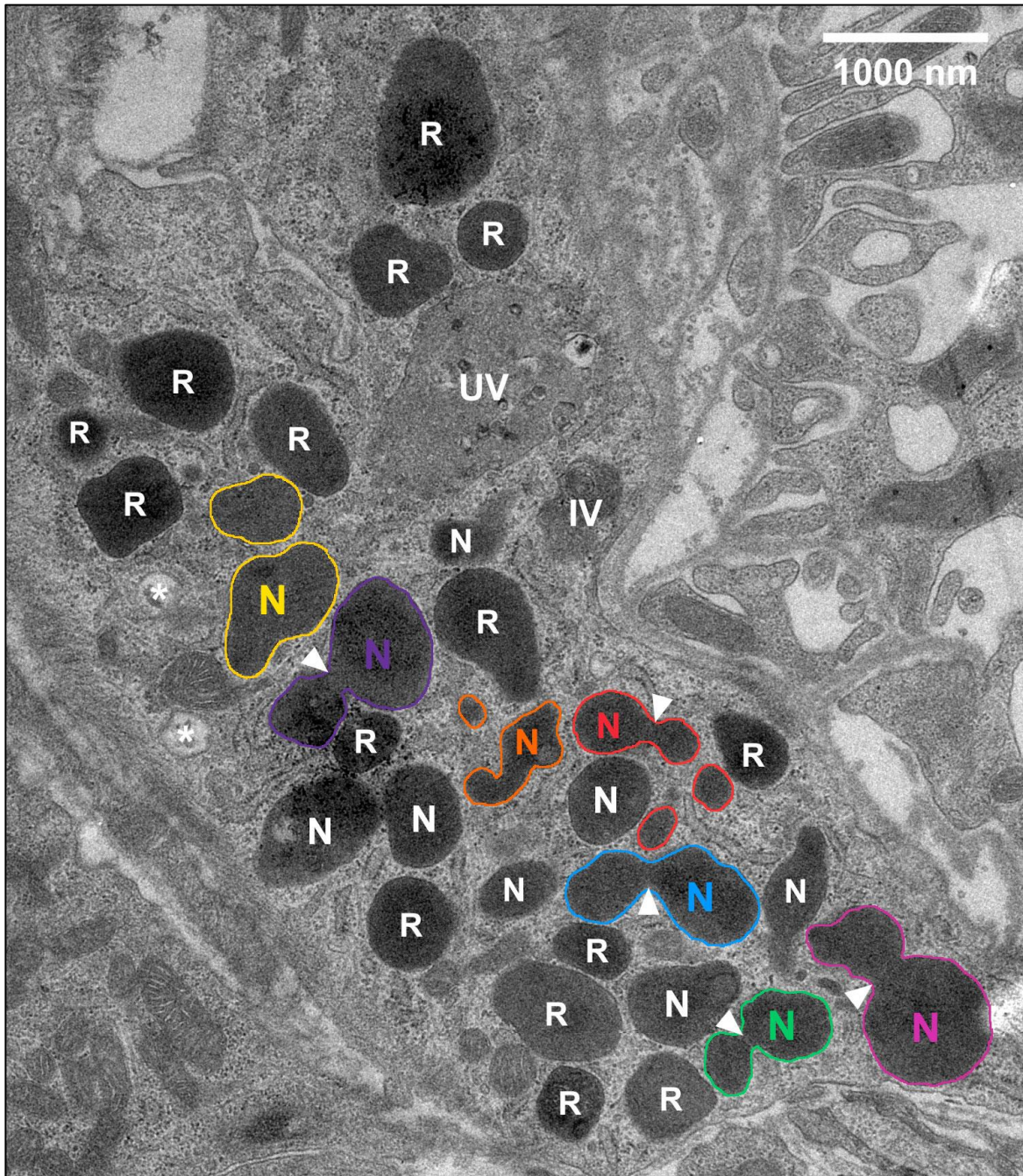


Abb. 4.46: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder leicht irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. Diese TEM-Aufnahme weist Netzwerke auf, die aus fusionierenden Reninspeichervesikeln zu entstehen scheinen (*Pfeilspitzen*). Ebenfalls zu erkennen sind ein großes inhomogenes Vesikel (UV), ein inhomogen granuliertes Vesikel (IV) und „klare“ elektronenarme Vesikel (*Asteriske*).

Hinsichtlich der Anordnung wirken die Speichervesikel ein wenig gleichmäßiger im Zytosol verteilt als im mit Iso stimulierten Knockout, wobei die NV jedoch immer noch relativ große Ansammlungen mittig in den Zellausschnitten bilden und sich die eRV tendenziell näher an der Zellmembran befinden (Abb. 4.49: C-E - Abb. 4.51: C-E).

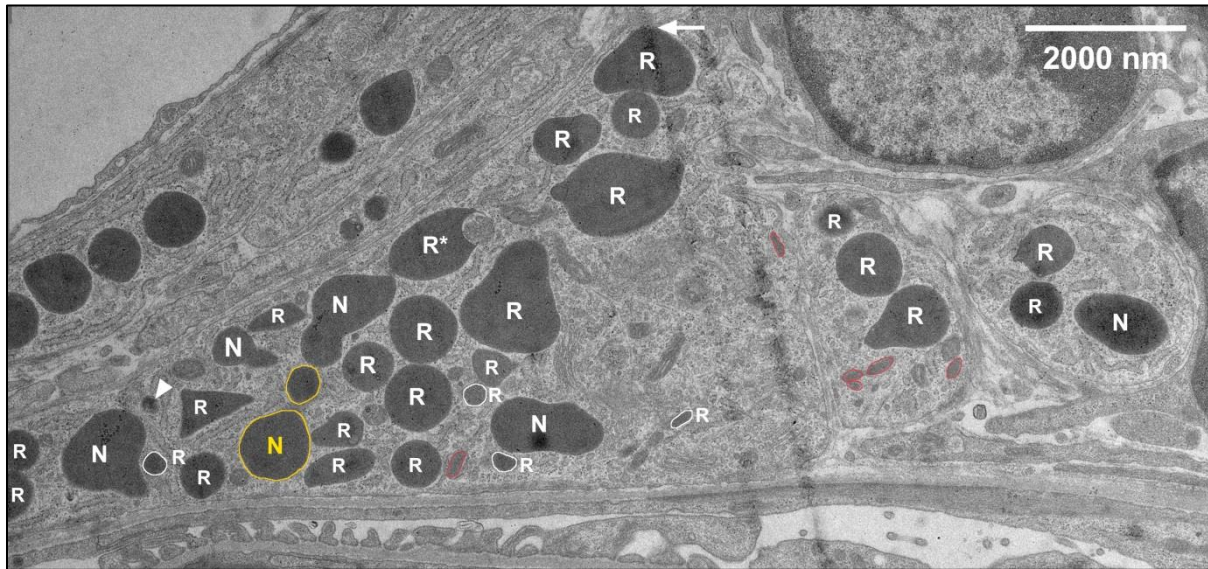


Abb. 4.47: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Die JG-Zelle enthält eher ovale oder irregulär geformte, elektronendichte Reninspeichervesikel (R) und komplex geformte Reninspeichervesikel-Netzwerke (N). Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert und Reninspeichervesikel, deren Beschriftung sich aufgrund ihrer geringen Größe neben dem Vesikel befindet, sind weiß umrandet. Dieser Zellausschnitt zeigt ein Reninspeichervesikel mit Zellmembran-Kontakt (*Pfeil*). *Asteriske* Reninspeichervesikel mit Vesikeleinschlüssen in der TEM-Aufnahme, *hellrot umrandet* Reninspeichervesikel-Vorstufen, *Pfeilspitze* inhomogen elektronendichtes Vesikel.

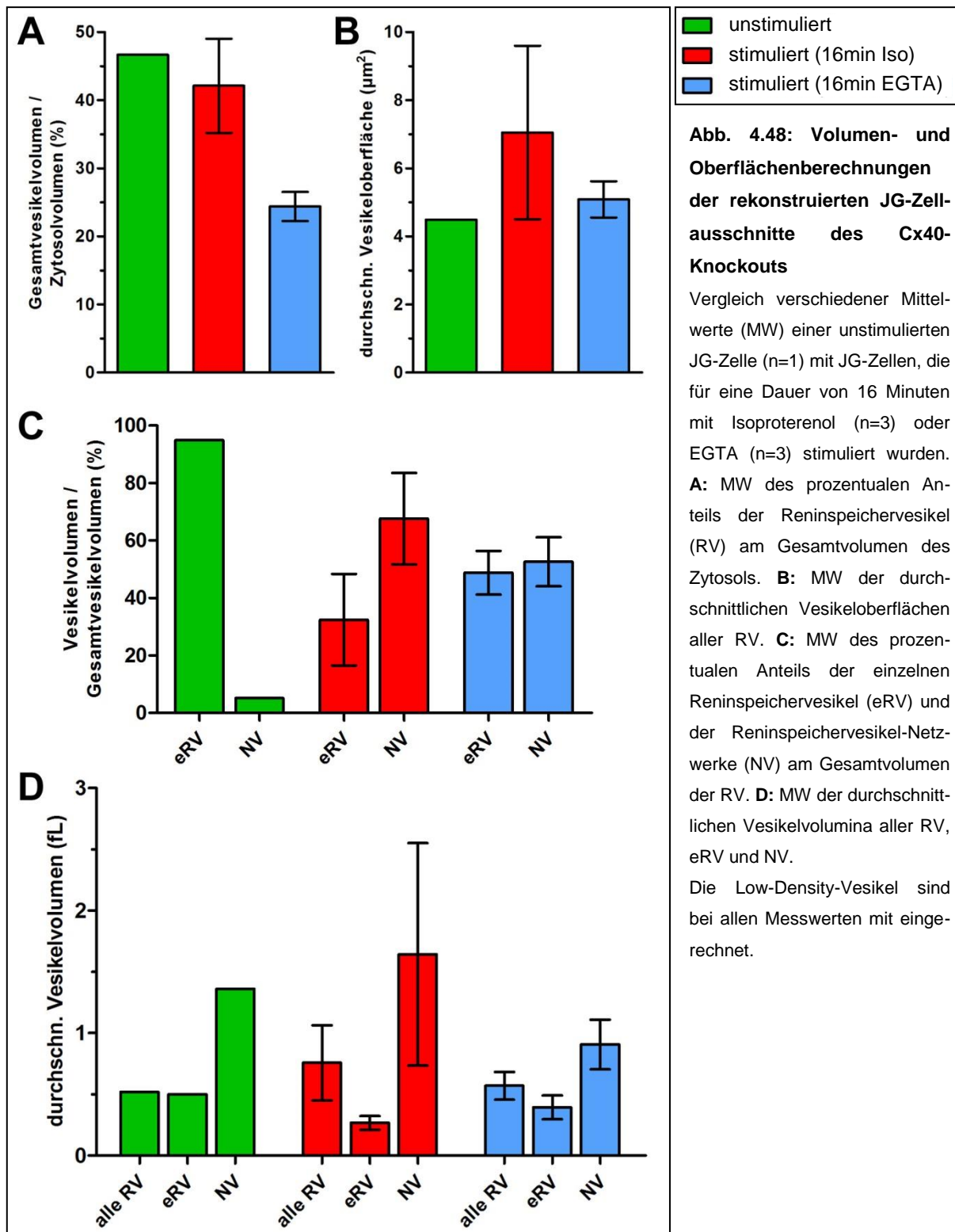
RV-Morphologie

Hinsichtlich der Morphologie fällt in allen Zellen auf, dass die eRV mehrheitlich irregulär wirken, jedoch oft noch eine klassische Kugelform besitzen (Abb. 4.44 - Abb. 4.47, Abb. 4.49: B - Abb. 4.51: B). Dies gilt auch für die NV. Es entsteht der Eindruck, als ob die NV durch die Fusion von einzelnen eRV entstehen. Nur im Zellausschnitt 2 erscheinen die RV kleiner, irregulärer und die NV stärker verzweigt.

Tab. 2: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Cx40^{-/-}

	Unstimuliert n = 1	Isoproterenol n = 3	EGTA n = 3
Gesamtvesikelvolumen/ Zytosolvolumen (%)	46,66	42,11 ± 11,98	24,38 ± 4,09
Durchschnittliche Vesikeloberfläche (µm ²)	4,49	7,05 ± 4,41	5,08 ± 0,92
Durchschnittliches Vesikelvolumen (fL)	0,52	0,76 ± 0,53	0,57 ± 0,19
NV-Volumen/ Gesamtvesikelvolumen (%)	5,11	67,62 ± 27,59	52,59 ± 14,80
Durchschnittliches eRV-Volumen (fL)	0,50	0,27 ± 0,10	0,41 ± 0,16
Durchschnittliches NV-Volumen (fL)	1,36	1,65 ± 1,57	0,91 ± 0,35

Vergleich verschiedener Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung einer unstimulierten JG-Zelle (n=1) mit JG-Zellen, die für eine Dauer von 16 Minuten mit Isoproterenol (n=3) oder EGTA (n=3) stimuliert wurden. Von oben nach unten: MW des prozentualen Anteils der Reninspeichervesikel (RV) am Gesamtvolumen des Zytosols; MW der durchschnittlichen Vesikeloberflächen und -volumina aller RV; MW des prozentualen Anteils der Reninspeichervesikel-Netzwerke (NV) am Gesamtvolumen der RV; MW der durchschnittlichen Vesikelvolumina der einzelnen Reninspeichervesikel (eRV) und NV. Die Low-Density-Vesikel sind bei allen Messwerten mit eingerechnet.



Insgesamt sind die RV jedoch deutlich weniger irregulär geformt als in den mit EGTA stimulierten Wildtyp-JG-Zellen. Die Speichervesikel sind auch im Vergleich zu den mit Iso stimulierten Knockout-Zellen deutlich regulärer.

Generell weisen die RV in den TEM-Aufnahmen wie auch bei den anderen Knockout-Zellen eine homogene Elektronendichte auf. Die Elektronendichte der RV

unterscheidet sich sehr stark von der der RV im mit EGTA stimulierten Wildtyp, die durch ihre starke Inhomogenität, vor allem der NV, auffallen.

Oberflächen- und Volumenberechnungen

Der Messwert der durchschnittlichen Oberfläche der RV beträgt mit $5,08 \pm 0,92 \mu\text{m}^2$ um 28 % geringer und das durchschnittliche Volumen mit $0,57 \pm 0,19 \text{ fL}$ um 25 % weniger als die durchschnittlichen Messwerte der mit Iso stimulierten Knockout-JG-Zellen (Tab. 2, Abb. 4.48: B, D). Im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp hingegen ist die durchschnittliche Oberfläche um den Faktor 1,2 größer und auch das durchschnittliche Volumen um den Faktor 1,4 größer.

Die Mehrzahl der RV sind eRV, wobei die NV mit $52,59 \pm 14,80 \%$ insgesamt einen 22 % geringeren Volumenanteil der RV ausmachen als in den mit Iso stimulierten Knockout-Zellen (Tab. 2, Abb. 4.48: C). Im Zellausschnitt 3 nehmen die NV mit 36,28 % einen deutlich geringeren Anteil der RV ein, weshalb die Werte stärker um den Mittelwert variieren. Der prozentuelle Anteil der NV ist insgesamt im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp deutlich geringer. Im Vergleich zum unstimulierten Cx40^{-/-} ist der Vernetzungsgrad jedoch mit dem Faktor 10,3 sehr viel stärker angestiegen als beim Wildtyp. Hier zeigen sich unterschiedliche Tendenzen, da der Anteil der NV bei den mit EGTA stimulierten Wildtyp-Zellen höher ist als bei den mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen und beim Knockout ist der Anteil der NV bei Stimulation mit EGTA geringer als bei Stimulation mit Iso.

Das Volumen der eRV ist mit $0,41 \pm 0,16 \text{ fL}$ im Vergleich zu der mit Iso stimulierten Cx40^{-/-}-Maus um den Faktor 1,5 größer und das Volumen der NV mit $0,91 \pm 0,35 \text{ fL}$ um 45 % geringer (Tab. 2, Abb. 4.48: D). Im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp ist der durchschnittlichen Wert für das Vesikelvolumen der eRV um den Faktor 3,5 größer. Der Mittelwert für die NV ist beim Knockout jedoch um 17 % niedriger.

Low-Density-Vesikel

In den Zellausschnitten des mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} wurde lediglich ein LDV in Zelle 1 festgestellt. Das Volumen beträgt 2,76 fL und die Oberfläche $10,92 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich zu den mit EGTA stimulierten Wildtyp-JG-Zellen sind jedoch keine großen inhomogenen LDV vorzufinden (Abb. 4.49: F). Im Zellausschnitt 2 befindet sich zusätzlich ein 2,98 fL großes, inhomogenes Vesikel mit geringer Elektronendichte, das Einschluss- bzw. Membran-artige Strukturen aufweist (Abb. 4.46).

Allgemeine Zellmorphologie

Im Gegensatz zum mit EGTA stimulierten Wildtyp, der vom Gesamtvolumen betrachtet die größte Menge an RV-Einschlüssen aufweist, sind Vesikeleinschlüsse im mit EGTA stimulierten Wildtyp so selten und vereinzelt, dass auf deren Rekonstruktion verzichtet wurde.

Im Gegensatz zu den restlichen betrachteten Knockout-Zellen sind in der mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-}-Maus, vor allem im Zellausschnitt 1, zahlreiche RV-V und „klare“ und inhomogene Vesikel vorhanden (Abb. 4.44 - Abb. 4.47, Abb. 4.49: F - Abb. 4.51: F). Vor allem die IV sind insgesamt größer als in den unstimulierten und mit Iso stimulierten Cx40^{-/-}-Zellausschnitten.

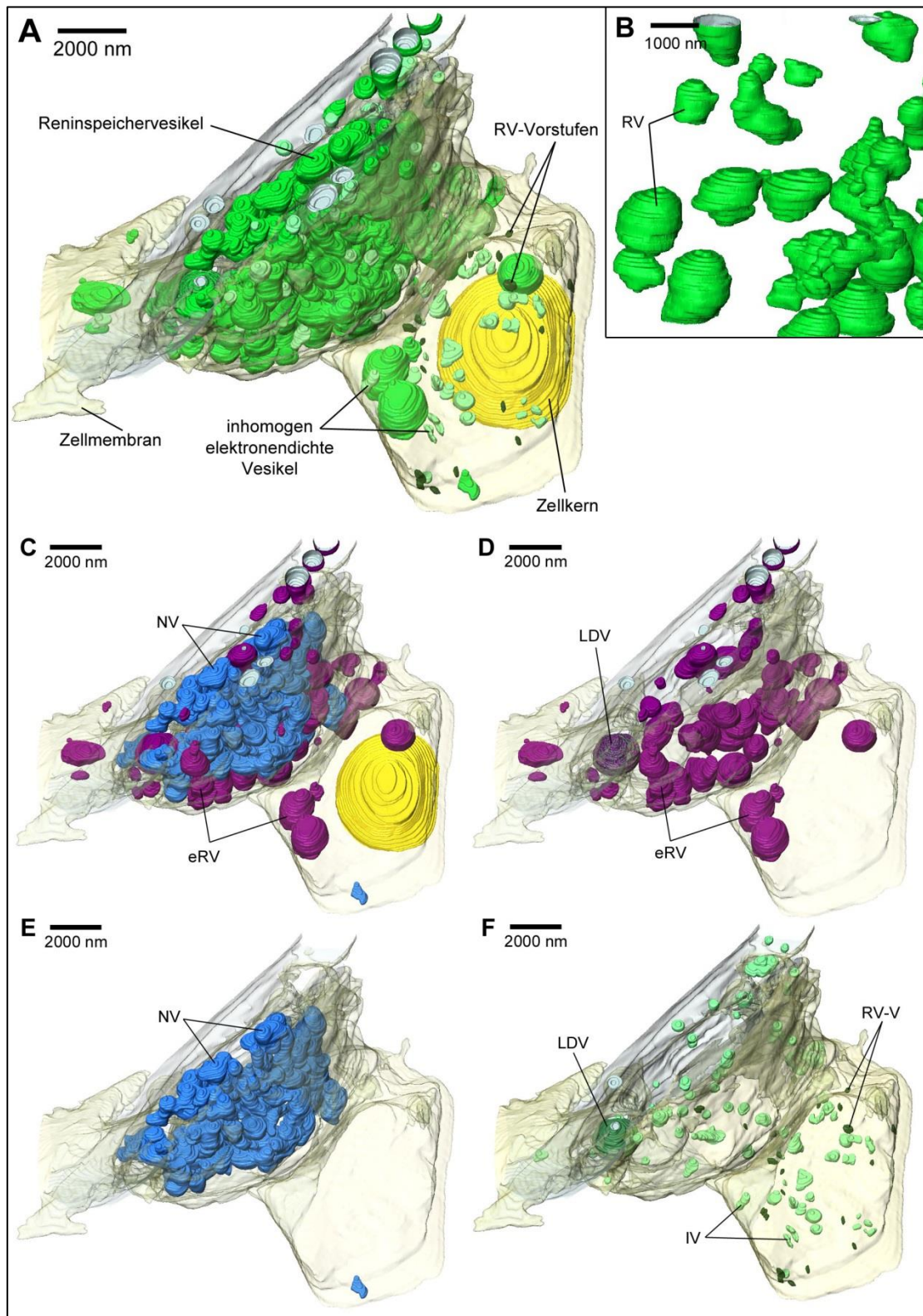


Abb. 4.49: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), RV-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung des Low-Density-Vesikels (*dunkelgrün*, LDV), der RV-V und der IV.

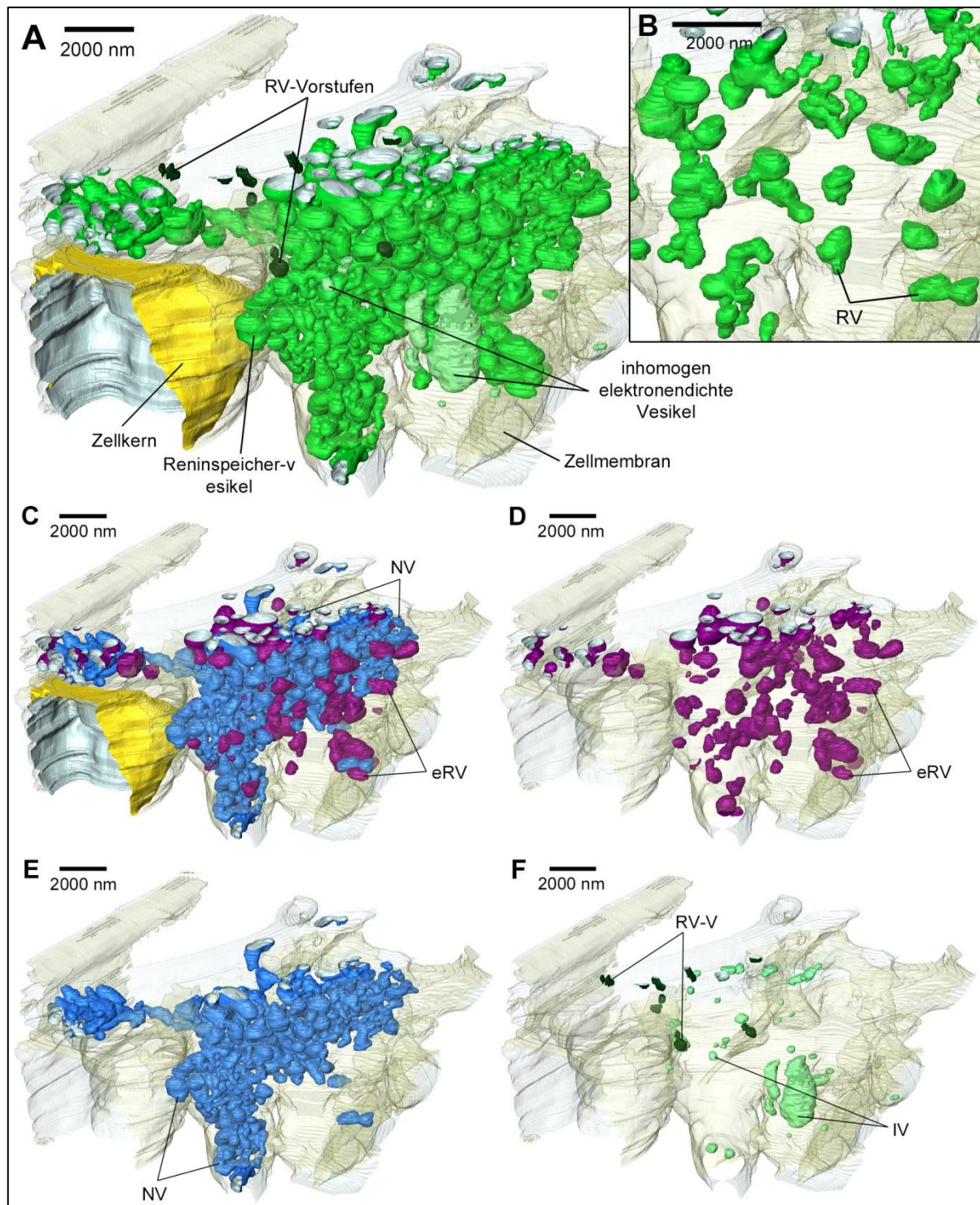


Abb. 4.50: 3DRekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeicher-vesikeln (*grün*, RV), RV-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeicher-vesikel (*violett*, eRV) und Reninspeicher-vesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der RV-V und IV.

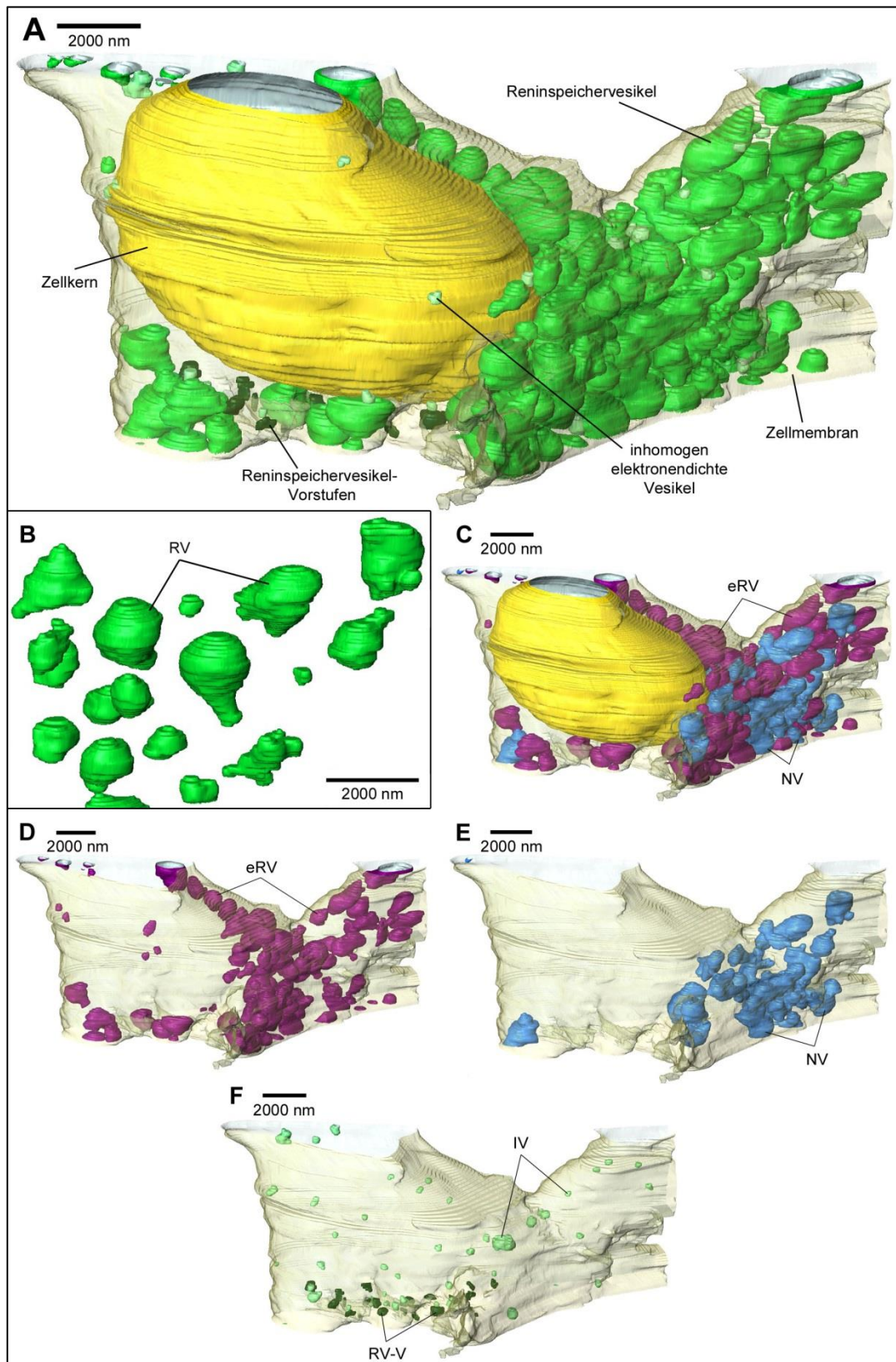


Abb. 4.51: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A: Gesamtübersicht des rekonstruierten Zellausschnitts mit Zellmembran (*transparent*), Zellkern (*gelb*), Reninspeichervesikeln (*grün*, RV), RV-Vorstufen (*schwarzgrün*, RV-V) und inhomogen elektronendichten Vesikeln (*hellgrün*, IV). **B:** Vergrößerung von RV zur Darstellung der Vesikelmorphologie. **C:** Darstellung der RV mit Unterteilung in einzelne Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV). **D-E:** Darstellung der eRV bzw. NV und deren räumliche Verteilung im Zellausschnitt. **F:** Darstellung der RV-V und IV.

4.4 Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran in JG-Zellen

In diesem Abschnitt werden die TEM-Aufnahmen der JG-Zellen, die in dieser Arbeit bereits im Hinblick auf die Morphologie der RV betrachtet wurden, genauer auf Kontakte zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran untersucht.

Als Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran (ZM-Kontakte) werden jene Ereignisse auf TEM-Aufnahmen gewertet, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Berührung von Vesikel- und Zellmembran vorliegt. Manche Kontakte von Vesikel- und Zellmembran weisen auf Höhe des Kontaktes im Extrazellulärraum eine höhere Elektronendichte auf, die für den Austritt von Vesikelmateriale sprechen könnte (vgl. Abb. 4.54: A-B).

Da in JG-Zellen die typischen Anzeichen von Exozytosen, wie eindeutige Omega-Strukturen, die Vesikelmateriale enthalten, in bisherigen Studien nur sehr selten beobachtet wurden [56, 193, 233], werden Kontakte zwischen Zell- und Vesikelmembran tendenziell als Exozytose-Ereignisse bzw. bevorstehende Exozytose-Ereignisse gewertet. In dieser Arbeit sind Exozytose-Ereignisse in Form von Omega-Strukturen oder dem Austritt von Vesikelmateriale in den TEM-Aufnahmen nicht definitiv festgestellt worden.

Tab. 3: Übersicht - Beobachtete Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran in JG-Zellen

Modell	Stimulation	n	Zellmembran-Kontakte		eRV			NV		
			MW \pm SD	insgesamt	+	++	+++	+	++	+++
WT	Unstimuliert	3	2,3 \pm 3,2	7			4			3
Cx40 ^{-/-}	Unstimuliert	1	1,0 \pm 0,0	1		1				
WT	Isoproterenol	3	2,7 \pm 3,8	8		1	1	1	2	3
Cx40 ^{-/-}	Isoproterenol	3	18,3 \pm 16,6	55	1	32	2	4	2	14
WT	EGTA	3	3,0 \pm 2,6	9	4	1			4	
Cx40 ^{-/-}	EGTA	3	3,3 \pm 1,2	10	1	4	1	1	2	1

Angegeben sind alle Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran und mögliche Exozytose-Ereignisse, die in den TEM-Aufnahmen der betrachteten Zellausschnitte (n = Anzahl) des Wildtyps (WT) und des Connexin40-Knockouts (Cx40^{-/-}) festgestellt wurden. Neben der Gesamtanzahl der Kontakte (*insgesamt*) und dem Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (\pm SD) wird bei den vom Kontakt betroffenen Reninspeichervesikeln zwischen einzelnen klassischen Reninspeichervesikeln (eRV, violett) und RV-Netzwerken (NV, blau) differenziert. Die relative Größe der betroffenen eRV und NV sind ebenfalls angegeben: klein (+), mittelgroß (++) oder groß (+++).

4.4.1 Untersuchung von unstimulierten JG-Zellen

Zellmorphologie

Sowohl in den TEM-Aufnahmen der drei unstimulierten Wildtyp-JG-Zellausschnitte als auch im unstimulierten Cx40^{-/-}-JG-Zellausschnitt kommen die RV der Zellmembran immer wieder nahe. Hinsichtlich des Abstands der RV zur Zellmembran kann

zwischen Wildtyp und Knockout kein Unterschied festgestellt werden.

Während sich die NV im unstimulierten Wildtyp eher in der Zellmitte ansammeln, sind

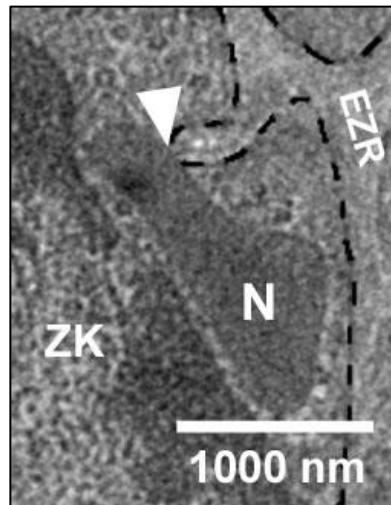


Abb. 4.52: TEM-Aufnahme mit Kontakt zwischen Vesikelmembran und Zellmembran im Zellausschnitt 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

Der Zellmembran-Kontakt (*Pfeilspitze*) des Reninspeichervesikel-Netzwerks (N) befindet sich in einer Einstülpung der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). EZR Extrazellulärraum, ZK Zellkern.

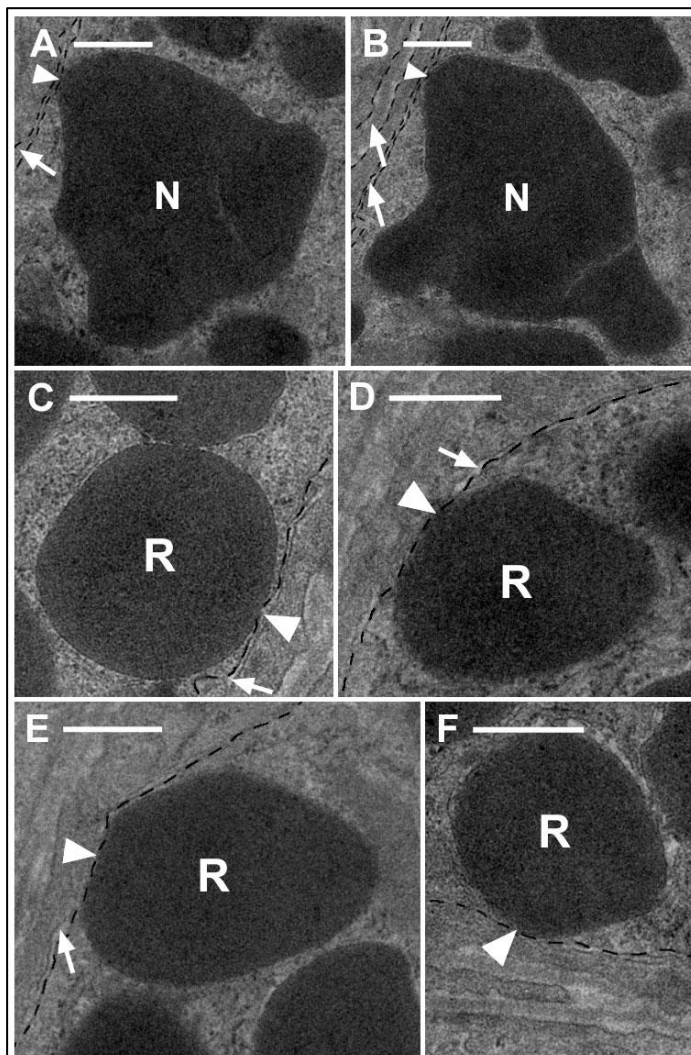


Abb. 4.53: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Vesikelmembran und Zellmembran des Zellausschnitts 2 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)

A-B: Kontakte (*Pfeilspitze*) von Reninspeichervesikel-Netzwerken (N) mit der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). **C-F:** Kontakte (*Pfeilspitze*) von einzelnen, klassischen Reninspeichervesikeln (R) mit der Zellmembran. *Pfeile* Extrazellulärraum. *Maßstabsbalken* 500 nm.

die eRV meist näher an der Zellmembran lokalisiert (vgl. Abb. 4.16: C-E). Da im Zellausschnitt des unstimulierten Knockouts fast ausschließlich eRV vorkommen, kann hier keine spezielle Verteilung der eRV und NV im Zytosol festgestellt werden (vgl. Abb. 4.35: C-D).

Anzahl und Beschreibung der Zellmembran-Kontakte

Beim unstimulierten Wildtyp konnten in zwei von drei Zellausschnitten Kontakte zwischen der Zellmembran und den Reninspeichervesikeln festgestellt werden, wobei in Zelle 1 ein großes NV betroffen war und in Zelle 2 ein großes NV zwei ZM-Kontakte aufzeigt und bei drei großen eRV ebenfalls ein eRV zwei Kontakte aufweist (Abb. 4.52, Abb. 4.53, Tab. 3). Beim unstimulierten Cx40-Knockout ist bei einem mittelgroßen eRV ein ZM-Kontakt zu sehen.

Im Zellausschnitt 1 des unstimulierten Wildtyps befindet sich der ZM-Kontakt in einer Einstülpung der Zellmembran (vgl. Abb. 4.52).

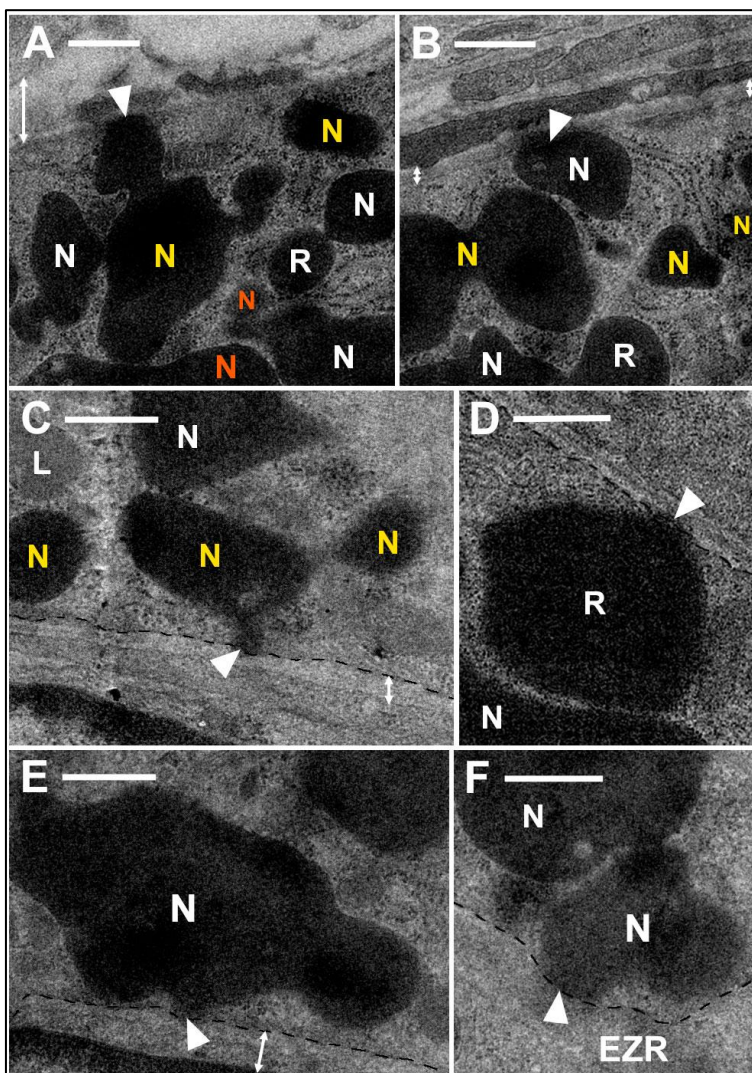


Abb. 4.54: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)

Zusammenhängende Reninspeichervesikel-Netzwerke (N) sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. **A-B:** Kontakte (Pfeile) von Netzwerken mit der Zellmembran, die als Exozytose-Ereignisse gewertet werden können aufgrund der Anreicherung elektronendichten Materials im Extrazellulärraum auf Höhe des Zellmembran-Kontakts. Zellausschnitt 3. **C-F:** Kontakte (Pfeilspitzen) von Netzwerken (**C, E, F**) und einem einzelnen, klassischen Reninspeichervesikel (**R, D**) mit der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). **C,E:** Die Netzwerke scheinen weniger elektronendichtes Vesikelmaterial in der Nähe des Zellmembran-Kontakts aufzuweisen. Zellausschnitt 3. **D, F:** Zellausschnitt 1. *Doppelpfeile* deuten auf Zellmembranen, die den Extrazellulärraum (EZR) umrahmen. *Maßstab* 500 nm.

4.4.2 Untersuchung von stimulierten JG-Zellen

4.4.2.1 16-minütige Stimulation mit Isoproterenol

Zellmorphologie

Ähnlich den unstimulierten JG-Zellen kommen die RV der mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen der Zellmembran immer wieder nahe. Während im Zellausschnitt 2 der mit Iso stimulierten Knockout-Zellen die Abstände der RV zur Zellmembran denen der mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen ähneln, sind die Speichervesikel in den Zellausschnitten 1 und 3 des Knockouts der Zellmembran deutlich näher als in allen anderen betrachteten JG-Zellausschnitten.

Hinsichtlich der Anordnung der Speichervesikel fällt auf, dass sich sowohl im Wildtyp als auch im Cx40^{-/-} nach Stimulation mit Iso die NV tendenziell gemeinsam mittig im Zytosol befinden, während die eRV meist in der Zelle verstreut zwischen den NV oder in kleinen Gruppen lokal gehäuft anzutreffen sind (vgl. Abb. 4.23: C-E - Abb. 4.25:C-E, Abb. 4.41: D-F, Abb. 4.42: C-E, Abb. 4.43: C-E). Dennoch kommen der Zellmembran sowohl die eRV als auch die NV immer wieder nahe.

Anzahl und Beschreibung der Zellmembran-Kontakte des Wildtyps

Beim mit Iso stimulierten Wildtyp können in zwei von drei Zellausschnitten Kontakte zwischen der Zellmembran und den RV beobachtet werden (Abb. 4.54, Abb. 4.58: A-B, Tab. 3). Während im Ausschnitt 1 lediglich ein großes eRV betroffen ist, werden im Zellausschnitt 3 sieben ZM-Kontakte festgestellt, wovon bei zwei Kontakten eine Verdichtung von Material im EZR erkennbar ist, die auf ein Exozytose-Ereignis

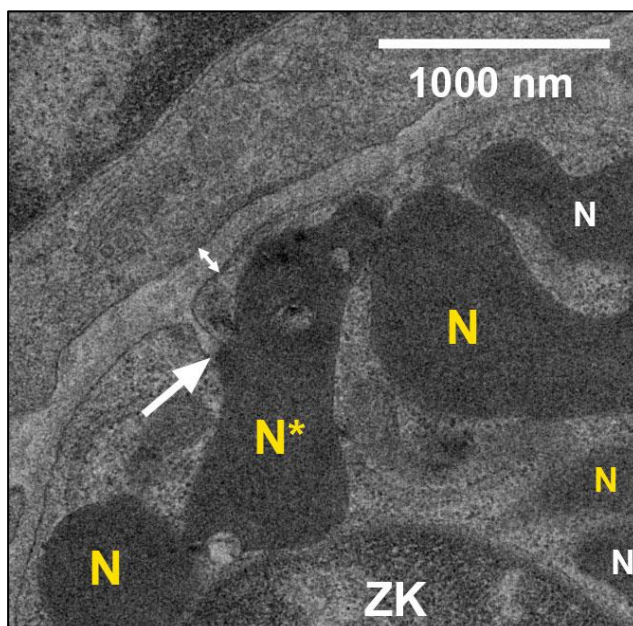


Abb. 4.55: TEM-Aufnahme mit möglichem Exozytose-Ereignis im Zellausschnitt 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Kontakt (*Pfeil*) eines Reninspeichervesikel-Netzwerks (N) mit der Zellmembran, der aufgrund der Anreicherung elektronendichten Materials auf Höhe des Zellmembran-Kontakts im Extrazellulärraum als Exozytose-Ereignisse gewertet werden kann. Das Ereignis findet in einer Einstülpung der Zellmembran statt. *Asterisk* Reninspeichervesikel mit Vesikeleinschlüssen in der TEM-Aufnahme, *Doppel Pfeile* Zellmembranen, die den Extrazellulärraum umrahmen, ZK Zellkern.

hinweisen könnte. Lediglich einer der ZM-Kontakte betrifft ein eRV, während die möglichen Exozytose-Ereignisse und die restlichen Kontakte mehrheitlich von mittelgroß bis großen NV ausgehen. Von diesen sechs NV befinden sich fünf NV über mehrere TEM-Schnitte hinweg sehr dicht an der Zellmembran. Bei manchen der von ZM-Kontakten betroffenen RV scheint das Vesikelmateriale in der Nähe des Kontaktes weniger elektronendicht (vgl. Abb. 4.54: C, E).

Anzahl und Beschreibung der Zellmembran-Kontakte des Cx40^{-/-}-Knockout

Beim mit Iso stimulierten Knockout weisen alle drei Zellausschnitte Kontakte zwischen der Zellmembran und den RV auf, wobei im Zellausschnitt 1 mit 20 Kontakten, darunter ein mögliches Exozytose-Ereignis, und im Zellausschnitt 3 mit 34 Kontakten, darunter zwei mögliche Exozytosen, eine starke Zunahme der ZM-Kontakte beobachtet werden kann (Abb. 4.55 - Abb. 4.57, Abb. 4.58: C-E, Tab. 3). Während im Zellausschnitt 2 lediglich ein kleines eRV betroffen ist, werden im Zellausschnitt 1 mehrheitlich mittelgroße und große eRV und NV mit ZM-Kontakt beobachtet. Dabei kann im Ausschnitt 1 eine Häufung von Kontakten in einzelnen Bereichen der Zellmembran festgestellt werden: Zwölf der 19 Kontakte liegen jeweils lokal gruppiert im Abstand von ungefähr 1000 nm bis 2000 nm beieinander, wobei jedoch nie mehr als drei Kontakte an einer Stelle beobachtet werden können. Bei

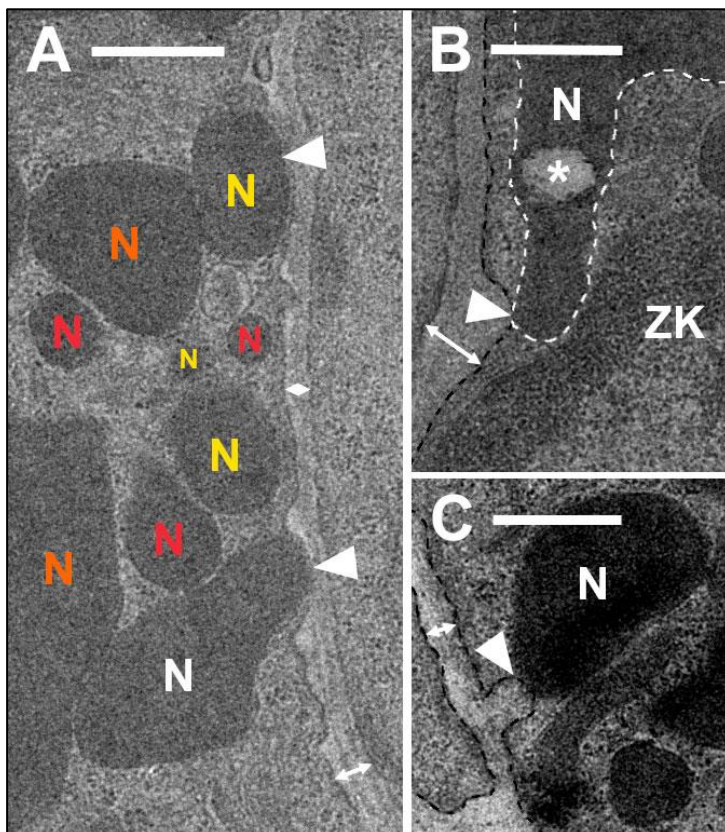


Abb. 4.56: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran im Zellausschnitt 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Kontakte (*Pfeilspitzen*) von Reninspeichervesikel-Netzwerken (N) mit der Zellmembran (*schwarz gestrichelte Linie*). **A:** Zusammenhängende Netzwerke sind jeweils in der gleichen Farbe markiert. **C:** Der Zellmembran-Kontakt befindet sich in einer kleinen Omega Struktur-ähnlichen Einbuchtung der Zellmembran. *Asterisk* Vesikeleinschluss, *Doppelpeile* Zellmembranen, die den Extrazellulärraum umrahmen, ZK Zellkern. *Maßstabsbalken* 500 nm.

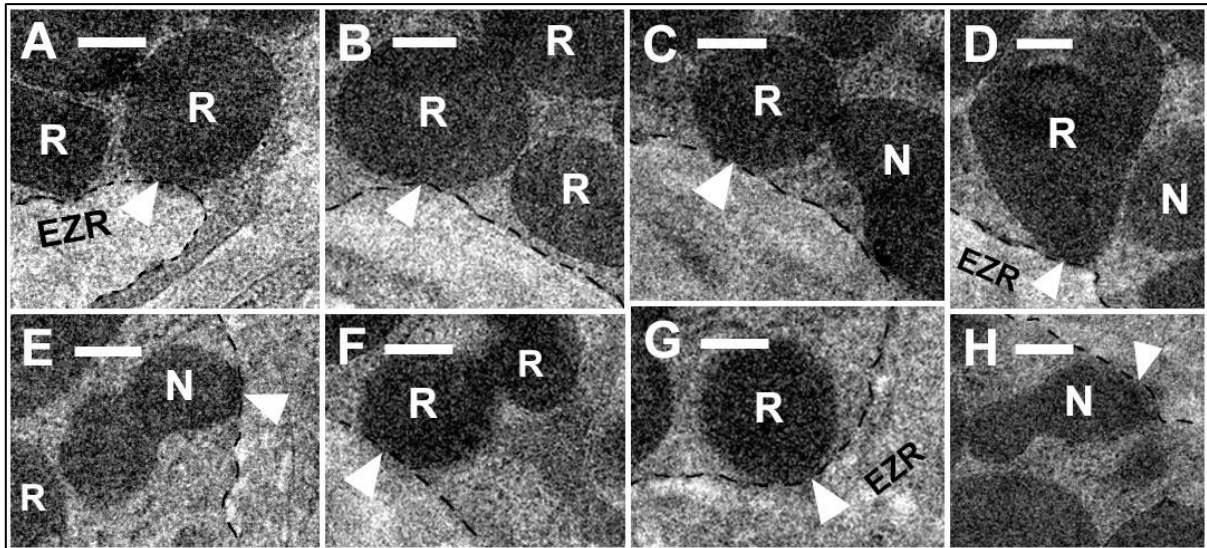


Abb. 4.57: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran im Zellausschnitt 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)

Kontakte (*Pfeilspitzen*) von klassischen einzelnen Reninspeichervesikeln (R) und Reninspeichervesikel-Netzwerken (N) mit der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). EZR Extrazellulärraum. Maßstabsbalken 250 nm.

einem der größten NV im Zellausschnitt 1 des mit Iso stimulierten Knockouts werden sieben Kontakte desselben NV mit der Zellmembran festgestellt. Im Zellausschnitt 3 weisen fast ausschließlich mittelgroße eRV ZM-Kontakte oder Exozytose-Ereignisse auf, wobei bei einem eRV ebenfalls zwei Kontakte erkennbar sind.

Insgesamt befinden sich in den mit Iso stimulierten Knockout-JG-Zellen fünf der ZM-Kontakte und zwei der denkbaren Exozytose-Ereignisse in Einstülpungen der Zellmembran. Bei einem weiteren Kontakt und einem weiteren möglichen Exozytose-Ereignis konnten sehr kleine Einbuchtungen der Zellmembran beobachtet werden (vgl. Abb. 4.55, Abb. 4.56: C).

Trotz der hohen Anzahl an ZM-Kontakten ist in den 3D-Rekonstruktionen der JG-Zellausschnitte ersichtlich, dass das Gesamtvolumen der von ZM-Kontakten betroffenen RV dazu nicht proportional ansteigt (vgl. Abb. 4.58: C, E). Im Zellausschnitt 3 mit der höchsten Anzahl an ZM-Kontakten ist das von den Kontakten betroffene Gesamtvolumen der RV deutlich geringer als im Zellausschnitt 1, bei dem trotz der geringeren Anzahl an ZM-Kontakten über ein Drittel des Gesamtvolumens der RV Kontakt zur Zellmembran zu haben scheint.

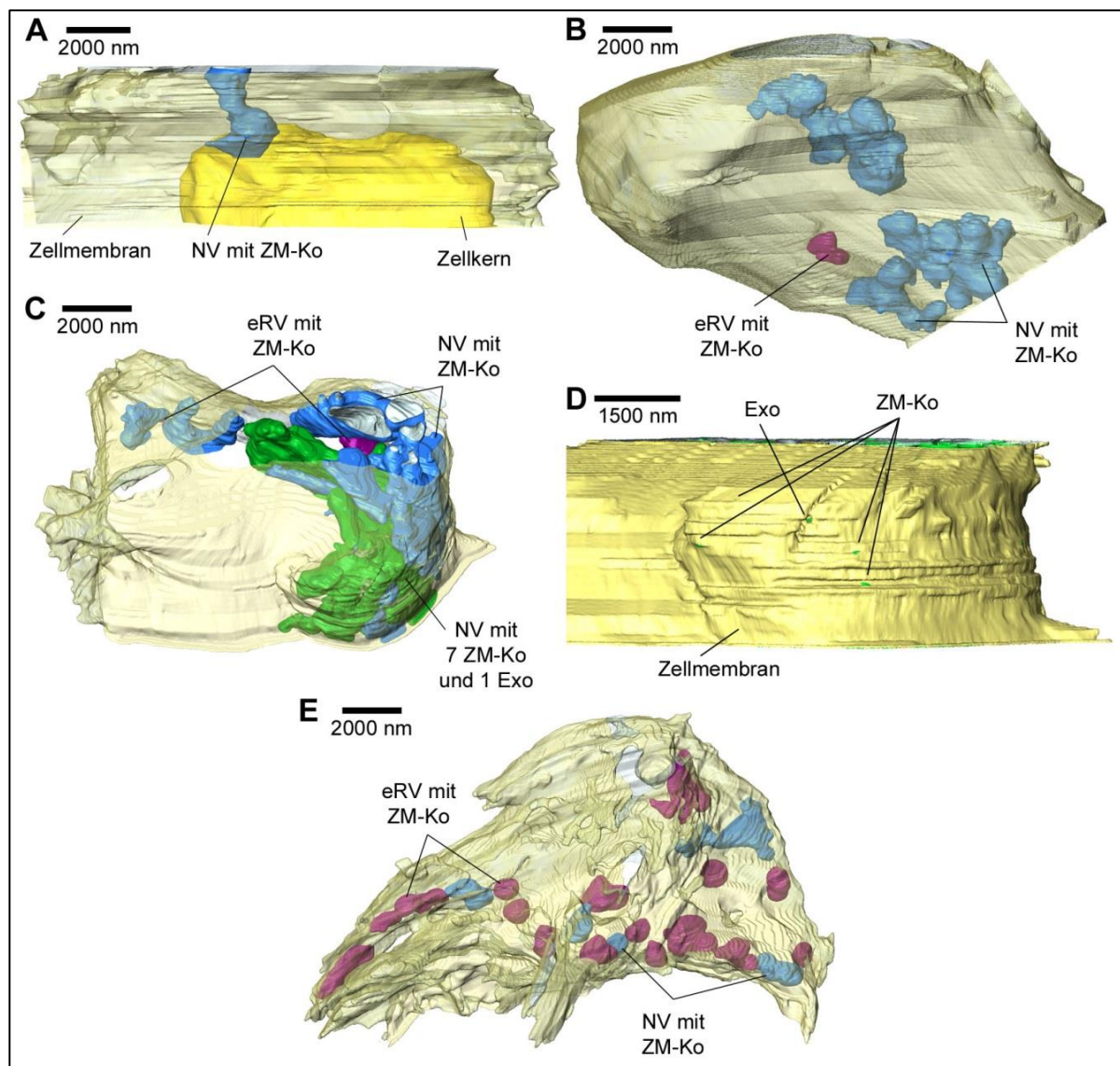


Abb. 4.58: 3D-Darstellung von Reninspeichervesikeln mit Zellmembran-Kontakten (Stimulation mit Isoproterenol, 3800x)

Darstellung der einzelnen, klassischen Reninspeichervesikel (*violett*, eRV) und der Reninspeichervesikel-Netzwerke (*blau*, NV), die Kontakte (ZM-Ko) mit der Zellmembran (*hellgelb*) aufweisen. Möglicherweise beobachtete Exozytose-Ereignisse (Exo) sind separat markiert. **A:** Wildtyp, Zellausschnitt 1. **B:** Wildtyp, Zellausschnitt 3. **C-D:** Das hervorgehobene große NV (*grün*) weist sieben ZM-Ko und eine Exozytose auf. Cx40-Knockout, Zellausschnitt 1. **E:** Cx40-Knockout, Zellausschnitt 3. *gelb* Zellkern.

4.4.2.2 16-minütige Stimulation mit EGTA

Zellmorphologie

Im mit EGTA stimulierten Wildtyp kommen die RV der Zellmembran, ähnlich den anderen betrachteten Wildtyp-Zellen, immer wieder nahe. Im Vergleich zu allen anderen betrachteten JG-Zellausschnitten scheinen die RV im mit EGTA stimulierten Knockout tendenziell deutlicheren Abstand zur Zellmembran zu halten.

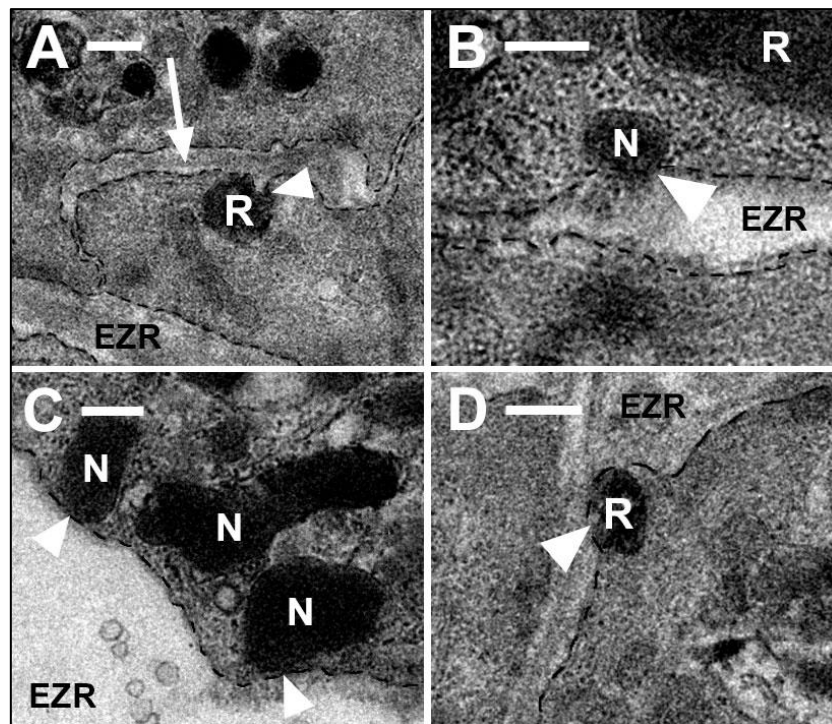


Abb. 4.59: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

Kontakte (*Pfeilspitzen*) von einzelnen Reninspeichervesikeln (R) und Reninspeichervesikeln-Netzwerken (N) mit der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). **A**: Der Zellmembran-Kontakt befindet sich in einer Einstülpung (*Pfeil*) der Zellmembran. Auf Höhe des Kontaktes ist eine kleine Einbuchtung (*Pfeilspitze*) der Zellmembran sichtbar. **A, D**: Die einzelnen, kleinen Reninspeichervesikel mit Zellmembran-Kontakt scheinen inhomogen elektronendichtes Vesikelmaterial aufzuweisen. Zellausschnitt 3. **B-C**: Zellausschnitt 2.1. EZR Extrazellulärraum. Maßstabsbalken 250 nm.

Im Vergleich zu den mit Iso stimulierten JG-Zellen sind die Speichervesikel insgesamt etwas gleichmäßiger im Zytosol verteilt, wobei sich jedoch zumindest im mit EGTA stimulierten Knockout die eRV tendenziell näher an der Zellmembran befinden als die NV (vgl. Abb. 4.30: B-D, Abb. 4.31: C-E, Abb. 4.32: B-D, Abb. 4.49: C-E - Abb. 4.51: C-E). Im Wildtyp ist diesbezüglich keine eindeutige Tendenz erkennbar.

Anzahl und Beschreibung der Zellmembran-Kontakte des Wildtyps

In den TEM-Aufnahmen der drei mit EGTA stimulierten Wildtyp-JG-Zellen sind im Zellausschnitt 2.1 und im Zellausschnitt 3, der aufgrund der veränderten RV-Morphologie nicht rekonstruiert wurde, Kontakte zwischen der Zellmembran und den Reninspeichervesikeln zu sehen (vgl. Tab. 3). Im Ausschnitt 2.1 sind bei vier der fünf Kontakte mittelgroße NV betroffen, wobei ein NV zwei ZM-Kontakte aufweist und drei der ZM-Kontakte lokal gehäuft auftreten (Abb. 4.59: B-C, Abb. 4.62: A-B). Im Zellausschnitt 3 werden drei ZM-Kontakte beobachtet, wobei hier nur kleine bzw. sehr kleine eRV betroffen sind, da die Zelle 3 keine großen RV aufweist (Abb. 4.59: A, D).

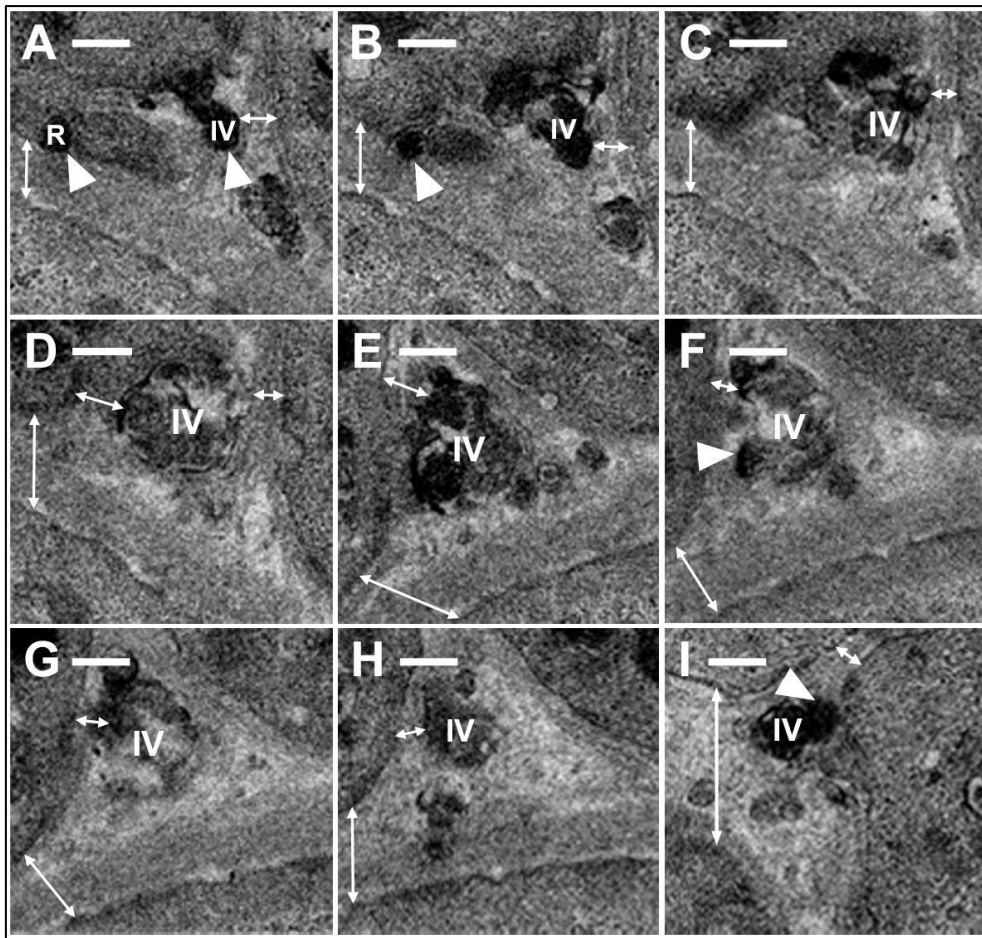


Abb. 4.60: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A-H: Aufeinander folgende TEM-Aufnahmen, die ein Ereignis aufzeigen, das wie die Ausschleusung einer inhomogen elektronendichten Materialansammlung (IV, *Pfeilspitzen*) wirkt. **A-B:** Kontakt eines klassischen Reninspeichervesikels (R) mit der Zellmembran (*linke Pfeilspitze*). **I:** Exozytose-Ereignis (*Pfeilspitze*) eines bereits in den Extrazellulärraum ausgeschleusten kleinen Vesikels. *Doppelpfeile* Zellmembranen, die den Extrazellulärraum umrahmen. *Maßstabsbalken* 250 nm.

Insgesamt befindet sich einer der ZM-Kontakte bei den mit EGTA stimulierten Wildtyp-Zellen in einer Einstülpung der Zellmembran (vgl. Abb. 4.59: A). Dieser ZM-Kontakt weist auf Höhe des Kontaktes eine sehr kleine Einbuchtung der Zellmembran auf.

Im Zellausschnitt 3 kann ein Ereignis an der Zellmembran beobachtet werden, das wie die vollständige Ausschleusung eines inhomogenen Vesikel-Konglomerates wirkt (Abb. 4.60: A-H). Diese inhomogene Ansammlung besteht aus elektronendichtem, wahrscheinlich Renin-haltigen Material und Einschluss-ähnlichen Blasen. Ebenfalls kann der scheinbare Austritt von Vesikelmateriale aus einem bereits in den EZR ausgeschleusten, kleinen RV beobachtet werden (Abb. 4.60: I).

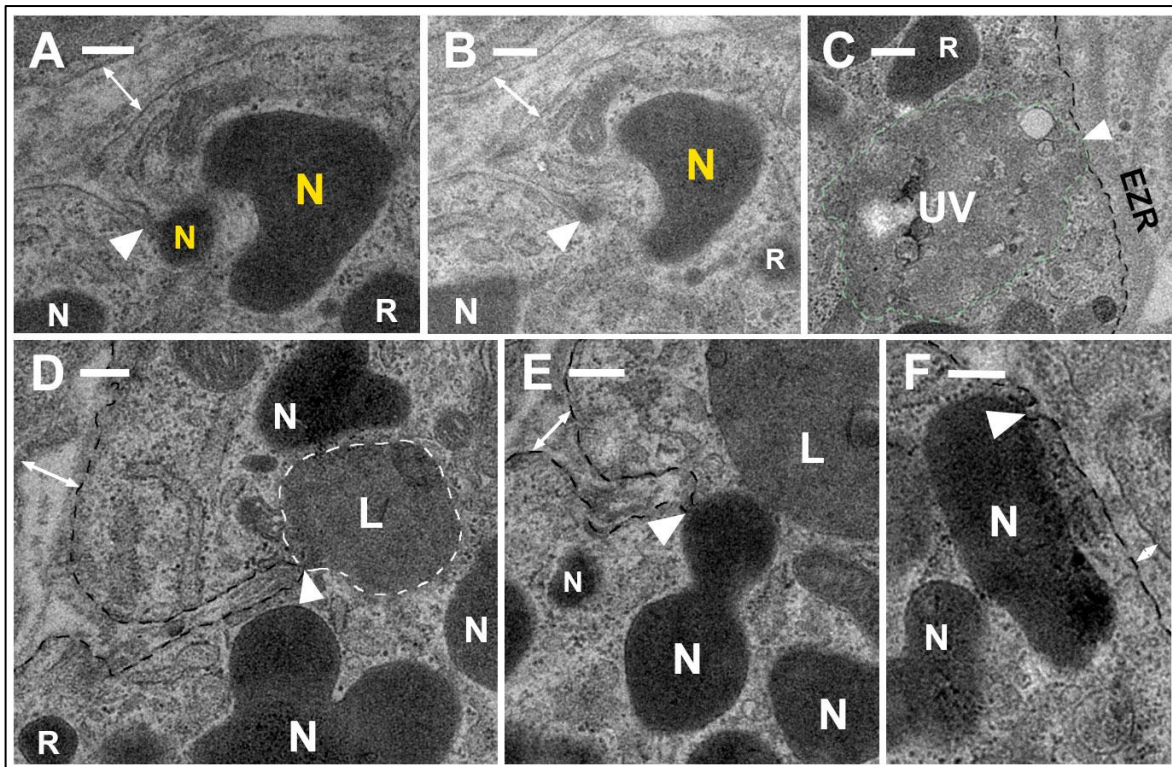


Abb. 4.61: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)

A-B: Zwei aufeinander folgende TEM-Aufnahmen eines möglichen Exozytose-Ereignisses (Pfeil) eines Reninspeichervesikel-Netzwerks (*gelb*, N). Es scheint eine Ausschüttung von Vesikelmateriale in einer Einstülpung der Zellmembran stattzufinden. Zellausschnitt 1. **C:** Kontakt (*Pfeilspitze*) eines großen inhomogenen elektronenarmen Vesikels (UV) mit der Zellmembran (*gestrichelte Linie*). Zellausschnitt 2. **D:** Kontakt (*Pfeilspitze*) eines Low-Density-Vesikels (L) mit der Zellmembran in einer Zellmembraneinstülpung. Zellausschnitt 2. **E-F:** Kontakte (*Pfeilspitzen*) von Netzwerken mit der Zellmembran. Auf Höhe der Zellmembran-Kontakte ist jeweils eine kleine Einbuchtung der Zellmembran erkennbar. Zellausschnitt 1. **E:** Der Zellmembran-Kontakt befindet sich in derselben Einstülpung der Zellmembran wie das Ereignis in **A-B**. *Doppelpfeile* Zellmembranen, die den Extrazellulärraum umrahmen, *EZR* Extrazellulärraum, *R* klassische elektronendichte Reninspeichervesikel. *Maßstabsbalken* 250 nm.

Anzahl und Beschreibung der Zellmembran-Kontakte des Cx40^{-/-}-Knockout

Beim mit EGTA stimulierten Knockout weisen alle drei Zellausschnitte Kontakte zwischen der Zellmembran und den RV auf. Die Anzahl der ZM-Kontakte schwankt zwischen zwei und vier (Abb. 4.61, Abb. 4.62: C-F, Tab. 3), wobei im Zellausschnitt 1 bei einem ZM-Kontakt eine Verdichtung von Material im EZR erkennbar ist. Von ZM-Kontakten betroffen sind mittelgroße eRV und NV. Im Zellausschnitt 1 treten zwei ZM-Kontakte lokal gehäuft auf und im Zellausschnitt 2 sind drei ZM-Kontakte nahe beieinander.

Von all den ZM-Kontakten in den mit EGTA stimulierten Knockout-Zellen befinden sich drei in Einstülpungen der Zellmembran (vgl. Abb. 4.61: A-B, E). Das große LDV

im Zellausschnitt 1 weist einen Zellmembran-Kontakt auf, der sich ebenfalls in einer Einstülpung der Zellmembran befindet (vgl. Abb. 4.61: D).

Das große inhomogene Vesikel geringer Elektronendichte, das sich im Zellausschnitt 2 der mit EGTA stimulierten Knockout-Zellen befindet, weist ebenfalls einen ZM-Kontakt auf (vgl. Abb. 4.61: C).

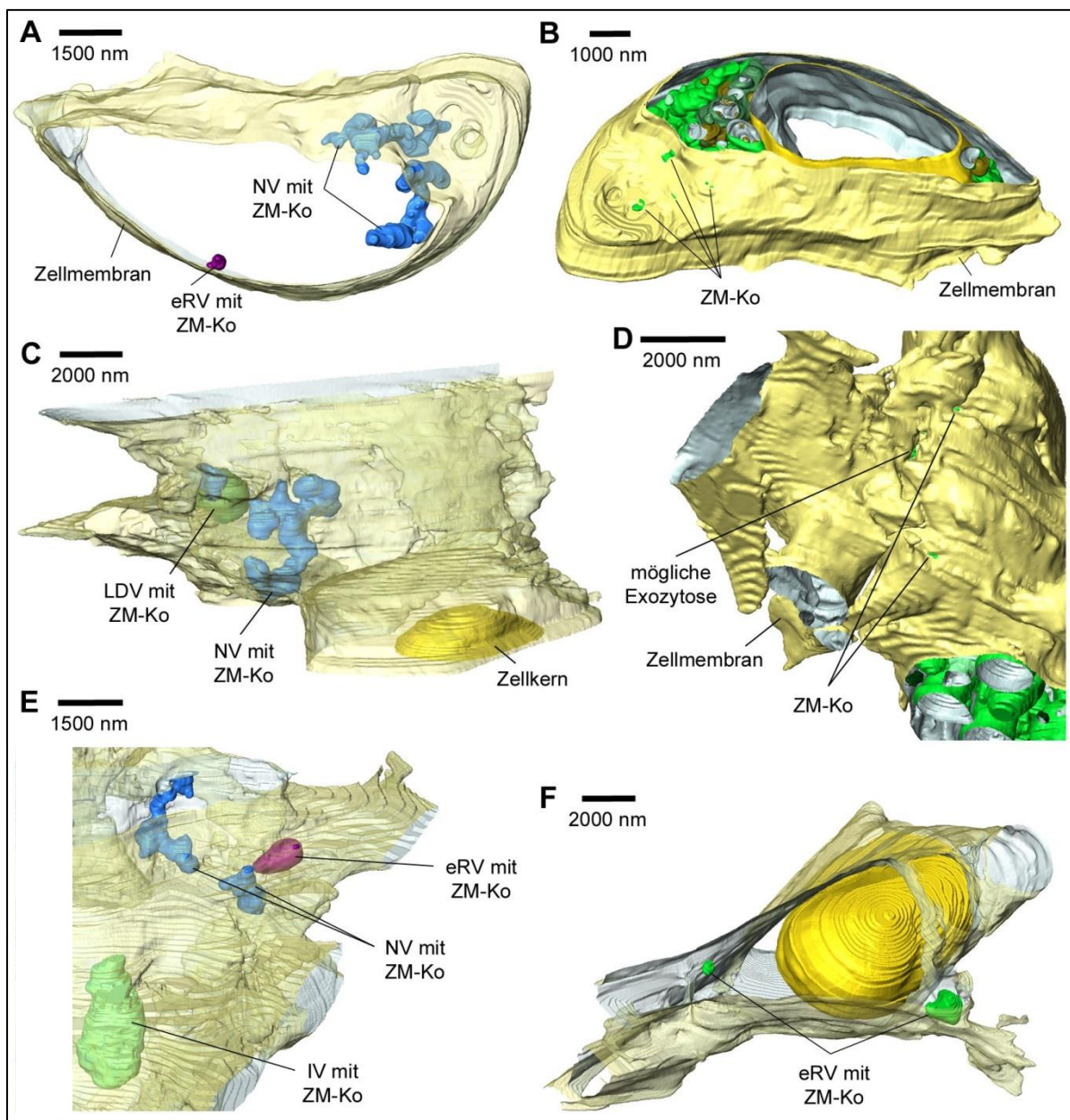


Abb. 4.62: 3D-Darstellung von Reninspeichervesikeln mit Zellmembran-Kontakten (Stimulation mit EGTA, 3800x)

Darstellung von einzelnen irregulären Reninspeichervesikeln (*violett*, eRV), Reninspeichervesikel-Netzwerken (*blau*, NV), eines Low-Density-Vesikels (LDV) und einem inhomogen elektronendichten Vesikels (IV) mit Zellmembran-Kontakt (ZM-Ko). Möglicherweise beobachtete Exozytose-Ereignisse (Exo) sind separat markiert. **A-B:** Wildtyp, Zellausschnitt 2.1. **C-D:** Cx40-Knockout, Zellausschnitt 1. **E:** Cx40-Knockout, Zellausschnitt 2. **F:** Cx40-Knockout, Zellausschnitt 3. *hellgelb / transparent* Zellmembran, *gelb* Zellkern.

5 Diskussion

Das RAAS ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung des Blutdrucks, wobei beim Menschen unter physiologischen Bedingungen die Plasmanreninkonzentration den limitierenden Faktor der RAAS-Aktivität darstellt [18, 19]. Aus diesem Grund setzen viele negative Rückkopplungsmechanismen zur Regulation des RAAS bei der Produktions- und Sekretionsrate von Renin an [8, 20-22]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der von intrarenalem Blutdruck ausgelöste negative Feedbackmechanismus auf Reninexpression und -sekretion, der sog. Barorezeptorreflex, bei Cx40^{-/-}-Mäusen gestört ist und dass diese Mäuse einen Anstieg der Reninsynthese und der Plasmanreninkonzentration aufweisen [1, 173, 174]. Zudem wurde von Wagner et al. in IPN-Versuchen festgestellt, dass die RSR unter Stimulation mit Iso regulär ansteigt, wohingegen unter Stimulation mit EGTA eine Zunahme der RSR im Gegensatz zum Wildtyp nur in geringem Maße stattfindet [1]. Aufgrund dieses fehlenden Anstiegs der RSR beim mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Ausmaß sich die Abwesenheit von Cx40 in der zwei- und dreidimensionalen Ebene auf die Reninsekretion und auf die RV-Morphologie auswirkt. Dazu wurden Wildtyp- und Cx40^{-/-}-Mäuse im unstimulierten und im mit Iso bzw. EGTA stimulierten Zustand ultrastrukturell analysiert.

Die unstimulierte Cx40^{-/-}-Maus weist dabei im Vergleich zur Wildtyp-Maus fast ausschließlich klassisch runde RV auf, während sich nach der 16-minütigen Stimulation mit Iso der Vernetzungsgrad in beiden Mäusestämmen ähnelt. In zwei der mit Iso stimulierten Cx40^{-/-}-Zellausschnitte werden überdurchschnittlich viele ZM-Kontakte festgestellt. Die 16-minütige Stimulation des Cx40^{-/-} mit EGTA führt im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp nicht zum signifikanten Anstieg der RSR und in diesem Zusammenhang auch nicht zur Inhomogenität der RV-Elektronendichte und zu weniger ausgeprägten morphologischen Veränderungen der RV. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur ultrastrukturellen Vesikelmorphologie im mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} korrelieren mit dem von Wagner et al. beobachteten Ausbleiben des RSR-Anstiegs dieses Genotyps in IPN-Versuchen [1].

5.1 Allgemeine Morphologie in JG-Zellen

Als Vorstufen der Reninspeichervesikel werden kleine, ovoide bis rautenförmige, weniger elektronendichte Vesikel betrachtet (vgl. Abb. 4.8). Ihre Entstehung und ihre Reifung zu DCVs, die Renin enthalten, wurde schon in mehreren Arbeiten beschrieben [38, 39, 232]. In diesen Arbeiten wurde ebenfalls bereits festgestellt, dass diese Vorstufen manchmal einen von einer weiteren Membran umgebenen elektronenarmen dünnen Saum aufweisen und Konglomerate bilden, die Teil des Reifungsprozesses der Vesikel sind und sich sowohl homogen als auch inhomogen präsentieren können.

Vesikel, die auf TEM-Aufnahmen eine geringere Elektronendichte als die übrigen RV aufweisen, werden in dieser Arbeit als LDV bezeichnet. Bezieht man sich auf frühere Untersuchungen, handelt es sich bei den im Wildtyp beobachteten kleinen LDV (vgl. Abb. 4.7) wahrscheinlich um eine Normvariante der RV-V, die als sog. „Übergangsvesikel“ (*intermediate granules*) bezeichnet werden [38, 39, 234]. Die Abwesenheit von kleinen LDV im Cx40^{-/-}, könnte damit erklärt werden, dass der Reifungsprozess der RV in diesem Knockout moduliert ist. Da mehrere Studien darauf hinweisen, dass Cx40^{-/-}-Mäuse einen Anstieg der Reninsynthese und der Reninsekretion aufweisen [1, 173, 174], ist nicht auszuschließen, dass das Fehlen von Cx40 die Übertragung von Signalen beeinflusst, die bei der Reifung der RV eine Rolle spielen könnten.

In dieser Arbeit als kleine, klare oder inhomogen elektronendicht beschriebene Vesikel wurden bereits in früheren Arbeiten festgestellt [39, 229, 232, 235]. Ihnen zufolge könnte es sich bei manchen dieser klaren oder elektronenarmen Vesikel (vgl. Abb. 4.9: A) um endozytierte Vakuolen oder multivesikuläre Endosomen handeln. Aufgrund der Ähnlichkeit der RV mit sekretorischen Lysosomen ist bei diesen Vesikeln nicht ausgeschlossen, dass sie grundsätzlich die Fähigkeit haben könnten, Renin anzureichern [39, 229]. Dass die klaren Vesikel bei den stimulierten Mäusen generell häufiger vorgefunden werden, könnte unabhängig vom Ursprung der Vesikel darauf beruhen, dass in den zur Reninsekretion stimulierten JG-Zellen alle Transportmechanismen, die bei Exozytosen und Endozytosen relevant sind, verstärkt aktiv sind. Die bereits nachgewiesene Störung bestimmter negativer Feedbackmechanismen, wie dem Barorezeptorreflex, bei Cx40^{-/-}-Mäusen könnte das gehäufte Auftreten solcher Vesikel im Knockout erklären [1, 173, 174].

Prinzipiell könnte es sich bei klaren oder inhomogenen Vesikeln auch um unspezifische oder degenerierte Vesikel handeln [229]. Das große, mit inhomogen granuliertem Material gefüllte Vesikel in einem der mit EGTA stimulierten JG-Zellausschnitte des Cx40^{-/-} (vgl. Abb. 4.46) könnte in Anbetracht des zu beobachtenden Kontaktes dieses Vesikels mit der Zellmembran der „Überrest“ einer stattgefundenen Exozytose sein [232]. Bei den elektronendichteren inhomogenen Vesikeln (vgl. Abb. 4.8, Abb. 4.9: E) könnte es sich, ebenso wie bei den kleinen LDV, auch um Normvarianten der RV-V handeln [39].

Vereinzelt waren in allen betrachteten JG-Zellausschnitten Reninspeichervesikel mit kleinen, vesikulären Einschlüssen erkennbar. Solche Einschlüsse sind schon in früheren ultrastrukturellen Analysen aufgefallen [39, 229, 236]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Einschlüsse kein Renin enthalten [39, 229]. Auffällig ist, dass diese RV-Einschlüsse, vor allem wenn sie größer sind, manchen „klaren“ Vesikeln im Zytosol ähneln. Ob diese Einschlüsse in Verbindung mit der Reninsekretion, mit den lysosomalen Eigenschaften der RV oder deren Fähigkeit zur Mikroautophagie stehen, ist noch nicht bekannt [229]. Das verstärkte Auftreten solcher Einschlüsse im Zuge eines IPN-Versuchs zur unstimulierten Beige-Maus in einer früheren Studie [236] würde auf einen Zusammenhang mit den lysosomalen Eigenschaften der RV hinweisen. Es wurde außerdem die Theorie geäußert, dass die Einschlüsse eventuell als von der Zellmembran endozytierte Vakuolen dazu dienen, Komponenten der extrazellulären Matrix zu den RV zu transportieren oder auf irgendeine andere Art ein Transportmedium darstellen [229]. Es wäre auch denkbar, dass diese Einschlüsse zum Transport oder „Recyceln“ von Vesikelmembranen dienen. Die Tatsache, dass RV-Einschlüsse in dieser Arbeit in denjenigen JG-Zellen vermehrt angetroffen werden, die eine gesteigerte RSR aufweisen, deutet darauf hin, dass die Einschlüsse mit Vorgängen der Reninspeicherung und -sekretion in Verbindung stehen.

5.2 Morphologie der Reninspeichervesikel in JG-Zellen

5.2.1 Die Cx40^{+/+}-Maus

Die dreidimensionale Darstellung der RV-Morphologie eines unstimulierten Wildtyps war bereits Gegenstand früherer Studien des Instituts [237] und steht deshalb in dieser Arbeit nicht im Mittelpunkt. Der unstimulierte Wildtyp stellt jedoch den

„Grundzustand“ der JG-Zellen dar und wird daher für den Vergleich mit dem Cx40^{-/-} und mit dem stimulierten Zustand des Wildtyps und des Knockouts verwendet.

Der Inhalt der Reninspeichervesikel stellt sich in dieser Arbeit meist als homogen und elektronendicht dar. Sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand sind in den zweidimensionalen TEM-Aufnahmen runde und unregelmäßige, polymorphe RV feststellbar, wobei beim unstimulierten Wildtyp die eRV vor allem klassisch rund erscheinen. Es existieren zudem auch stets größere Speichernetzwerke. Dabei wirken manche dieser Netzwerke, als wären sie aus der Fusion von mehreren einzelnen „klassischen“ RV entstanden, wohingegen andere Speichernetzwerke vollständig irreguläre, kavernöse, teils auch scheinbar abgeflachte Konglomerate bilden, die mit den klassisch runden eRV wenig Ähnlichkeit aufweisen (vgl. Abb. 4.4, Abb. 4.5). In früheren Veröffentlichungen werden die DCV in TEM-Aufnahmen als rund [232, 238], in anderen Arbeiten eher als polymorph oder unregelmäßig [62, 235] beschrieben. Die Beobachtungen von Steppan et al. [237], dass beide morphologische Varianten und auch variabel geformte Netzwerke im Wildtyp anzutreffen sind, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden.

Zudem werden Ereignisse beobachtet, die auch in früheren Untersuchungen als miteinander fusionierte RV [39, 239] oder als sich teilende Speichervesikel, die nur noch über eine Membranbrücke verbunden sind [235], interpretiert werden (vgl. Abb. 4.3). Einzelne RV wirken auch, als würde gerade ein sehr kleines RV mit einem eRV fusionieren oder aus ihm entspringen (vgl. Abb. 4.6: B, Abb. 4.27: A), wobei bei manchen dieser Ereignisse das kleine RV eine andere Elektronendichte aufweist (vgl. Abb. 4.34). Ähnliche Ereignisse wurden auch von Taugner et al. im Rahmen der Betrachtung von RV-V festgestellt, weshalb diese als Fusionen im Zuge des Reifungsprozesses von RV interpretiert wurden [39, 232].

In der 3D-Rekonstruktion bilden nicht nur polymorphe RV, sondern auch manche in TEM-Aufnahmen rund wirkende Speichervesikel Netzwerke verschiedener Größen aus. Bereits in der dreidimensionalen Rekonstruktion des unstimulierten Wildtyps sind 56,8 % der Speichervesikel Teil von kleineren oder größeren Netzwerken. Insgesamt weisen die RV die verschiedensten Zwischenstadien von einfachen runden eRV bis hin zu großen, kavernenartigen Speichernetzwerken auf. Auch im stimulierten Wildtyp sind neben großen Speichernetzwerken auch stets kleinere NV und eRV zu beobachten. Diese Beobachtungen bestätigen die Theorie von Steppan et al., dass die hohe Variabilität der RV-Morphologie auf einen dynamischen Prozess

hinweist, der die Fusion von Vesikeln miteinander zu Netzwerken und Kavernen, aber auch die Fragmentierung von größeren Speicherstrukturen in kleinere Vesikel beinhalten könnte [237].

5.2.2 Die Cx40^{-/-}-Maus

Gap Junctions und Hemichannels, die aus Connexinen aufgebaut sind, ermöglichen den Austausch von Ionen und größeren Molekülen zwischen benachbarten Zellen bzw. zwischen der jeweiligen Zelle und dem EZR [138-140, 240]. JG-Zellen im adulten Organismus exprimieren überwiegend Cx40 [166]. Frühere Studien weisen darauf hin, dass Cx40 und Gap Junctions mit Cx40 zwischen JG-Zellen und dem benachbarten Endothel bzw. dem extraglomerulärem Mesangium einen Übertragungsweg für Signale vom Gefäßsystem bzw. aus der MD zur Regulierung der Reninsynthese und -expression darstellen [1, 170-172]. Bei Cx40^{-/-}-Mäusen ist nachweislich der von intrarenalem Blutdruck ausgelöste negative Feedbackmechanismus auf Reninexpression und -sekretion gestört [1, 173, 174].

Cx40^{-/-}-Mäuse weisen unter anderem chronischen Bluthochdruck, eine erhöhte Anzahl an Renin produzierenden Zellen und einen Anstieg der Reninsynthese und der Plasmapreninkonzentration auf [1, 173, 174]. Der prozentuelle Anteil der RV am gesamten Zytosolvolumen und das durchschnittliche Volumen der eRV sind im unstimulierten Cx40^{-/-} im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp tendenziell größer. Dies sind die in der vorliegenden Arbeit festgestellten, morphologischen Korrelate, die auf die in früheren Studien gemessene erhöhte Reninsynthese und RSR im Cx40^{-/-} hinweisen könnten.

In einer Arbeit zu Cx40^{-/-}-Mäusen von Krattinger et al. wurde beobachtet, dass unter dem Mikroskop trotz einer vermehrten Anzahl an JG-Zellen pro Glomerulus, die JG-Zellen ein geringeres Zellvolumen und weniger, aber dafür runder wirkende Reninspeichervesikel aufwiesen als im Wildtyp [173]. Die veränderte Morphologie der RV konnte in den TEM-Aufnahmen und in der 3D-Rekonstruktion der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im unstimulierten Cx40^{-/-} sind fast ausschließlich runde eRV und kaum irreguläre eRV oder miteinander vernetzte Speichervesikel zu sehen (vgl. Abb. 4.34, Abb. 4.35). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Krattinger et al. [173] konnten ein vermindertes Zellvolumen der betrachteten JG-Zelle und eine geringere Anzahl an Reninspeichervesikeln in den TEM-Aufnahmen und im dreidimensionalen Modell jedoch nicht bestätigt werden. Dass die Mehrheit

der RV aus eRV besteht, könnte daran liegen, dass die natürliche Fusion von RV untereinander und die Ausbildung von großen Speichernetzwerken durch das Fehlen von Cx40 auf irgendeine Weise negativ beeinflusst werden. Im Cx40^{-/-} ist das funktionelle Synzytium von JG-, Endothel- und glatten Muskelzellen, in dem JG-Zellen normalerweise eingebettet sind, beeinträchtigt [1, 173, 174]. Es wäre folglich denkbar, dass JG-Zellen zur Ausbildung von Speichernetzwerken und für die dynamischen Prozesse, die für die Fusion von RV untereinander und möglicherweise auch deren Fragmentierung notwendig sind, generell auf interzelluläre Kommunikation bzw. extrazelluläre Signale angewiesen sind.

5.3 Die kontrollierte Reninsekretion in JG-Zellen

5.3.1 Mögliche Exozytose-Mechanismen

5.3.1.1 „Klassische“ Exozytose versus *Kiss and Run*-Mechanismus

Die regulierte Exozytose wird in mehreren früheren Studien als der entscheidende Mechanismus der Reninsekretion postuliert [92, 194, 235, 241, 242], wobei laut Hochrechnungen von Taugner et al. 20-500 RV-Exozytosen pro Minute ausreichen, um den basalen Plasmeninspiegel bei Mäusen konstant zu halten [232]. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit in einer einzigen JG-Zelle zum Zeitpunkt der Gewebefixierung ein Exozytose-Ereignis festzuhalten auch im stimulierten Zustand sehr gering. Dies könnte erklären, warum in JG-Zellen typische ultrastrukturelle Anzeichen von Exozytosen bisher nur selten beobachtet wurden. In vielen anderen endo- und exokrinen Zellen sind im Vergleich zu JG-Zellen beispielsweise Vesikelmateriale enthaltende Omega-förmige Membranstrukturen nachweisbar, die eine gerade stattfindende Exozytose darstellen [232, 233]. Daher geht man derzeit davon aus, dass in JG-Zellen enge Kontakte zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran ein Hinweis auf bevorstehende Exozytose-Ereignisse sind [232, 236, 239].

In dieser Arbeit sind Exozytose-Ereignisse in Form von Omega-Strukturen oder dem Austritt von Vesikelmateriale in den TEM-Aufnahmen ebenfalls nicht sicher festgestellt worden. Jedoch können auf der Höhe von ZM-Kontakten manchmal kleine Einbuchtungen der Zellmembran hin zum RV festgestellt werden (vgl. Abb. 4.55, Abb. 4.56: B-C) oder eine minimale Änderung der Elektronendichte bzw. der

Homogenität der RV (vgl. Abb. 4.54: C, E). Beides werteten Taugner et al. als erste morphologische Anzeichen einer Exozytose [232].

Eine andere Erklärung dafür, dass in JG-Zellen bislang typische ultrastrukturelle Anzeichen von Exozytosen nur selten beobachtet wurden, wäre, dass ZM-Kontakte auch auf den sog. *Kiss and Run*-Mechanismus (K&R) hinweisen könnten. Anstatt der vollständigen Fusion von Vesikel- und Zellmembran kommt es beim K&R-Mechanismus zur kurzzeitigen Öffnung einer Fusionspore, die sich schnell wieder schließt. Unter Erhalt des Vesikels wird dadurch kontrolliert Vesikelmateriale sezerniert [214, 215, 243, 244]. Dies wäre auch in Einklang mit der Vermutung von Taugner et al., dass der Bereich der Fusion zwischen RV und Zellmembran im Zuge der Reninsekretion sehr klein sein könnte und deshalb in elektronenmikroskopischen Aufnahmen selten beobachtet wird [232].

Der K&R-Mechanismus wurde außer in synaptischen Vesikeln auch bereits bei sekretorischen Vesikeln von endokrinen Zellen festgestellt, zum Beispiel in Chromaffinzellen der Nebenniere und in Insulin sezernierenden Zellen des Pankreas [216, 217]. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass es bei K&R-Exozytosen sowohl zu einer vollständigen als auch zu einer unvollständigen bzw. auf mehrere K&R-Zyklen aufgeteilte Ausschüttung von Vesikelmateriale kommen kann. Dabei scheinen unter anderem das Gesamtvolumen des Vesikels, die Größe der Fusionspore und die zu sezernierenden Vesikelinhalte als auch eine eventuelle Bindung von Vesikelmateriale an Vesikelmembranproteine eine Rolle zu spielen [245-250]. Bedenkt man, dass die vollständige Sekretion von Vesikelmateriale aus den großen RV-Netzwerken zu einem sehr starken Anstieg der RSR über einen kurzen Zeitraum hinweg führen könnte, ist es vorstellbar, dass sich RV unvollständig bzw. sehr langsam entleeren [230]. Dies wird durch die Beobachtungen von Steppan et al. unterstützt, dass in Beige-Mäusen trotz riesiger Speichernetzwerke in TEM-Aufnahmen nur ein Teil des Renins tatsächlich sezerniert wird, obwohl ultrastrukturell ZM-Kontakte festgestellt wurden, die nicht nur kleine RV, sondern auch die großen NV betrafen [237]. Es wäre folglich durchaus vorstellbar, dass ZM-Kontakte nicht zwingendermaßen auf ein bevorstehendes „klassisches“ Exozytose-Ereignis hinweisen müssen, wie dies in anderen Arbeiten postuliert wird [232, 236, 239]. Der K&R-Mechanismus wäre zudem ein plausibler Erklärungsansatz, wie die JG-Zellen trotz großer Speichernetzwerke auch kontrolliert kleine Mengen Renin sezernieren können.

5.3.1.2 Die Compound-Exozytose

Die Tatsache, dass im Zuge dieser Arbeit auch bei einem Anstieg der RSR im Normalfall keine signifikante Zunahme an ZM-Kontakten oder Exozytose-Ereignissen festgestellt werden kann, lässt vermuten, dass das Volumen der RV und deren Vernetzungsgrad untereinander für eine Steigerung der RSR entscheidend sind. Das Vorkommen von durch Fusion einzelner RV entstandenen Speichernetzwerken wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet [39, 194, 207, 231, 237]. Die Sekretion von gespeichertem Material aus miteinander fusionierten Vesikeln wird als Compound-Exozytose bezeichnet und konnte bislang in mehreren Zellarten, darunter auch in den Azinus- und β -Zellen des Pankreas, nachgewiesen werden [206, 210, 211]. Jüngst haben auch ultrastrukturelle Analysen von JG-Zellen die CE als wahrscheinlichen Sekretionsmechanismus zur kontrollierten schnellen Steigerung der RSR aufgezeigt [237].

Die CE wird nicht nur als Möglichkeit betrachtet, die Sekretion von Material über ein gewisses Zeitintervall zu maximieren [205], sondern auch um den Transport von Vesikeln zur Zellmembran zu minimieren [208]. In real-time Untersuchungen von Peti-Peterdi et al. wurde beobachtet, dass RV keine gerichtete Bewegung zur Zellmembran aufweisen [242]. Dies konnte von Steppan et al. [237] und auch in der vorliegenden Arbeit ultrastrukturell bestätigt werden.

Da von Peti-Peterdi et al. im Zuge seiner Studien die Entleerung von RV im Zellinneren dennoch beobachtet werden konnte [242], wird angenommen, dass durch bereits in früheren Studien beobachtete Einstülpungen der Zellmembran RV im Inneren der JG-Zellen Zugang zur Zellmembran erhalten, um Renin sezernieren zu können [233, 235, 251]. Dies scheint in der vorliegenden Arbeit dadurch bestätigt zu werden, dass kleine und in stimulierten JG-Zellen auch größere Einstülpungen der Zellmembran zu sehen sind, in denen einige RV auch ZM-Kontakte aufweisen.

Es wäre möglich, dass diese Plasmamembraneinstülpungen durch die Entleerung von Speichernetzwerken entstehen [237]. Anstatt die Vesikelmembran dieser RV vollständig in der Plasmamembran zu integrieren, könnte in JG-Zellen durch den Erhalt dieser „Vesikelhöhlen“ weiteren Speichervesikeln im Inneren der Zellen Zugang zur Zellmembran verschafft werden. Dies würde auch erklären, warum diese Membraneinstülpungen mit zunehmender Stimulation der JG-Zellen markanter werden [233, 251]. Es könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass in JG-Zellen manche Vesikelmembranen entleerter Speichervesikel nicht im Sinne einer

„klassischen“ Exozytose Teil der Plasmamembran werden und auf Clathrin-vermittelte Endozytose warten [218, 245, 252], sondern als „spezialisierte Zellmembran-Zonen“, möglicherweise im Sinne eines abgewandelten, in die Länge gezogenen K&R-Mechanismus, weiterhin an der Reninsekretion mitwirken.

Bei der sequentiellen CE kommt es nach der Verschmelzung sog. Primärvesikel mit der Zellmembran zur Fusion von tiefer im Zytoplasma gelegenen Sekundärvesikeln mit den Primärvesikeln (vgl. Abb. 2.7: C). Die Sekundärvesikel sind bei der sequentiellen CE erst nach der Fusion von Primärvesikeln mit der Zellmembran zur Fusion mit den Primärvesikeln befähigt [207, 208]. Bei der selteneren multivesikulären CE fusionieren Vesikel zuerst untereinander und anschließend mit der Plasmamembran [209] (vgl. Abb. 2.7: B). Beide Formen der CE werden in manchen Zellen zeitgleich vorgefunden [205, 206, 210, 211]. Es wurde die Vermutung geäußert, dass multivesikuläre Körper lange vor der Fusion mit der Zellmembran in der Zellperipherie entstehen und dass die Fusion der Vesikel untereinander durch die Verschmelzung einzelner Vesikel mit der Zellmembran initiiert wird. Dadurch würden sich die sequentielle und die multivesikuläre CE biochemisch nicht unterscheiden [205, 209]. Da bei JG-Zellen wohl keine gerichtete Bewegung der Vesikel zur Zellmembran stattfindet [242] und sich in der vorliegenden Arbeit viele Netzwerke, teils auch sehr kleine Netzwerke, scheinbar gemeinsam mittig in den Zellausschnitten ansammeln, erscheint es unwahrscheinlich, dass in JG-Zellen RV zuerst zur Zellmembran und anschließend wieder in die Zellmitte wandern. Geht man jedoch davon aus, dass Speicherstrukturen dynamisch sind und ebenfalls eine Fragmentierung von Vesikeln stattfindet [235, 236], könnte dies die ultrastrukturelle Beurteilung solcher Prozesse erschweren.

Mit einem steigenden Vernetzungsgrad der RV erhöht sich indes generell die stochastische Wahrscheinlichkeit, dass zur Steigerung der RSR ausreichend große RV von einem Exozytosevorgang betroffen sind. Das Vorherrschen von eRV im unstimulierten Cx40^{-/-} weist darauf hin, dass JG-Zellen für eine langfristige Erhöhung der basalen RSR nicht auf große Speichernetzwerke angewiesen sind. Zudem könnte die hohe Anzahl an eRV bedeuten, dass RV womöglich durch interzelluläre Kommunikation oder extrazelluläre Signale via Gap Junctions zur Ausbildung von Speichernetzwerken und zur CE befähigt werden.

Alles in allem bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die CE ein relevanter Sekretionsmechanismus in JG-Zellen zu sein scheint, auch wenn keine

Aussage darüber gemacht werden kann, auf welchem Mechanismus diese beruht. Ebenfalls vorstellbar wäre, dass die CE in JG-Zellen sowohl in Kombination mit der „klassischen“ Exozytose als auch der K&R-Exozytose stattfindet.

5.3.1.3 Weitere Überlegungen zu Zellmembran-Kontakten

In dieser Arbeit werden, mit Ausnahme des mit Iso stimulierten Cx40^{-/-}, pro Zellausschnitt durchschnittlich 2-3 Kontakte von RV mit der Zellmembran festgestellt. Geht man davon aus, dass die Berechnungen von Taugner et al. zur Häufigkeit von Exozytose-Ereignissen [232] korrekt sind, kann die hohe Anzahl an ZM-Kontakten auch damit erklärt werden, dass RV mit ultrastrukturell sichtbarem ZM-Kontakt nicht zwangsweise ein Hinweis auf ein unmittelbar bevorstehendes Exozytose-Ereignis sind, sondern an die Zellmembran angedockte Speichervesikel darstellen, die zur Reninsekretion potentiell zur Verfügung stehen. Dementsprechend könnten diese RV sog. *Readily Releasable Pools* (RRPs) angehören, die eine Ansammlung von bereits aktivierten Vesikeln nahe der Zellmembran darstellen, die unter entsprechender Stimulation bevorzugt und schneller als andere Vesikel zur Sekretion befähigt sind [253-255]. Dies würde erklären, warum trotz relativ häufig beobachteten ZM-Kontakten, kein stärkerer Anstieg der RSR festgestellt wird, und warum die von ZM-Kontakten betroffenen RV nur selten eine erkennbare Abnahme der Elektronendichte oder einen eindeutigen Austritt von Vesikelmateriale aufweisen.

Dass sich manche der von ZM-Kontakten betroffenen RV in dieser Arbeit über mehrere Gewebeschnitte hinweg sehr nahe an der Zellmembran befinden und manche Speichernetzwerke mehrere ZM-Kontakte aufweisen, könnte eine Folge der erhöhten „Fusionsbereitschaft“ der aktivierten RV der RRP darstellen. Das gruppierte Auftreten von ZM-Kontakten könnte demzufolge ein ultrastruktureller Nachweis von sog. „aktiven Zonen“ in der Zellmembran sein, an denen RV andocken, geprimet werden und sich lokal ansammeln [256]. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich Ausschnitte von JG-Zellen betrachtet werden, könnte das gehäufte Auftreten von ZM-Kontakten in bestimmten Zellmembranbereichen die schwankende Anzahl der in den einzelnen Zellausschnitten beobachteten ZM-Kontakte erklären.

Möglicherweise erhalten diese geprimten RV nach ihrer „Rekrutierung“ zu RRP zudem die Fähigkeit, leichter mit anderen RV zu fusionieren und Speichernetzwerke auszubilden. Dies könnte bedeuten, dass diese aktivierten RV ihre erhöhte „Fusionsbereitschaft“ an weitere RV im Inneren der Zelle weitergegeben und dass sich die sequentielle und die multivesikuläre CE biochemisch womöglich tatsächlich nicht

unterscheiden [205, 209]. Auch wenn diese „CE-Befähigung“ nicht zwangsweise auf aktivierte RV von RRP's beschränkt sein muss, legt diese Theorie nahe, dass für die Befähigung zur CE womöglich keine kurzzeitige Fusion eines RV mit der Zellmembran notwendig ist, sondern der Kontakt mit der Zellmembran ausreicht.

Die Theorie, dass Renin neben dem Exozytosemechanismus auch durch intrazelluläre Solubilisation von Reninspeichervesikeln zur Zellmembran transportiert wird [234, 257, 258], kann in dieser Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden. Der Vorgang der Solubilisation ist in TEM-Aufnahmen nur schwer zu erkennen und wird unter anderem von Taugner et al. als Mechanismus auch generell in Frage gestellt [232].

5.3.2 Die Cx40^{+/+}-Maus

5.3.2.1 16-minütige Stimulation mit Isoproterenol

Die 16-minütige Perfusion mit 10 nM Iso, das intrazellulär einen Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt [8], beeinflusst die Morphologie der RV nicht signifikant. Die Stimulation mit Iso führt zwar zum Anstieg der RSR, eine Zunahme von Kontakten zwischen Vesikel- und Zellmembran wird jedoch nicht festgestellt. Bei einem dieser ZM-Kontakte handelt es sich womöglich um ein Exozytose-Ereignis in Form einer Ansammlung von elektronendichtem Material im EZR. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Studien [194, 236] überein, in denen eine alleinige Stimulation mit Iso ebenfalls keine auffälligen morphologischen Veränderungen aufzeigte. Dass die Aktivierung des cAMP-Signalwegs unter Stimulation mit Iso zum Anstieg der RSR führt, wurde ebenfalls bereits in früheren Studien nachgewiesen [1, 237].

Im Vergleich zur 6-minütigen Stimulation mit Iso bei IPN-Versuchen von Steppan [236] kann nach der 16-minütigen Stimulation mit Iso jedoch ein tendenzieller Anstieg des Vernetzungsgrades der RV, der durchschnittlichen Vesikeloberfläche und der durchschnittlichen Vesikelvolumina festgestellt werden, die sowohl die eRV als auch die NV betrifft. Die unveränderte Anzahl an ZM-Kontakten lässt vermuten, dass die geringe Zunahme der Speichernetzwerke und des durchschnittlichen Vesikelvolumens im mit Iso stimulierten Wildtyp für die Steigerung der RSR mit verantwortlich sein könnten.

Im Vergleich zum unstimulierten Wildtyp zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis von Vesikelvolumen zu Zytosolvolumen, was darauf hindeutet, dass in den einzelnen Zellausschnitten keine signifikante Anzahl an RV bereits vollständig

exozytiert wurden. Da laut den Hochrechnungen von Taugner et al. [232] ca. 3-5 Exozytosen pro JG-Zelle pro Minute ausreichen, um den in der vorliegenden Arbeit festgestellten Anstieg der RSR aufrechtzuerhalten, wäre es denkbar, dass eine solch geringe Abnahme des Gesamtvolumens der RV aufgrund einer natürlichen Variabilität der Messwerte in JG-Zellen nur bedingt nachgewiesen werden kann.

Studien von Kurtz und Schweda weisen darauf hin, dass in JG-Zellen der cAMP-Signalweg das Docken der Vesikel an die Zellmembran und damit die Vergrößerung der RRP's fördert [3]. Sie postulieren ebenfalls, dass RRP's eine schnelle Steigerung der RSR ermöglichen und dass die Pool-Größe für die RSR der JG-Zellen vermutlich wichtiger ist als die letzten Reifungsschritte der RV. Folglich könnten vergrößerte RRP's unter Iso-Stimulation für die schnelle Steigerung der RSR entscheidender sein als die Ausbildung großer Speichernetzwerke. In diesem Kontext könnte das Ausbleiben einer nennenswerten Zunahme von ZM-Kontakten in den betrachteten TEM-Aufnahmen auch damit erklärt werden, dass die „aktiven Zonen“, in denen sich die RV von RRP's gehäuft ansammeln, aufgrund der unvollständig dargestellten JG-Zellausschnitte eventuell nicht abgebildet wurden. Möglich wäre ebenfalls, dass die aktivierten RV unter Stimulation bevorzugt mittels „klassischer“ Exozytose sezerniert werden. Die Rekrutierung neuer RV würde folglich unter anhaltender Stimulation der Reninsekretion die Größe des RPP's lediglich aufrechterhalten, wodurch keine eindeutige Vergrößerung der RRP's beobachtet werden könnte.

5.3.2.2 16-minütige Stimulation mit EGTA

Eine 16-minütiger Stimulation des Wildtyps mit 3,1 mM EGTA, das durch die Bindung von Kalzium-Ionen eine Abnahme der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt, führt im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Iso bereits in den TEM-Aufnahmen zur deutlichen Veränderung der Vesikelmorphologie. Die RV sind verstärkt irregulär geformt und weisen einen höheren Vernetzungsgrad auf. Manche Speichernetzwerke haben zudem eine verminderte bzw. eine deutlich inhomogene Elektronendichte und werden daher in dieser Arbeit als LDV bezeichnet. Mehrere dieser Netzwerke wirken wie inhomogene Vesikel-Konglomerate, in denen unterschiedlich elektronendichte RV enthalten sind. In einem Zellausschnitt wurde zudem ein nicht vollständig abgebildetes, sehr großes rundes Vesikel beobachtet, das aufgrund seiner stark verminderten Elektronendichte als fast vollständig entleertes Speichervesikel betrachtet und als VLDV bezeichnet wird (vgl. Abb. 4.28). Trotz des hohen Vernetzungsgrades und dieses großen VLDV, sind das durchschnittliche

Volumen aller Speichervesikel, wie auch deren durchschnittliche Oberfläche deutlich geringer als beim unstimulierten und beim mit Iso stimulierten Wildtyp. Der Anteil des Vesikelvolumens am Gesamtvolumen des Zytosols ist ebenfalls erniedrigt. Der Anstieg der RSR und auch die Anzahl der ZM-Kontakte der RV unterscheiden sich hingegen nicht signifikant vom mit Iso stimulierten Wildtyp.

Dass eine starke ultrastrukturelle Veränderung der RV und ein Anstieg der RSR in mit EGTA stimulierten JG-Zellen stattfindet, wurde bereits in anderen Studien festgestellt [194, 237]. Während bei Steppan nach 6-minütiger Behandlung mit EGTA ebenfalls ein Anstieg der RSR, eine irregulärere Vesikelform und eine Zunahme des Vernetzungsgrades festgestellt wurden [236], unterscheiden sich die errechneten Messwerte jedoch. Das durchschnittliche Vesikelvolumen und die durchschnittliche Vesikeloberfläche sind in Steppans Arbeit größer als beim unstimulierten Wildtyp und als die berechneten Messwerte in der vorliegenden Arbeit. Gleichzeitig weisen die RV weniger Inhomogenität in ihrer Elektronendichte auf. Die Diskrepanz der Beobachtungen könnte auf der unterschiedlichen Stimulationsdauer beruhen. Der Anstieg des Vernetzungsgrades könnte vorübergehend zur Zunahme der durchschnittlichen Vesikelvolumina führen. Durch die teilweise Entleerung von RV im Sinne eines K&R-Mechanismus könnten bei anhaltender Stimulation die Vesikelgröße und die Elektronendichte der RV jedoch abnehmen. Die Abnahme der durchschnittlichen Vesikeloberfläche könnte damit erklärt werden, dass die in den inhomogenen LDV verstärkt vorkommenden RV-Einschlüsse in einen Abtransport bzw. einer Umverteilung der Vesikelmembranen involviert sind. Die Verminderung des prozentualen Anteils des Vesikelvolumens am Gesamtvolumen der Zelle ist ein ultrastrukturelles Korrelat der stattgefundenen Exozytosen. Es konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch keine Erklärung gefunden werden, warum der Anstieg der RSR im mit Iso stimulierten Wildtyp nicht ebenfalls zu einer prozentuellen Abnahme des Vesikelgesamtvolumens führt. Alles in allem weist die Zunahme des Vernetzungsgrades der RV, wie bereits von Steppan et al. postuliert [237], darauf hin, dass in JG-Zellen unter EGTA-Stimulation die Wahrscheinlichkeit der Fusion der Vesikel untereinander erhöht ist und die CE für den Anstieg der RSR bei unveränderter Anzahl der ZM-Kontakte entscheidend ist.

Das Vorkommen großer LDV und die Abnahme der durchschnittlichen Vesikelvolumina wiederum deuten darauf hin, dass die Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration zur vermehrten Reninausschüttung mittels des K&R-Mechanismus führen könnte.

LDV und VLDV wurden bereits in anderen Arbeiten als Hinweis auf teilweise oder fast komplett entleerte Reninspeichervesikel angesehen [194, 237]. Dass die RV mit verminderter Elektronendichte mehrheitlich keine sichtbaren ZM-Kontakte aufweisen, könnte daran liegen, dass manche dieser Vesikel nicht vollständig in den rekonstruierten Zellausschnitten abgebildet sind. Es wäre ebenso möglich, dass manche RV nach einer teilweisen oder fast vollständigen Entleerung ihres Vesikelinhaltes im Sinne eines „Reuse“ bzw. „Recycling“ zurück in das Zellinnere aufgenommen und erneut mit Vesikelmateriale beladen werden. Durch noch nicht vollständig abgeschlossene Fusionen von „neuen“ Speichervesikeln mit der „alten“ Vesikelmembran könnte dadurch ultrastrukturell vermehrt der Eindruck von inhomogenen Vesikel-Konglomeraten entstehen. Ähnliche inhomogene Vesikel-Konglomerate wurden in früheren Studien bereits in geringerer Größe und abgewandelter Form während des Reifungsprozesses von RV-V zu DCVs als Normvariante der Vesikelreifung beobachtet [38, 39]. Die Kombination von K&R und Vesikel-„Recycling“ wurde bereits in neuronalen Synapsen betrachtet und als Mechanismus postuliert, der es Vesikeln bei starker Stimulation der Sekretion ermöglichen könnte, schnell beladene Vesikel zur erneuten Sekretion zur Verfügung zu stellen, ohne Vesikel komplett neu aus den dafür benötigten Vesikelbestandteilen zusammensetzen zu müssen [218, 246, 259]. Es wäre jedoch auch möglich, dass es sich bei diesen LDV um das Resultat klassisch Clathrin-vermittelter Endozytosen handelt, die ebenfalls erneut mit Vesikelmateriale beladen werden [252]. In mehreren Arbeiten wird darüber diskutiert, welcher der beiden Mechanismen in stimulierten Zellen effizienter ist bzw. überwiegt [218, 246, 249, 260]. Dabei weisen mehrere Studien darauf hin, dass in neuronalen Synapsen eine Ca^{2+} -Erhöhung zum Überwiegen der „klassischen“ Exozytose auf Kosten des K&R-Mechanismus führt [245, 259, 261, 262], während in anderen Studien der K&R-Mechanismus zu dominieren scheint [219, 263]. Ebenso postulieren manche Arbeiten, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur verlangsamt Endozytose, vor allem größerer Speichervesikel, führt [261, 262], während wiederum andere Veröffentlichungen von einer beschleunigten Rückgewinnung der Vesikelmembranen im Rahmen des K&R-Mechanismus schreiben [263-265]. Trotz des Kalzium-Paradoxons in JG-Zellen [91, 97, 98], erscheint es daher durchaus denkbar, dass die erniedrigte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in JG-Zellen ebenfalls die Geschwindigkeit der Reninsekretion und das „Recyclen“ der Vesikel beeinflusst, wobei die LDV tendenziell auf einen K&R-Mechanismus, wenn

auch möglicherweise in abgewandelter Form, hinweisen. Das Vorkommen von inhomogenen LDV lässt zudem vermuten, dass die Stimulation mit EGTA in JG-Zellen im Vergleich zur Stimulation mit Iso generell zu einer verstärkten Rückgewinnung von Vesikelmembranen zu führen scheint.

Im Kontext des „Recycling“ von Vesikelmembranen könnten das große, abgerundete VLDV und möglicherweise auch manche inhomogenen LDV-Konglomerate auf das Vorkommen von sog. „Massen-Endozytosen“ (*bulk endocytosis*) in JG-Zellen hinweisen. Diese Endozytose-Form wurde bereits in anderen Zellarten festgestellt, die über einen längeren Zeitraum hinweg zur gesteigerten Vesikelsekretion angeregt wurden [247, 264, 266]. In bipolaren retinalen Nervenzellen wurde die Endozytose großer Zellmembraneinstülpungen als Möglichkeit postuliert, um die in diesen Zellen stattfindende, schnelle Form der Vesikelsekretion durch die Endozytose großer Mengen an Vesikelmembran aufrechterhalten zu können [267]. Diese Endozytose-Form würde auch erklären, warum das VLDV und manche inhomogene LDV scheinbar ihre typische Netzwerk-Morphologie verloren haben und stattdessen wie große rundlich geformte, riesige Speichervesikel wirken. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass die zunehmende Fusion von RV untereinander zur Abrundung großer Speichernetzwerke führen kann.

Bei dem dritten JG-Zellausschnitt, der aufgrund seiner aufgehobenen Speichervesikelstruktur nicht rekonstruiert werden konnte, weisen die benachbarten Zellen keine Anomalitäten auf und auch in dem Zellausschnitt selbst, erscheint die Zelle abgesehen vom gestörten Reninspeichersystem an sich ultrastrukturell nicht beeinträchtigt. Die Anzahl der ZM-Kontakte liegt im normalen Bereich des mit EGTA stimulierten Wildtyp und auch sonst weisen die kleinen dicht gepackten Vesikel mit variierender Elektronendichte einen ähnlichen Abstand zur Zellmembran auf wie die normalen RV in den anderen Zellausschnitten. Diese Schnittserie scheint zu bestätigen, dass eine niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration den Reifungsprozess und das Fusionsverhalten der RV untereinander beeinflusst. Über einen längeren Zeitraum scheint dies die JG-Zellen negativ beeinflussen zu können, auch wenn die RSR im Gesamten nicht beeinträchtigt ist und dies auch im Hinblick auf frühere Studien kein Regelfall zu sein scheint [194, 237].

Das in diesem dritten Zellausschnitt beobachtete Ereignis einer scheinbaren Ausschleusung eines inhomogenen Vesikel-Konglomerates könnte ein weiterer Hinweis auf das veränderte Fusionsverhalten in diesem Zellausschnitt sein. Zudem ist die

Freisetzung von elektronendichtem Material aus einem scheinbar vollständig in den EZR ausgeschleusten kleinen RV in diesem Zellausschnitt zu sehen. Taugner et al. beobachteten in ihren Studien ebenfalls Ereignisse, die sie vermuten ließen, dass Vesikelmateriale eventuell unter entsprechender Stimulation auch durch die Ausschleusung kleiner, weniger elektronendichter Vakuolen oder durch die Sequestration eines vollständigen Zellprozesses sezerniert werden könnte [232]. Jedoch konnte in den damaligen Untersuchungen wie auch in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Ereignissen auch um Artefakte, beispielsweise durch Lipidmigration post mortem, handeln könnte [232].

5.3.3 Die Cx40^{-/-}-Maus

Beim unstimulierten Cx40^{-/-} wird nur ein ZM-Kontakt beobachtet. Aufgrund dieses kleinen und einzigen JG-Zellausschnitts sind keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen diesbezüglich möglich. Die Tatsache, dass Cx40^{-/-}-Mäuse eine erhöhte basale Plasmareninkonzentration aufweisen [1, 173, 174] und sich nur eines der zwei Speichernetzwerke des beobachteten Zellausschnitts in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran befindet, lässt jedoch vermuten, dass prinzipiell vermehrt Exozytose-Ereignisse von eRV stattfinden müssten, um die erhöhte RSR aufrechtzuerhalten. Die Feststellung von Krattinger et al., dass sich in Cx40^{-/-}-Mäusen eine größere Anzahl an JG-Zellen an den Glomeruli befinden [173], könnte dies erklären, warum trotz vermehrter Exozytose-Ereignisse, insgesamt die Anzahl der Exozytosen pro JG-Zelle dem Wildtyp sehr ähnlich ist.

Während sich JG-Zellen normalerweise vor allem in der Media afferenter Arteriolen befinden [184], sind JG-Zellen bei Cx40^{-/-} im adulten Organismus vorwiegend im extraglomerulärem Mesangium und im periglomerulären Interstitium positioniert [172]. In Versuchen mit isolierten JG-Zellen konnten Kurtz et al. feststellen, dass bei JG-Zellen, der enge Kontakt zu Endothelzellen die Reninsekretion beeinflusst [2]. Bedenkt man, dass beim Cx40^{-/-} die JG-Zellen nicht ihre normale Lokalisation in den Glomeruli aufweisen, könnte dieser in Cx40^{-/-}-Mäusen möglicherweise fehlende Kontrollmechanismus auch erklären, warum die basale RSR im Vergleich zum Wildtyp tendenziell erhöht ist.

Da im Wildtyp bislang keine gerichtete Bewegung von RV zur Zellmembran festgestellt werden konnte [242] und die Zufuhr von Cytochalasin D und Lantrunculin, die das Zytoskelett inhibieren [268, 269], im Wildtyp und im Cx40^{-/-} nicht nachweislich

zu einer Veränderung der RSR führen [237], stellt sich die Frage, welcher Mechanismus den RV im Zellinneren des Cx40^{-/-} in Abwesenheit von Speichernetzwerken Zugang zur Plasmamembran ermöglicht. Es wird angenommen, dass in präsynaptischen Endungen benachbarte Vesikel mit einander verbunden sind [270] und dass die vollständige Fusion eines Vesikels dazu führt, dass das benachbarte Vesikel durch die bestehende Verbindung der Vesikel untereinander zur Zellmembran gezogen werden könnte, um den Platz des exozytierten Vesikels einzunehmen [218, 271]. Ein solcher Mechanismus könnte auch in JG-Zellen relevant sein.

5.3.3.1 16-minütige Stimulation mit Isoproterenol

Dass die 16-minütige Stimulation des Cx40^{-/-} mit 10 nM Iso zu einem ähnlichen Anstieg der RSR wie im Wildtyp führt, wurde auch bereits von Wagner et al. festgestellt [1]. Im Großen und Ganzen ähnelt die RV-Morphologie im mit Iso stimulierten Cx40^{-/-} der des mit Iso stimulierten Wildtyps. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Fehlen von Cx40 die Aktivierung des cAMP-Signalwegs offenbar nicht signifikant beeinträchtigt.

Im Vergleich zum unstimulierten Cx40^{-/-} ist ein deutlicher Anstieg des Vernetzungsgrades der RV feststellbar. Die Form der RV der drei rekonstruierten JG-Zellen des Cx40^{-/-} variiert jedoch sehr deutlich. Während der Vernetzungsgrad im Zellausschnitt 1 und 2 sehr hoch ist, mit überdurchschnittlich großen Speichernetzwerken im Zellausschnitt 1, befinden sich im Zellausschnitt 3 vorwiegend eRV. Im dritten Zellausschnitt fällt zudem eine deutlichere ultrastrukturelle Ähnlichkeit zum unstimulierten Cx40^{-/-} auf. Dies könnte auf der veränderten Lokalisation der JG-Zellen im Cx40^{-/-} und einer dadurch verursachten Beeinträchtigung der Kommunikation der JG-Zellen mit benachbarten Zellen bzw. anderer extrazellulärer Signale beruhen. Diese Beobachtungen zeigen, dass trotz der geringen Vernetzung der RV im unstimulierten Cx40^{-/-} die Bildung von Speichernetzwerken in entsprechend stimulierten JG-Zellen des Cx40^{-/-} stattfindet. Während eine Zunahme der Fusionen der RV untereinander beim Wildtyp nicht eindeutig beobachtet wird, zeigt sich beim Cx40^{-/-} deutlich, dass Iso ebenso wie EGTA die Vernetzung der RV untereinander fördert, wie dies von Stepan bereits postuliert wurde. Dies bestätigt auch, dass die CE der kurzzeitigen Maximierung der RSR dienen könnte [236].

Die Beobachtung, dass in den JG-Zellausschnitten 1 und 3 überdurchschnittlich viele Kontakte von RV mit der Zellmembran und drei mögliche Exozytose-Ereignisse

erkennbar sind, lässt sich eventuell mit der veränderten Position der JG-Zellen begründen. In den Versuchen zu isolierten JG-Zellen konnten Kurtz et al. beobachten, dass bei JG-Zellen speziell die Stimulation der RSR durch den cAMP-Signalweg durch den Kontakt zu Endothelzellen abgeschwächt wird [2]. Unterstützt wird diese These dadurch, dass der Zellausschnitt 2, der regulären Kontakt zu Endothelzellen aufweist, eine „normale“ Anzahl an ZM-Kontakten aufweist, während der Zellausschnitt 3, der am weitesten vom Lumen der afferenten Arteriole entfernt ist, die meisten ZM-Kontakte aufzeigt. Kurtz und Schweda vermuten aufgrund ihrer Studienergebnisse, dass der cAMP-Signalweg das Docken der Vesikel an die Zellmembran fördert und damit RRP's vergrößert [3]. Es wäre folglich denkbar, dass der fehlende Kontakt zu Endothelzellen unter Stimulation mit Iso zu einer deutlichen Zunahme von RRP's und damit der ZM-Kontakte führt. Dies würde erklären, warum die Zellausschnitte 1 und 3 vermehrt ZM-Kontakte und die RV auch einen geringeren Abstand zur Zellmembran aufweisen. Warum die RSR nicht stärker ansteigt als beim mit Iso stimulierten Wildtyp, könnte daran liegen, dass durch die Lokalisation der JG-Zellen Renin nicht effizient zum Lumen der afferenten Arteriole transportiert wird und im EZR verloren geht oder die RV zwar vermehrt in RRP's rekrutiert, jedoch nicht sofort sezerniert werden. Dadurch steigt die Reninplasmakonzentration womöglich im Endeffekt trotz einer ultrastrukturell beobachtbaren Zunahme an ZM-Kontakten nicht nennenswert stärker an als im Wildtyp.

5.3.3.2 16-minütige Stimulation mit EGTA

Die 16-minütige Stimulation des Cx40^{-/-} mit 3,1 mM EGTA führt im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp nicht zur Inhomogenität der RV-Elektronendichte und auch die Vesikelmorphologie ist weniger irregulär. Die durchschnittlichen Vesikelvolumina und -oberflächen unterscheiden sich nicht wesentlich von den Messwerten des unstimulierten Cx40^{-/-} und des unstimulierten Wildtyps. Es konnte zudem kein Anstieg der RSR festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Wagner et al. [1]. Die ausbleibende Stimulation der RSR durch EGTA bei Cx40^{-/-}-Mäusen in IPN-Versuchen korreliert mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Vesikelmorphologie dieses Genotyps unter EGTA-Stimulation. Der Vernetzungsgrad der RV ist im Vergleich zum mit EGTA stimulierten Wildtyp erniedrigt, im Verhältnis zum unstimulierten Knockout jedoch deutlich erhöht. Das Verhältnis vom Gesamtvolumen von RV zum Zytosol ist beim Cx40^{-/-} ähnlich niedrig wie beim mit EGTA stimulierten Wildtyp. Dies ist überraschend, da beim Cx40^{-/-}, wie

auch bereits von Wagner et al. [1] festgestellt wurde, unter EGTA-Stimulation eine Steigerung der RSR fast vollständig fehlt. Es könnte sich dabei in JG-Zellen möglicherweise um ein generelles Phänomen unter EGTA-Stimulation handeln, das nicht in direktem Zusammenhang mit der Reninsekretion steht.

Da die Leitfähigkeit von Gap Junctions durch eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration gefördert wird [272], ist nicht davon auszugehen, dass der ausbleibende Anstieg der RSR unter EGTA auf einer Entkopplung der Gap Junctions beruht [1]. Aufgrund ihrer ausführlichen Untersuchungen postulieren Wagner et al., dass Cx40 bei der Übermittlung von negativen Rückkopplungsmechanismen auf die Reninsekretion der JG-Zellen eine zentrale Rolle spielt und dass Cx40 wichtig für die Einleitung bzw. Förderung der Absenkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch eine Veränderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist [1, 273]. Diese Annahmen werden durch die ausbleibenden Veränderungen in der ultrastrukturellen Analyse in der vorliegenden Arbeit unterstützt.

Dass ein minimaler Anstieg der RSR und eine recht deutliche Zunahme des Vernetzungsgrades der RV im Vergleich zum unstimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ beobachtet werden kann, deutet darauf hin, dass es trotz der defekten Gap Junctions zu einer gewissen Weiterleitung des Signals der niedrigen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Dass dies auf einer Restfunktion der Gap Junctions oder auf anderen Membranproteinen oder Membrantransportern beruht, erscheint denkbar. Außerdem könnte das bedeuten, dass im Wildtyp ein sehr geringer Ca^{2+} -Stimulus von extrazellulär ausreicht, um die Ausbildung von Speichernetzwerken auszulösen. Da im $\text{Cx40}^{-/-}$ jedoch die Weiterleitung von Ca^{2+} -Signalen stark eingeschränkt ist, könnte dies dazu führen, dass im unstimulierten Zustand, ein womöglich vorhandenes, schwaches Signal von den JG-Zellen nicht weitergeleitet oder registriert werden kann und daher die Fusion von RV untereinander im unstimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ unterbleibt.

Auch bei dem mit EGTA stimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ sind durchschnittlich drei Kontakte zwischen Vesikel- und Zellmembran pro Zellausschnitt erkennbar, wobei bei insgesamt zwei Ereignissen aufgrund einer Verdichtung von Material im EZR von möglichen Exozytose-Ereignissen ausgegangen wird (vgl. Abb. 4.61: A-B). Da keine Steigerung der RSR im mit EGTA stimulierten $\text{Cx40}^{-/-}$ stattfindet, könnte dies bestätigen, dass es sich bei manchen ZM-Kontakten prinzipiell um aktivierte RV des RRP handelt oder dass Exozytose-Ereignisse keine vollständige Vesikelentleerung nach sich ziehen müssen.

5.4 Fazit

Die RV-Morphologie des unstimulierten Cx40^{-/-} bestätigt frühere Beschreibungen, dass die RV sich in JG-Zellen des Cx40^{-/-} vermehrt klassisch rund präsentieren. Dies deutet darauf hin, dass JG-Zellen durch extrazelluläre Signale zur Bildung von Speichernetzwerken angeregt werden und dieser Mechanismus bei Cx40^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ist. Die erhöhte basale RSR hängt möglicherweise mit der veränderten Lokalisation der JG-Zellen bei Abwesenheit von Cx40 und dadurch beeinträchtigten Rückkopplungsmechanismen wie dem Barorezeptorreflex zusammen. Da laut früherer Studien einerseits unter der Stimulation mit Iso der Kontakt von JG-Zellen mit Endothelzellen die Reninsekretion hemmt und andererseits der cAMP-Signalweg eine Vergrößerung von RRP in JG-Zellen fördert, könnte dies die stark variierende Morphologie der RV und die hohe Anzahl an ZM-Kontakten im mit Iso stimulierten Cx40^{-/-} erklären. Die Zellmorphologie beim mit EGTA stimulierten Cx40^{-/-} steht in Einklang mit dem ausbleibenden Anstieg der RSR und der Annahme, dass das Fehlen von Cx40 die Übertragung von Ca²⁺-Signalen beeinflusst. Die vom Wildtyp abweichende Morphologie und Häufigkeit von eRV und NV und das veränderte Vorkommen von LDV bestätigt ultrastrukturell, dass die Abwesenheit von Cx40 nicht nur die Reninfreisetzung, sondern auch die Reninspeicherung beeinflusst.

Alles in allem kann der Sekretionsmechanismus von RV in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Die ultrastrukturellen Beobachtungen können weder die klassisch regulierte Exozytose, noch die CE oder den K&R-Mechanismus als möglicherweise relevante Mechanismen ausschließen. Denkbar wäre, dass die „klassische“ Exozytose die basale RSR aufrechterhält, während die CE die Maximierung der RSR über ein gewisses Zeitintervall hinweg fördert. Dabei könnten unter Stimulation mit Iso die Vergrößerung der RRP und unter Stimulation mit EGTA der K&R-Mechanismus und ein verstärktes „Recyclen“ der Vesikelmembranen zum kontrollierten Anstieg der RSR beitragen. Folglich wäre davon auszugehen, dass die JG-Zellen grundsätzlich zu allen aufgeführten Exozytose-Mechanismen befähigt sind und abhängig von bestimmten intra-, inter- und extrazellulären Signalen die einzelnen Sekretionsmechanismen fördern.

Die IPN-Methode stellt eine gute Möglichkeit dar, den Einfluss verschiedenster Faktoren des Organismus auf die JG-Zellen in ihrem „normalen“ Gewebeumfeld zu untersuchen und mögliche Einflüsse durch benachbarte Strukturen, wie sie auch im lebenden Organismus stattfinden würden, zu erfassen. Auch wenn Artefakte durch

Fixierung, Kontrastmittelfärbung und Gewebeverzerrungen beim Erstellen der Ultradünnschnitte nicht nur die zwei-, sondern auch die dreidimensionale Auswertung der Daten erschweren können, eignet sich die 3D-Rekonstruktion von JG-Zellen anhand von TEM-Aufnahmen gut, um einen Gesamteindruck der Zellmorphologie zu gewinnen. Die ultrastrukturelle Betrachtung kann somit auf komplexere Zusammenhänge hinweisen.

Die Untersuchung weiterer JG-Zellausschnitte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Stimulationsarten könnte aufzeigen, ob die festgestellten morphologischen Veränderungen reproduzierbar sind. Hierbei wäre es beispielsweise interessant, ob bei der Betrachtung weiterer Zellausschnitte von mit Iso stimulierten Wildtyp-Zellen eine Häufung von ZM-Kontakten, die ultrastrukturell auf RRP's hinweisen könnten, nachgewiesen werden kann, oder ob die Lokalisation der JG-Zellen in Cx40^{-/-}-Mäusen tatsächlich die Häufigkeit von ZM-Kontakten beeinflusst.

Eine endgültige Klärung der Bedeutung der kleinen und möglicherweise auch der großen LDV könnte die Protein A-Gold-Methode kombiniert mit einem Antikörper gegen das Prosegment von Renin liefern. Eine gezielte 3D-Rekonstruktion von ZM-Kontakten in höherer elektronenmikroskopischer Auflösung könnte das Visualisieren eines K&R-Mechanismus ermöglichen und deren Existenz in JG-Zellen bestätigen oder widerlegen. Es könnte auch in Erwägung gezogen werden, Messungen der Membrankapazität und real-time Untersuchungen der Reninfreisetzung in vivo mit vergrößerter Darstellung einzelner JG-Zellen durchzuführen, um die verschiedenen Sekretionsmechanismen in JG-Zellen unterscheiden und eventuell nachweisen zu können. Ein abgewandeltes Verfahren mittels FM-Färbemitteln wie FM1-43 oder mittels Single Quantum Dots könnte ebenfalls zur Klärung beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Wagner, C., et al., *Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion*. *Circ Res*, 2007. **100**(4): p. 556-63.
2. Kurtz, A., et al., *Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1147-54.
3. Kurtz, A. and F. Schweda, *Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(4): p. F797-805.
4. Castrop, H., et al., *Physiology of kidney renin*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(2): p. 607-73.
5. Davis, J.O. and R.H. Freeman, *Mechanisms regulating renin release*. *Physiol Rev*, 1976. **56**(1): p. 1-56.
6. Bader, M., et al., *Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research*. *J Mol Med (Berl)*, 2001. **79**(2-3): p. 76-102.
7. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
8. Hackenthal, E., et al., *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion*. *Physiol Rev*, 1990. **70**(4): p. 1067-116.
9. Hall, J.E., *Historical perspective of the renin-angiotensin system*. *Mol Biotechnol*, 2003. **24**(1): p. 27-39.
10. Menard, J., et al., *Biochemistry and regulation of angiotensinogen*. *Clin Exp Hypertens A*, 1983. **5**(7-8): p. 1005-19.
11. Campbell, D.J. and J.F. Habener, *Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat*. *J Clin Invest*, 1986. **78**(1): p. 31-9.
12. Persson, P.B., A. Skälweit, and B.J. Thiele, *Controlling the release and production of renin*. *Acta Physiol Scand*, 2004. **181**(4): p. 375-81.
13. Ng, K.K. and J.R. Vane, *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. *Nature*, 1967. **216**(5117): p. 762-6.
14. Quinn, S.J. and G.H. Williams, *Regulation of aldosterone secretion*. *Annu Rev Physiol*, 1988. **50**: p. 409-26.
15. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 415-72.

16. Hall, J.E., *Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation*. Am J Physiol, 1986. **250**(6 Pt 2): p. R960-72.
17. Phillips, M.I. and C. Sumners, *Angiotensin II in central nervous system physiology*. Regul Pept, 1998. **78**(1-3): p. 1-11.
18. Kurtz, A., *Cellular control of renin secretion*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1989. **113**: p. 1-40.
19. Mercure, C., et al., *Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells*. FEBS Lett, 1998. **422**(3): p. 395-9.
20. Kurtz, A., et al., *Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors*. Am J Physiol, 1986. **250**(4 Pt 1): p. C563-71.
21. Kurtz, A. and C. Wagner, *Cellular control of renin secretion*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 3): p. 219-25.
22. Vander, A.J. and G.W. Geelhoed, *Inhibition of renin secretion by angiotensin II*. Proc Soc Exp Biol Med, 1965. **120**(2): p. 399-403.
23. Graefe, K.H., Lutz, W. K., Bönisch, H., *Duale Reihe: Pharmakologie und Toxikologie*. 2011: Georg Thieme Verlag.
24. Ganten, D., et al., *The iso-renin angiotensin systems in extrarenal tissue*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1976. **3**(2): p. 103-26.
25. Deschepper, C.F., et al., *Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7552-6.
26. Taugner, C., et al., *Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney*. Histochemistry, 1979. **62**(1): p. 19-27.
27. Wurfer, K., et al., *Interzonal and intrazonal heterogeneities in the renin status of the preglomerular arterioles in five species*. Histochemistry, 1988. **89**(3): p. 283-7.
28. Taugner, R. and E. Hackenthal, *On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells*. Int Rev Cytol, 1988. **110**: p. 93-131.
29. Bohle, A., et al., *Juxtaglomerular apparatus of the human kidney: correlation between structure and function*. Kidney Int Suppl, 1982. **12**: p. S18-23.
30. Hardman, J.A., et al., *Primary structure of the human renin gene*. DNA, 1984. **3**(6): p. 457-68.
31. Field, L.J. and K.W. Gross, *Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6196-200.

32. Holm, I., et al., *Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons*. EMBO J, 1984. **3**(3): p. 557-62.
33. Hansen, P.B., et al., *Plasma renin in mice with one or two renin genes*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(4): p. 431-7.
34. Morris, B.J., *Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing*. J Hypertens, 1992. **10**(3): p. 209-14.
35. Mullins, L.J., et al., *Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40378-84.
36. Sigmund, C.D. and K.W. Gross, *Structure, expression, and regulation of the murine renin genes*. Hypertension, 1991. **18**(4): p. 446-57.
37. Clark, A.F., et al., *Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18185-90.
38. Barajas, L., *The development and ultrastructure of the juxtaglomerular cell granule*. J Ultrastruct Res, 1966. **15**(3): p. 400-13.
39. Taugner, R. and R. Metz, *Development and fate of the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells*. Cell Tissue Res, 1986. **246**(3): p. 595-606.
40. Mercure, C., et al., *Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex*. Hypertension, 1996. **28**(5): p. 840-6.
41. Mercure, C., et al., *Cathepsin B is not the processing enzyme for mouse prorenin*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(5): p. R1212-6.
42. Neves, F.A., K.G. Duncan, and J.D. Baxter, *Cathepsin B is a prorenin processing enzyme*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 514-7.
43. Kikkawa, Y., et al., *Prorenin processing and restricted endoproteolysis by mouse tissue kallikrein family enzymes (mK1, mK9, mK13, and mK22)*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1382**(1): p. 55-64.
44. Weir, M.R. and V.J. Dzau, *The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management*. Am J Hypertens, 1999. **12**(12 Pt 3): p. 205S-213S.
45. Guyton, A.C., *Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids*. Science, 1991. **252**(5014): p. 1813-6.
46. Wagner, C. and A. Kurtz, *Regulation of renal renin release*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1998. **7**(4): p. 437-41.
47. Skinner, S.L., J.W. McCubbin, and I.H. Page, *Control of Renin Secretion*. Circ Res, 1964. **15**: p. 64-76.

48. Scholz, H. and A. Kurtz, *Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1088-94.
49. Fray, J.C., *Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney*. Am J Physiol, 1976. **231**(3): p. 936-44.
50. Carey, R.M., et al., *Biomechanical coupling in renin-releasing cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(6): p. 1566-74.
51. Ryan, M.J., K.W. Gross, and G. Hajduczuk, *Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(4): p. E823-9.
52. Scholz, H., et al., *Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys*. Pflugers Arch, 1994. **428**(2): p. 173-8.
53. Ichihara, A., J.D. Imig, and L.G. Navar, *Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 843-7.
54. Lapointe, J.Y., P.D. Bell, and J. Cardinal, *Direct evidence for apical Na⁺:2Cl⁻:K⁺ cotransport in macula densa cells*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 2): p. F1466-9.
55. Holmer, S., et al., *Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats*. Pflugers Arch, 1993. **425**(1-2): p. 62-7.
56. Skott, O. and J.P. Briggs, *Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion*. Science, 1987. **237**(4822): p. 1618-20.
57. Hocherl, K., et al., *Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(2): p. F294-301.
58. Kim, S.M., et al., *Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F415-22.
59. Castrop, H., et al., *Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(5): p. F848-57.
60. Sallstrom, J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure*. Am J Hypertens, 2008. **21**(1): p. 111-6.
61. Friis, U.G., et al., *Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(5): p. F989-97.
62. Barajas, L., *Anatomy of the juxtaglomerular apparatus*. Am J Physiol, 1979. **237**(5): p. F333-43.

63. DiBona, G.F. and U.C. Kopp, *Neural control of renal function*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(1): p. 75-197.
64. Boivin, V., et al., *Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney*. *Kidney Int*, 2001. **59**(2): p. 515-31.
65. McPherson, G.A. and R.J. Summers, *Evidence from binding studies for beta 1-adrenoceptors associated with glomeruli isolated from rat kidney*. *Life Sci*, 1983. **33**(1): p. 87-94.
66. Kim, S.M., et al., *Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors*. *Hypertension*, 2007. **50**(1): p. 103-9.
67. Golin, R., et al., *Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat*. *J Hypertens*, 2001. **19**(7): p. 1271-7.
68. Holmer, S., et al., *Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(5 Pt 2): p. F738-45.
69. Hocherl, K., et al., *Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked*. *Pflugers Arch*, 2001. **442**(6): p. 821-7.
70. Schunkert, H., et al., *Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(5 Pt 1): p. E863-9.
71. Kimura, K., et al., *Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **63**: p. S201-4.
72. Van Dongen, R. and W.S. Peart, *Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat*. *Br J Pharmacol*, 1974. **50**(1): p. 125-9.
73. Brown, R., et al., *Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. **281**(5): p. R1362-7.
74. Holdaas, H., et al., *Conditions for enhancement of renin release by isoproterenol, dopamine, and glucagon*. *Am J Physiol*, 1982. **242**(3): p. F267-73.
75. Jensen, B.L., C. Schmid, and A. Kurtz, *Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(3 Pt 2): p. F659-69.
76. Kurtz, A., et al., *Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(2): p. 538-43.
77. Suzuki, M. and S. Satoh, *Suppression of bradykinin-induced renin release by indomethacin in anesthetized rats*. *Clin Exp Hypertens A*, 1984. **6**(6): p. 1227-35.

78. Schwertschlag, U. and E. Hackenthal, *Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1982. **319**(3): p. 239-42.
79. Klar, J., H. Vitzthum, and A. Kurtz, *Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(2): p. F349-55.
80. Saussine, C., et al., *Stimulatory action of parathyroid hormone on renin secretion in vitro: a study using isolated rat kidney, isolated rabbit glomeruli and superfused dispersed rat juxtaglomerular cells*. Clin Sci (Lond), 1993. **84**(1): p. 11-9.
81. Hauger-Klevene, J.H., E. De Vito, and J.C. Fasciolo, *The effect of thyroid hormone on renin production and release by rat kidney slices*. Acta Physiol Lat Am, 1977. **27**(1): p. 37-41.
82. Todorov, V., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(5): p. R1046-51.
83. Kurtz, A., et al., *Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4769-73.
84. Pan, L., et al., *Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(1): p. F117-24.
85. Pfeilschifter, J., A. Kurtz, and C. Bauer, *Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **127**(3): p. 903-10.
86. Moe, O., et al., *Effects of endothelin on in vitro renin secretion*. Am J Physiol, 1991. **260**(4 Pt 1): p. E521-5.
87. Bunag, R.D., I.H. Page, and J.W. McCubbin, *Inhibition of renin release by vasopressin and angiotensin*. Cardiovasc Res, 1967. **1**(1): p. 67-73.
88. Vandongen, R., W.S. Peart, and G.W. Boyd, *Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney*. Circ Res, 1973. **32**(2): p. 290-6.
89. Weinberger, M.H., W. Aoi, and D.P. Henry, *Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro*. Circ Res, 1975. **37**(3): p. 318-24.
90. Chen, L., et al., *Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein G α in juxtaglomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F27-37.
91. Grunberger, C., et al., *The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6*. Circ Res, 2006. **99**(11): p. 1197-206.

92. Friis, U.G., et al., *Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases*. *Circ Res*, 2002. **90**(9): p. 996-1003.
93. Ortiz-Capisano, M.C., et al., *Adenylyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells*. *Hypertension*, 2007. **49**(3): p. 618-24.
94. Chiu, N., I. Park, and I.A. Reid, *Stimulation of renin secretion by the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **276**(3): p. 1073-7.
95. Chiu, Y.J., S.H. Hu, and I.A. Reid, *Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **290**(1): p. 16-9.
96. Ying, L., B.J. Morris, and C.D. Sigmund, *Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(4): p. 2412-20.
97. Schweda, F. and A. Kurtz, *Cellular mechanism of renin release*. *Acta Physiol Scand*, 2004. **181**(4): p. 383-90.
98. Cohen, Y., et al., *Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells?* *Am J Physiol*, 1997. **273**(3 Pt 1): p. E631-7.
99. Kurtz, A. and R. Penner, *Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(9): p. 3423-7.
100. Ortiz-Capisano, M.C., et al., *Expression and function of the calcium-sensing receptor in juxtaglomerular cells*. *Hypertension*, 2007. **50**(4): p. 737-43.
101. Maillard, M.P., et al., *Calcium-sensing receptors modulate renin release in vivo and in vitro in the rat*. *J Hypertens*, 2009. **27**(10): p. 1980-7.
102. Kurtz, A., J. Pfeilschifter, and C. Bauer, *Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?* *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. **124**(2): p. 359-66.
103. Takagi, M., et al., *Endothelin: a new inhibitor of renin release*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **157**(3): p. 1164-8.
104. Ortiz-Capisano, M.C., et al., *Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase*. *Hypertension*, 2007. **49**(1): p. 162-9.
105. Kurtz, A. and C. Wagner, *Role of nitric oxide in the control of renin secretion*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F849-62.
106. Kurtz, A., et al., *Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(8): p. 4743-7.

107. Gambaryan, S., et al., *Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 9003-8.
108. Wagner, C., et al., *Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression.* J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1576-82.
109. Leitman, D.C. and F. Murad, *Atrial natriuretic factor receptor heterogeneity and stimulation of particulate guanylate cyclase and cyclic GMP accumulation.* Endocrinol Metab Clin North Am, 1987. **16**(1): p. 79-105.
110. Schricker, K. and A. Kurtz, *Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells.* Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. F180-6.
111. Campbell, W.B. and W.L. Henrich, *Endothelial factors in the regulation of renin release.* Kidney Int, 1990. **38**(4): p. 612-7.
112. Nausch, L.W., et al., *Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 365-70.
113. Piggott, L.A., et al., *Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments.* J Gen Physiol, 2006. **128**(1): p. 3-14.
114. Bosco, D., J.A. Haefliger, and P. Meda, *Connexins: key mediators of endocrine function.* Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1393-445.
115. Edelman, G.M. and J.P. Thiery, *The Cell in contact: adhesions and junctions as morphogenetic determinants.* 1985: J. Wiley. p. 507.
116. LeRoith, D., et al., *Receptors for intercellular messenger molecules in microbes: similarities to vertebrate receptors and possible implications for diseases in man.* Experientia, 1986. **42**(7): p. 782-8.
117. Roth, J., et al., *The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers: implications for mammalian biology.* N Engl J Med, 1982. **306**(9): p. 523-7.
118. Roth, J., et al., *Evolutionary origins of neuropeptides, hormones, and receptors: possible applications to immunology.* J Immunol, 1985. **135**(2 Suppl): p. 816s-819s.
119. Ashcroft, F.M., *Ion Channels and Disease.* 1999: Elsevier Science. p. 481.
120. Bröer, S. and C. Wagner, *Membrane Transporter Diseases.* 2004: Springer US. p. 390.
121. Harris, A. and D. Locke, *Connexins: A Guide.* 2008: Humana Press. p. 573.
122. Herve, J.C., *The connexins.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1662**(1-2): p. 1-2.

123. Sohl, G. and K. Willecke, *Gap junctions and the connexin protein family*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 228-32.
124. Bennett, M.V., X. Zheng, and M.L. Sogin, *The connexins and their family tree*. Soc Gen Physiol Ser, 1994. **49**: p. 223-33.
125. Willecke, K., et al., *Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome*. Biol Chem, 2002. **383**(5): p. 725-37.
126. Hennemann, H., et al., *Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17225-33.
127. Unger, V.M., et al., *Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1176-80.
128. Foote, C.I., et al., *The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions*. J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 1187-97.
129. Krutovskikh, V. and H. Yamasaki, *Connexin gene mutations in human genetic diseases*. Mutat Res, 2000. **462**(2-3): p. 197-207.
130. Yeager, M. and B.J. Nicholson, *Structure of gap junction intercellular channels*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(2): p. 183-92.
131. Laird, D.W., *Life cycle of connexins in health and disease*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 3): p. 527-43.
132. Purves, D., et al., *Neuroscience (3rd Edition)*. 2004, Sinauer Associates: Sunderland, MA. p. 95.
133. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2009: Elsevier, Urban & Fischer.
134. Falk, M.M., et al., *Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2703-16.
135. Rash, J.E., T. Yasumura, and F.E. Dudek, *Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord*. Cell Biol Int, 1998. **22**(11-12): p. 731-49.
136. Mathias, R.T., T.W. White, and X. Gong, *Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 179-206.
137. Ahmad, S., et al., *Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels*. Biochem J, 1999. **339** (Pt 2): p. 247-53.
138. Lawrence, T.S., W.H. Beers, and N.B. Gilula, *Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication*. Nature, 1978. **272**(5653): p. 501-6.

139. Goldberg, G.S., P.D. Lampe, and B.J. Nicholson, *Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. 457-9.
140. Goldberg, G.S., A.P. Moreno, and P.D. Lampe, *Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36725-30.
141. Nicholson, B.J., et al., *The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(4): p. 369-78.
142. Spray, D.C., A.L. Harris, and M.V. Bennett, *Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH*. Science, 1981. **211**(4483): p. 712-5.
143. Rose, B., I. Simpson, and W.R. Loewenstein, *Calcium ion produces graded changes in permeability of membrane channels in cell junction*. Nature, 1977. **267**(5612): p. 625-7.
144. Spray, D.C., A.L. Harris, and M.V. Bennett, *Voltage dependence of junctional conductance in early amphibian embryos*. Science, 1979. **204**(4391): p. 432-4.
145. Harris, A.L., D.C. Spray, and M.V. Bennett, *Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance*. J Gen Physiol, 1981. **77**(1): p. 95-117.
146. Dhein, S., *Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 287-98.
147. Srinivas, M., M.G. Hopperstad, and D.C. Spray, *Quinine blocks specific gap junction channel subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10942-7.
148. Herve, J.C. and D. Sarrouilhe, *Connexin-made channels as pharmacological targets*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(15): p. 1941-58.
149. Saez, J.C., et al., *Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1711**(2): p. 215-24.
150. Spray, D.C., Z.C. Ye, and B.R. Ransom, *Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal*. Glia, 2006. **54**(7): p. 758-73.
151. Pfenniger, A., A. Wohlwend, and B.R. Kwak, *Mutations in connexin genes and disease*. Eur J Clin Invest, 2011. **41**(1): p. 103-16.
152. Zoidl, G. and R. Dermietzel, *Gap junctions in inherited human disease*. Pflugers Arch, 2010. **460**(2): p. 451-66.
153. Haefliger, J.A., P. Nicod, and P. Meda, *Contribution of connexins to the function of the vascular wall*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 345-56.
154. Potolicchio, I., et al., *Connexin-dependent signaling in neuro-hormonal systems*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 1919-36.

155. Kurtz, A., *Renin release: sites, mechanisms, and control*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 377-99.
156. Chanson, M., et al., *Interactions of connexins with other membrane channels and transporters*. Prog Biophys Mol Biol, 2007. **94**(1-2): p. 233-44.
157. Li, X., et al., *Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(5): p. 485-98.
158. Olk, S., G. Zoidl, and R. Dermietzel, *Connexins, cell motility, and the cytoskeleton*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. **66**(11): p. 1000-16.
159. Iacobas, D.A., et al., *Sensitivity of the brain transcriptome to connexin ablation*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1711**(2): p. 183-96.
160. Yamasaki, H. and C.C. Naus, *Role of connexin genes in growth control*. Carcinogenesis, 1996. **17**(6): p. 1199-213.
161. Fushiki, S., et al., *Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(3): p. 304-14.
162. Reaume, A.G., et al., *Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1831-4.
163. Buhle, C.P., et al., *The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 2**: p. S383-93.
164. Mink, D., et al., *Interendothelial junctions in kidney vessels*. Cell Tissue Res, 1984. **236**(3): p. 567-76.
165. Taugner, R., H. Kirchheim, and W.G. Forssmann, *Myoendothelial contacts in glomerular arterioles and in renal interlobular arteries of rat, mouse and Tupaia belangeri*. Cell Tissue Res, 1984. **235**(2): p. 319-25.
166. Taugner, R., et al., *Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft*. Cell Tissue Res, 1978. **186**(2): p. 279-85.
167. Kurtz, L., et al., *Connexin expression in renin-producing cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(3): p. 506-12.
168. Arensbak, B., et al., *Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles*. Histochem Cell Biol, 2001. **115**(6): p. 479-87.
169. Gustafsson, F., et al., *Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries*. Histochem Cell Biol, 2003. **119**(2): p. 139-48.
170. Haefliger, J.A., et al., *Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension*. Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 190-201.

171. Wagner, C., *Function of connexins in the renal circulation*. *Kidney Int*, 2008. **73**(5): p. 547-55.
172. Kurtz, L., et al., *Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(4): p. 1103-11.
173. Krattinger, N., et al., *Connexin40 regulates renin production and blood pressure*. *Kidney Int*, 2007. **72**(7): p. 814-22.
174. de Wit, C., et al., *Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion*. *Physiol Genomics*, 2003. **13**(2): p. 169-77.
175. Alonso, F., et al., *Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and eNOS levels in the mouse aorta*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(5): p. H1365-73.
176. Alonso, F., et al., *An angiotensin II- and NF-kappaB-dependent mechanism increases connexin 43 in murine arteries targeted by renin-dependent hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2010. **87**(1): p. 166-76.
177. Le Gal, L., et al., *Restoration of connexin 40 (Cx40) in Renin-producing cells reduces the hypertension of Cx40 null mice*. *Hypertension*, 2014. **63**(6): p. 1198-204.
178. Wagner, C., et al., *Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension*. *Kidney Int*, 2010. **78**(8): p. 762-8.
179. Yao, J., et al., *ATP-dependent mechanism for coordination of intercellular Ca²⁺ signaling and renin secretion in rat juxtaglomerular cells*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 338-45.
180. Peti-Peterdi, J., *Calcium wave of tubuloglomerular feedback*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(2): p. F473-80.
181. Schweda, F., et al., *Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension*. *Kidney Int*, 2009. **75**(5): p. 482-9.
182. Simon, A.M. and A.R. McWhorter, *Decreased intercellular dye-transfer and downregulation of non-ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin37 or connexin40*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 11): p. 2223-36.
183. Haefliger, J.A., et al., *Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(2): p. 405-13.
184. Kon, Y., *Comparative study of renin-containing cells. Histological approaches*. *J Vet Med Sci*, 1999. **61**(10): p. 1075-86.
185. Elias, L.A., D.D. Wang, and A.R. Kriegstein, *Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex*. *Nature*, 2007. **448**(7156): p. 901-7.

186. Burgess, T.L. and R.B. Kelly, *Constitutive and regulated secretion of proteins*. *Annu Rev Cell Biol*, 1987. **3**: p. 243-93.
187. Kelly, R.B., *Pathways of protein secretion in eukaryotes*. *Science*, 1985. **230**(4721): p. 25-32.
188. Thureson-Klein, A., *Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals*. *Neuroscience*, 1983. **10**(2): p. 245-59.
189. Kelly, R.B., *Storage and release of neurotransmitters*. *Cell*, 1993. **72 Suppl**: p. 43-53.
190. Morgan, A. and R.D. Burgoyne, *Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse*. *Semin Cell Dev Biol*, 1997. **8**(2): p. 141-9.
191. Lindau, M. and B.D. Gomperts, *Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1071**(4): p. 429-71.
192. Friis, U.G., et al., *Exocytosis and endocytosis in juxtaglomerular cells*. *Acta Physiol Scand*, 2000. **168**(1): p. 95-9.
193. Taugner, R., et al., *Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms*. *Contrib Nephrol*, 1984. **43**: p. 76-101.
194. Ogawa, K., M. Yamasato, and K. Taniguchi, *Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys*. *Anat Rec*, 1995. **243**(3): p. 336-46.
195. Skott, O., *Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles*. *Pflugers Arch*, 1986. **407**(1): p. 41-5.
196. Fasshauer, D., *Structural insights into the SNARE mechanism*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1641**(2-3): p. 87-97.
197. Sollner, T., et al., *A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 409-18.
198. Sollner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. *Nature*, 1993. **362**(6418): p. 318-24.
199. McNew, J.A., et al., *Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 153-9.
200. Parlati, F., et al., *Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 194-8.
201. Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(9): p. 631-43.
202. Pevsner, J., et al., *Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex*. *Neuron*, 1994. **13**(2): p. 353-61.

203. Sudhof, T.C., *Synaptotagmins: why so many?* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7629-32.
204. Burgoyne, R.D. and A. Morgan, *Calcium sensors in regulated exocytosis*. Cell Calcium, 1998. **24**(5-6): p. 367-76.
205. Pickett, J.A. and J.M. Edwardson, *Compound exocytosis: mechanisms and functional significance*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 109-16.
206. Lollike, K., et al., *Compound exocytosis of granules in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(6): p. 973-80.
207. Ichikawa, A., *Fine Structural Changes in Response to Hormonal Stimulation of the Perfused Canine Pancreas*. J Cell Biol, 1965. **24**: p. 369-85.
208. Nemoto, T., et al., *Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 253-8.
209. Alvarez de Toledo, G. and J.M. Fernandez, *Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells*. J Gen Physiol, 1990. **95**(3): p. 397-409.
210. Bokvist, K., et al., *Compound exocytosis in voltage-clamped mouse pancreatic beta-cells revealed by carbon fibre amperometry*. Pflugers Arch, 2000. **439**(5): p. 634-45.
211. Scepek, S. and M. Lindau, *Focal exocytosis by eosinophils--compound exocytosis and cumulative fusion*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 1811-7.
212. Behrendorff, N., et al., *Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 29627-34.
213. Thorn, P. and H. Gaisano, *Molecular control of compound Exocytosis: A key role for VAMP8*. Commun Integr Biol, 2012. **5**(1): p. 61-3.
214. Ceccarelli, B., W.P. Hurlbut, and A. Mauro, *Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction*. J Cell Biol, 1973. **57**(2): p. 499-524.
215. Fesce, R., et al., *Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?* Trends Cell Biol, 1994. **4**(1): p. 1-4.
216. Elhamdani, A., F. Azizi, and C.R. Artalejo, *Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion*. J Neurosci, 2006. **26**(11): p. 3030-6.
217. Tsuboi, T., H.T. McMahon, and G.A. Rutter, *Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47115-24.

218. Alabi, A.A. and R.W. Tsien, *Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 393-422.
219. Artalejo, C.R., et al., *Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca²⁺, GTP, and dynamin but not clathrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8328-32.
220. Galas, M.C., et al., *Presence of dynamin--syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells*. J Neurochem, 2000. **75**(4): p. 1511-9.
221. Marks, M.S. and M.C. Seabra, *The melanosome: membrane dynamics in black and white*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 738-48.
222. Peters, P.J., et al., *Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1099-109.
223. Peters, P.J., et al., *Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 669-76.
224. Paumet, F., et al., *Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5850-7.
225. Guo, Z., C. Turner, and D. Castle, *Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells*. Cell, 1998. **94**(4): p. 537-48.
226. Blott, E.J. and G.M. Griffiths, *Secretory lysosomes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(2): p. 122-31.
227. Griffiths, G.M., *Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(9): p. 329-32.
228. Soltesz, B.M., S. Gomba, and M. Szokol, *Lysosomal enzymes in the juxtaglomerular cell granules*. Experientia, 1979. **35**(4): p. 533-4.
229. Taugner, R., et al., *Are the renin-containing granules of juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes?* Cell Tissue Res, 1985. **239**(3): p. 575-87.
230. Jensen, B.L., et al., *Giant renin secretory granules in beige mouse renal afferent arterioles*. Cell Tissue Res, 1997. **288**(2): p. 399-406.
231. Ozaki, K., et al., *Chediak-Higashi syndrome in rats: light and electron microscopical characterization of abnormal granules in beige rats*. J Comp Pathol, 1994. **110**(4): p. 369-79.

232. Taugner, R., C.P. Buhrle, and R. Nobiling, *Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice*. Cell Tissue Res, 1984. **237**(3): p. 459-72.
233. Peter, S., *Ultrastructural studies on the secretory process in the epithelioid cells of the juxtaglomerular apparatus*. Cell Tissue Res, 1976. **168**(1): p. 45-53.
234. Kon, Y., et al., *An immunoelectron-microscopical observation of mouse juxtaglomerular cells in the case of experimental hydronephrosis*. Acta Anat (Basel), 1992. **144**(4): p. 354-62.
235. Rasch, R., et al., *Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system*. Cell Tissue Res, 1998. **292**(3): p. 563-71.
236. Steppan, D., *Strukturelle Analyse der Reninfreisetzung in juxtaglomerulären Epitheloidzellen [Dissertation]*. Regensburg: Universität Regensburg, 2012. Verfügbar unter: <http://epub.uni-regensburg.de/26817/>.
237. Steppan, D., et al., *Structural analysis suggests that renin is released by compound exocytosis*. Kidney Int, 2013. **83**(2): p. 233-41.
238. Lacasse, J., et al., *Immunocytochemical localization of renin in juxtaglomerular cells*. J Histochem Cytochem, 1985. **33**(4): p. 323-32.
239. Skott, O. and R. Taugner, *Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules*. Cell Tissue Res, 1987. **249**(2): p. 325-9.
240. Li, H., et al., *Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1019-30.
241. Friis, U.G., et al., *Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells*. Circ Res, 1999. **84**(8): p. 929-36.
242. Peti-Peterdi, J., et al., *Real-time imaging of renin release in vitro*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(2): p. F329-35.
243. Guo, J., et al., *A Monte Carlo simulation dissecting quantal release at the calyx of Held*. Front Biosci (Landmark Ed), 2015. **20**: p. 1079-91.
244. Alvarez de Toledo, G., R. Fernandez-Chacon, and J.M. Fernandez, *Release of secretory products during transient vesicle fusion*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 554-8.
245. Gandhi, S.P. and C.F. Stevens, *Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 607-13.
246. Zhang, Q., Y. Li, and R.W. Tsien, *The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles*. Science, 2009. **323**(5920): p. 1448-53.

247. Smith, S.M., R. Renden, and H. von Gersdorff, *Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval*. Trends Neurosci, 2008. **31**(11): p. 559-68.
248. Fulop, T., S. Radabaugh, and C. Smith, *Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells*. J Neurosci, 2005. **25**(32): p. 7324-32.
249. Harata, N.C., A.M. Aravanis, and R.W. Tsien, *Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion*. J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1546-70.
250. Taraska, J.W., et al., *Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2070-5.
251. Ryan, G.B., et al., *Ultrastructural morphology of granule release from juxtaglomerular myoepithelioid and peripolar cells*. Kidney Int Suppl, 1982. **12**: p. S3-8.
252. Heuser, J.E. and T.S. Reese, *Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction*. J Cell Biol, 1973. **57**(2): p. 315-44.
253. Sorensen, J.B., *Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles*. Pflugers Arch, 2004. **448**(4): p. 347-62.
254. Elmqvist, D. and D.M. Quastel, *A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle*. J Physiol, 1965. **178**(3): p. 505-29.
255. Bratanova-Tochkova, T.K., et al., *Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S83-90.
256. Schikorski, T. and C.F. Stevens, *Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses*. J Neurosci, 1997. **17**(15): p. 5858-67.
257. Zavagli, G., A. Aleotti, and A. Farinelli, *Human renin granules: ultrastructural aspects*. Nephron, 1983. **33**(1): p. 29-33.
258. King, J.A., D.J. Lush, and J.C. Fray, *Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 1): p. C305-20.
259. Richards, D.A., *Regulation of exocytic mode in hippocampal neurons by intrabouton calcium concentration*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 24): p. 4927-36.
260. Rizzoli, S.O. and R. Jahn, *Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles*. Traffic, 2007. **8**(9): p. 1137-44.
261. Leitz, J. and E.T. Kavalali, *Ca²⁺(+) influx slows single synaptic vesicle endocytosis*. J Neurosci, 2011. **31**(45): p. 16318-26.

-
262. Hsu, S.F. and M.B. Jackson, *Rapid exocytosis and endocytosis in nerve terminals of the rat posterior pituitary*. J Physiol, 1996. **494 (Pt 2)**: p. 539-53.
263. Ales, E., et al., *High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism*. Nat Cell Biol, 1999. **1(1)**: p. 40-4.
264. Perissinotti, P.P., B. Giugovaz Tropper, and O.D. Uchitel, *L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction*. Eur J Neurosci, 2008. **27(6)**: p. 1333-44.
265. Klingauf, J., E.T. Kavalali, and R.W. Tsien, *Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses*. Nature, 1998. **394(6693)**: p. 581-5.
266. Clayton, E.L., G.J. Evans, and M.A. Cousin, *Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation*. J Neurosci, 2008. **28(26)**: p. 6627-32.
267. Paillart, C., et al., *Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse*. J Neurosci, 2003. **23(10)**: p. 4092-9.
268. Spector, I., et al., *Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells*. Science, 1983. **219(4584)**: p. 493-5.
269. Goddette, D.W. and C. Frieden, *Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D*. J Biol Chem, 1986. **261(34)**: p. 15974-80.
270. Siksou, L., et al., *Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix*. J Neurosci, 2007. **27(26)**: p. 6868-77.
271. Park, H., Y. Li, and R.W. Tsien, *Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode*. Science, 2012. **335(6074)**: p. 1362-6.
272. Peracchia, C., *Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1662(1-2)**: p. 61-80.
273. Michon, L., et al., *Involvement of gap junctional communication in secretion*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1719(1-2)**: p. 82-101.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems.....	9
Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Gefäßpols mit juxtaglomerulärem Apparat	11
Abb. 2.3: Intrazelluläre Signalwege zur Regulation der Reninsekretion	16
Abb. 2.4: Räumliche Proteinstruktur eines Connexins.....	19
Abb. 2.5: Modell einer Gap Junction.....	19
Abb. 2.6: Connexon- und Gap Junction-Kanal-Varianten.....	20
Abb. 2.7: „Klassische“ Exozytose versus Compound-Exozytose.....	24
Abb. 4.1: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	43
Abb.4.2: Beispiele für die dreidimensionale Rekonstruktion von einfachen Reninspeichervesikeln.....	44
Abb.4.3: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit scheinbaren Reninspeichervesikel-Fusionen (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)	44
Abb. 4.4: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Netzwerken	45
Abb. 4.5: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Netzwerken	46
Abb. 4.6: Beispiele für die 3D-Rekonstruktion von kleinen Reninspeichervesikel-Netzwerken.....	46
Abb. 4.7: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit Renin-haltigen Low-Density-Vesikeln (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	47
Abb. 4.8: Beispiel einer TEM-Aufnahme eines JG-Zellausschnittes mit Reninspeichervesikel-Vorstufen (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	47
Abb. 4.9: Beispiele von TEM-Aufnahmen von JG-Zellausschnitten mit inhomogen elektronendichten Vesikeln (3800x).....	48
Abb. 4.10: Beispiel für die dreidimensionale Rekonstruktion von Reninspeichervesikel-Vorstufen (RV-V) und inhomogen elektronendichten Vesikeln	48

Abb. 4.11: Beispiel einer TEM-Aufnahme einer JG-Zelle mit einem Reninspeichervesikel-Netzwerk mit Einschlüssen (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x).....	49
Abb. 4.12: Beispiel für die dreidimensionale Rekonstruktion eines Reninspeichervesikels mit Einschlüssen	49
Abb. 4.13: TEM-Aufnahme des rekonstruierten JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)	51
Abb. 4.14: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x) .	52
Abb. 4.15: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x) .	52
Abb. 4.16: Dreidimensionale Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)	53
Abb. 4.17: IPN-Protokoll der Stimulation einer Wildtyp-Niere mit Isoproterenol	55
Abb. 4.18: IPN-Protokoll der Stimulation einer Wildtyp-Niere mit EGTA	55
Abb. 4.19: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	56
Abb. 4.20: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	57
Abb. 4.21: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	58
Abb. 4.22: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	59
Abb. 4.23: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	60
Abb. 4.24: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	61
Abb. 4.25: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x)	62
Abb. 4.26: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	65
Abb. 4.27: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	66
Abb. 4.28: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 2.2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	67
Abb. 4.29: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Wildtyps	68

Abb. 4.30: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	69
Abb. 4.31: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2.1 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	70
Abb. 4.32: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2.2 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	71
Abb. 4.33: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x)	71
Abb. 4.34: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts (Cx40-Knockout, unstimuliert, 3800x)	73
Abb. 4.35: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts (CX40-Knockout, unstimuliert, 3800x)	74
Abb. 4.36: IPN-Protokoll der Stimulation einer Cx40-Knockout-Niere mit Isoproterenol	76
Abb. 4.37: IPN-Protokoll der Stimulation einer Cx40-Knockout-Niere mit EGTA.....	76
Abb. 4.38: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x).....	77
Abb. 4.39: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x).....	78
Abb. 4.40: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x).....	79
Abb. 4.41: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)	81
Abb. 4.42: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)	82
Abb. 4.43: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)	83
Abb. 4.44: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	84
Abb. 4.45: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	85
Abb. 4.46: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	86
Abb. 4.47: TEM-Aufnahme des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	87

Abb. 4.48: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Cx40-Knockouts.....	88
Abb. 4.49: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)	91
Abb. 4.50: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 2 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)	92
Abb. 4.51: 3D-Rekonstruktion des JG-Zellausschnitts 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)	93
Abb. 4.52: TEM-Aufnahme mit Kontakt zwischen Vesikelmembran und Zellmembran im Zellausschnitt 1 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)	95
Abb. 4.53: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Vesikelmembran und Zellmembran des Zellausschnitts 2 (Wildtyp, unstimuliert, 3800x)	95
Abb. 4.54: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Wildtyp, Stimulation mit Iso, 3800x).....	96
Abb. 4.55: TEM-Aufnahme mit möglichem Exozytose-Ereignis im Zellausschnitt 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x).....	97
Abb. 4.56: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran im Zellausschnitt 1 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)	98
Abb. 4.57: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran im Zellausschnitt 3 (Cx40-Knockout, Stimulation mit Iso, 3800x)	99
Abb. 4.58: 3D-Darstellung von Reninspeichervesikeln mit Zellmembran-Kontakten (Stimulation mit Isoproterenol, 3800x)	100
Abb. 4.59: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	101
Abb. 4.60: TEM-Aufnahmen des JG-Zellausschnitts 3 (Wildtyp, Stimulation mit EGTA, 3800x).....	102
Abb. 4.61: TEM-Aufnahmen mit Kontakten zwischen Reninspeichervesikeln und der Zellmembran (Cx40-Knockout, Stimulation mit EGTA, 3800x)	103
Abb. 4.62: 3D-Darstellung von Reninspeichervesikeln mit Zellmembran-Kontakten (Stimulation mit EGTA, 3800x)	104

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Wildtyps	63
Tab. 2: Volumen- und Oberflächenberechnungen der rekonstruierten JG-Zellausschnitte des Cx40 ^{-/-}	87
Tab. 3: Übersicht - Beobachtete Kontakte von Reninspeichervesikeln mit der Zellmembran in JG-Zellen	94

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
D	Dalton
eV	Elektronenvolt
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l, L	Liter
m	Meter
min (')	Minute(n)
s	Sekunde(n)

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

²	Quadrat
³	Kubik
k	kilo (1x10 ³)
m	milli (1x10 ⁻³)
µ	micro (1x10 ⁻⁶)
n	nano (1x10 ⁻⁹)
p	pico (1x10 ⁻¹²)
f	femto (1x10 ⁻¹⁵)

Chemische und biologische Größen und Einheiten

I.E.	internationale Einheit
------	------------------------

M	Molar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
<u>Sonstige</u>	
%	Prozent
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AT ₁ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
AT ₄ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 4
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Compound-Exozytose
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase II
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cx	Connexin
Cx40	Connexin 40
Cx40 ^{+/+}	Wildtyp
Cx40 ^{-/-}	Connexin 40-Knockout
DAG	Diacylglycerol
DCV	Dense-Core-Vesikel
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum

eRV	einzelnes, „klassisches“ Reninspeichervesikel
etc.	et cetera
et al.	und andere (et alii)
EZR	Extrazellulärraum
GC	Guanylatcyclase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest.}	zweifach entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPN	isoliert perfundierte Niere
Iso	Isoproterenol
IV	inhomogen elektronendichtes Vesikel
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JG-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
K&R	Kiss and Run
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDV	Low-Density-Vesikel
LYST	Lysosomal trafficking protein
LYST ^{-/-}	Lysosomal trafficking protein-Knockout
MD	Macula densa
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Cotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
NV	Reninspeichervesikel-Netzwerk
OD	äußerer Röhren-Durchmesser
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase

PDE-3	Phosphodiesterase 3
pGC	membrangebundene Guanylatcyclase
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RRP	Readily Releasable Pool
RSR	Reninsekretionsrate
RV	Reninspeichervesikel
RV-V	Reninspeichervesikel-Vorstufe/n
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SL	Sekretorisches Lysosom
SNARE	soluble NSF-attachment receptor
sog.	sogenannte/r/s/n
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie, transmissionselektronenmikroskopisch
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)amino-methan
vgl.	vergleiche
VLDV	Very-Low-Density-Vesikel
z.B.	zum Beispiel
ZM	Zellmembran

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die in den letzten Jahren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank geht zuallererst an meinen Doktorvater Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe dieses Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und Geräte und sein stetiges Interesse. Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Besonders dankbar bin ich auch meinem Betreuer Dr. Dominik Steppan für die fachliche Anleitung, die kompetente Betreuung in Theorie und Praxis und für seine großzügige Hilfsbereitschaft. Während der gesamten Bearbeitungszeit stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hatte trotz meiner vielen Fragen immer ein offenes Ohr für mich. Auch für das wiederholte und stets zügige Durchlesen meiner Arbeit und für sein konstruktives Feedback bin ich äußerst dankbar. Du hast wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können. Vielen Dank für alles!

Mein weiterer Dank gilt Anita Zügner und dem gesamten Team des Lehrstuhl Physiologie I der Universität Regensburg, ohne deren fachliche Kompetenz und technische Unterstützung ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Großer Dank gilt auch Dr. Björn Neubauer, der mich ebenfalls bei inhaltlichen und fachlichen Fragen immer kompetent beraten hat. Für die fortwährende, stets unkomplizierte und spontane Unterstützung bei Fragen und Herausforderungen aller Art danke ich Euch allen!

Danke auch an Elina Benkowitsch, die mir Prof. Dr. Armin Kurtz als Doktorvater empfohlen hat und mich, nicht nur während meiner Dissertation, sondern über mein gesamtes Medizinstudium hinweg, anhaltend moralisch unterstützt hat. Ihre zahlreichen guten Ratschläge und hilfreichen Tipps haben meine Studienzeit oft erleichtert und positiv beeinflusst. Dadurch hat sie mir über so manchen Alltagsfrust hinweggeholfen. Vielen Dank für deine Hilfe und deine Freundschaft!

Meinem Vater, Michael Ringer und Christoph Weber möchte ich neben Dominik und Björn für ihre fachlichen Ratschläge zur Bildbearbeitung und zu Datei-Formaten danken. Meiner zeitweisen „Leidensgenossin“ Nina Höchstetter danke ich für die Gespräche, die die teilweise eintönige Bildauswertung erleichterte. Für jedwede moralische Unterstützung von Seiten meiner Freunde bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Ohne Euch und Eure vorbehaltlose Unterstützung und Geduld mit mir, nicht nur während dem Erstellen dieser Arbeit, sondern auch während meines gesamten Studiums, wäre Vieles nicht möglich gewesen. Ihr seid stets auf meiner Seite. Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen!

Erklärung

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

Regensburg, 04.09.2017

Maria Heidrun Scheid