

**Charakterisierung perivaskulärer Renin-bildender
Zellen in Abhängigkeit von der Salzdiät in
Aldosteronsynthese Knockout Mäusen**



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Ilona Schwarzensteiner

aus

Straubing

im Jahr

2015

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von November 2011 bis März 2015 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:	31.03.2015
Die Arbeit wurde angeleitet von:	Herr Prof. Dr. med. Armin Kurtz
Prüfungskommission:	
Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Sterner
1. Prüfer:	Herr Prof. Dr. med. Armin Kurtz
2. Prüfer:	Herr Prof. Dr. med. Richard Warth
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

Unterschrift:

Inhalt

1. Einleitung	3
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	3
1.2 Renin.....	4
1.3 Bildungsorte von Renin.....	6
1.3.1 Die juxtaglomeruläre Zelle	7
1.3.2 Weitere Renin-produzierende Zellen.....	8
1.3.3 Organkontrolle der Reninexpression und -sekretion	9
1.3.3.1 Sympathisches Nervensystem.....	9
1.3.3.2 Angiotensin II.....	9
1.3.3.3 Aldosteron	10
1.3.4 Zelluläre Regulation der Reninexpression und -sekretion	11
1.3.4.1 cAMP und Proteinkinase A	11
1.3.4.2 cGMP	12
1.3.4.3 Kalzium und Proteinkinase C.....	12
1.4 Entwicklung der Reninzellen.....	13
1.5 Plastizität der Reninexpression und -sekretion in der adulten Niere.....	15
1.5.1 Blutdruck	15
1.5.2 Modulatoren der Plastizität Renin-bildender Zellen	15
1.5.2.1 Connexin 40	15
1.5.2.2 Akrlb7	17
1.5.2.3 Prostanoiden und Cyclooxygenase-2.....	17
1.5.3 Salzaufnahme.....	18
1.5.4 Genetische RAAS-Defekte	19
1.6 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Puffer und Reagenzien	25
2.2 Versuchstiere	28
2.2.1 Verwendete Mauslinien	28
2.2.2 Genotypisierung der Mauslinien.....	30
2.3 Salzdiäten.....	32
2.4 Retrograde arterielle Perfusion	33
2.5 Immunhistochemische Methoden	34
2.5.1 Paraffin-Einbettung.....	34
2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung	34

2.5.3 TUNEL Färbung	36
2.6 Mikroskopie	37
2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie	37
2.6.2 Konfokale Mikroskopie.....	37
2.6.3 Bestimmung der präglomerulären GFP-, Renin- und Cx40-positiven Flächen	38
2.6.4 Bestimmung der Zellkerndichte.....	38
2.7 Molekularbiologische Methoden	38
2.7.1 Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration	38
2.7.1.1 Blutentnahme.....	38
2.7.1.2 Radioimmunoassay (RIA)	39
2.7.1.3 Isoliert-perfundierte Niere (IPN)	39
2.7.2 Bestimmung der Renin mRNA-Konzentration	40
2.7.2.1 Isolierung renaler mRNA.....	40
2.7.2.2 Quantifizierung der mRNA	41
2.7.2.3 cDNA Synthese	41
2.7.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR	41
2.7.3 Quantitative Bestimmung der Renin-Proteinmenge	42
2.7.3.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Gesamtproteinmenge.....	42
2.7.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	42
2.7.3.3 Immunmarkierung der Reninproteinbanden	43
2.8 Statistik.....	43
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Änderung der Reninexpression und -sekretion in Abhängigkeit von der Salzdiät.....	45
3.1.1 Renin mRNA Expression	45
3.1.2 Plasma-Renin-Konzentration	45
3.1.3 Immunhistochemische Färbung	47
3.1.4 Bestimmung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder.....	48
3.1.5 Quantitative Bestimmung des Reninproteins	48
3.2 Mit Renin koregulierte Gene in der Niere	50
3.2.1 Connexin 40	50
3.2.2 Aldose-Ketose-Reduktase 1b7	54
3.2.3 Cyclooxygenase-2	56
3.3 Stimulierbarkeit der mRNA-Expression und der Reninsekretion nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression.....	59
3.3.1 Reinduzierbarkeit der Renin-, Cx40- und Akr1b7-Genexpression	59
3.3.2 Reinduzierbarkeit der Reninsekretion	61

3.4 Die Rolle von Zellproliferation und Apoptose bei der salzindu-zierten Änderung der Reninexpression.....	64
3.4.1 Die Reninzelllinie	64
3.4.1.1 Grün-fluoreszierendes Protein (GFP).....	64
3.4.1.2 R26R-Confetti.....	69
3.4.2 Zellproliferations- und Apoptoseassays	71
3.4.3 Bestimmung der Zellkerndichte.....	73
4. Diskussion	75
4.1 Änderung der Reninexpression und -sekretion in Abhängigkeit von der Salzdiät.....	76
4.2 Änderung der Expression von mit Renin koregulierten Genen in der Niere.....	78
4.3 Stimulierbarkeit von Renin und mit Renin koregulierten Genen nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression.....	83
4.4 Rolle von Zellproliferation und Apoptose bei der salzbedingten Änderung der Reninexpression.....	85
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	92
7. Anhang.....	108
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	108
7.2 Kongressbeiträge	110
7.3 Publikationen.....	111
7.3.1 Veröffentlichte Publikationen	111
7.3.2 Eingereichte Publikationen	111
7.4 Eidesstattliche Erklärung	112
8. Danksagung.....	113

1. Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) steuert den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers und wirkt dadurch regulierend auf den Blutdruck. Das Substrat dieses Systems stellt Angiotensinogen dar, ein α -Glykoprotein, das in der Leber gebildet wird. Von ihm wird

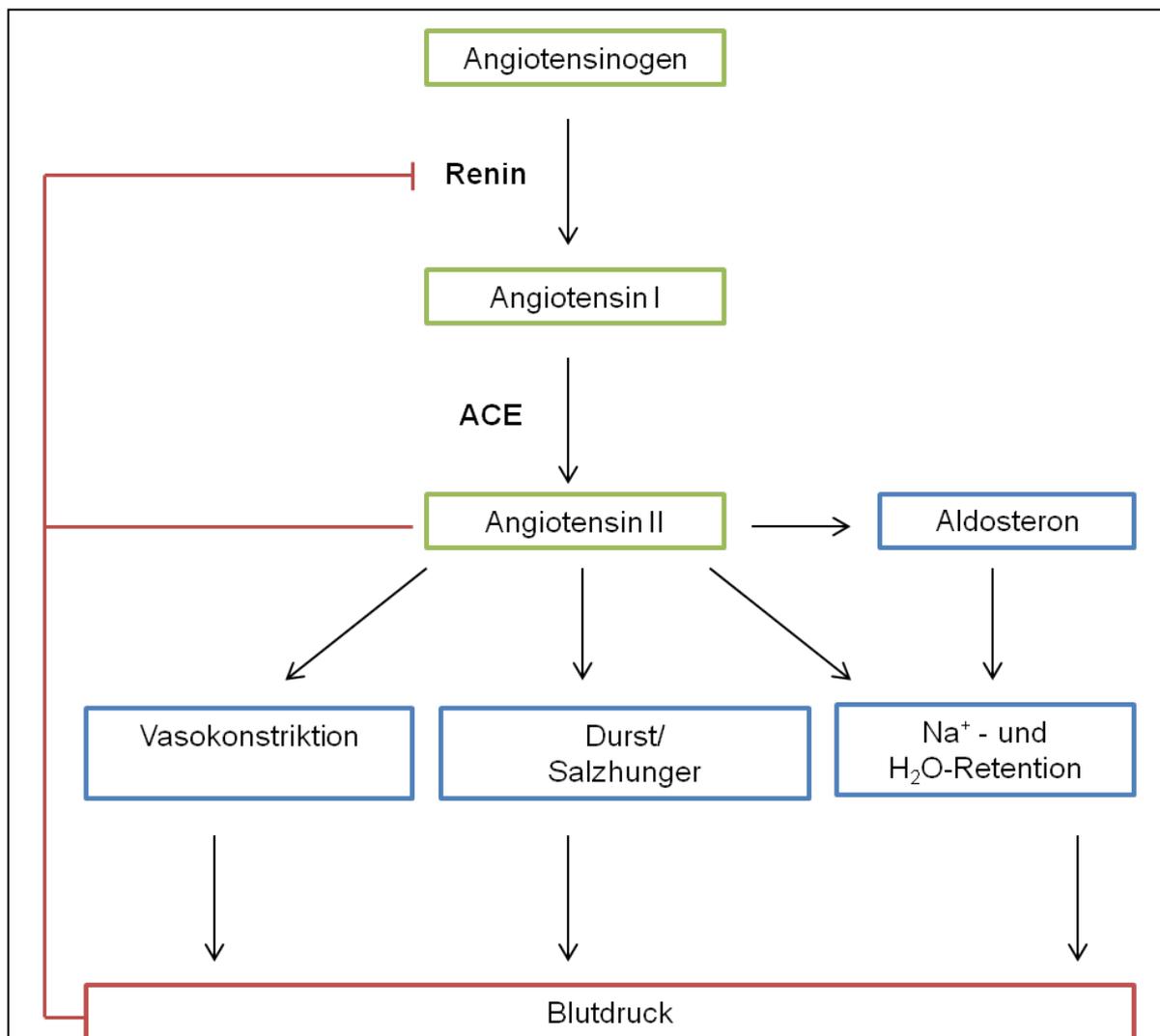


Abbildung 1: Schematische Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensin, als Substrat des RAAS, wird von der Aspartylprotease Renin in das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) umgesetzt. ANG I wird anschließend durch das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II (ANG II) umgesetzt. ANG II als eigentliches Effektorhormon vermittelt daraufhin seine physiologische Wirkung, indem es eine Vasokonstriktion der glatten Muskulatur, die Natrium- und Wasser-Retention in der Niere, die Sekretion von Aldosteron sowie Durst und Salzhunger auslöst. Letztendlich wirkt das RAAS regulierend auf das Blutvolumen und somit den Blutdruck. Das RAAS wird über negative Rückkopplungsmechanismen reguliert.

durch die Aspartylprotease Renin, welches von dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt wird, das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) abgespalten⁸⁻¹⁴. Dieses wird von dem Angiotensin konvertierenden Enzym (ACE), einer membrangebundenen Metalloprotease, die hauptsächlich im Lungenendothel gebildet wird, in das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) umgewandelt^{9,15-18}. ANG II stellt das eigentliche Effektorhormon der RAAS-Kaskade dar. Es vermittelt seine physiologische Wirkung über ANG Rezeptoren (AT₁-, AT₂-Rezeptoren), wobei die meisten Effekte über den Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT₁-Rezeptor) vermittelt werden. So führt eine Erhöhung der ANG II-Konzentration im Blut auch zu einer Erhöhung des Blutdrucks, indem es eine Vasokonstriktion der glatten Muskulatur, vermehrtes Durstgefühl und Salzhunger, sowie eine Erhöhung der Synthese und Sekretion von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebenniere induziert^{9,19,20}. Letzteres bewirkt wiederum einen erhöhten tubulären Rücktransport von Kochsalz und Wasser aus dem Primärharn ins Blut, was zusätzlich zu einer Erhöhung des Blutvolumens und damit des Blutdrucks führt¹⁴ (s. Abbildung 1). Im Menschen stellt unter physiologischen Bedingungen die Reninsekretionsrate den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Bildung von Angiotensin II dar. Weder die Konzentration von ACE noch von Angiotensinogen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Bei Mäusen hingegen stellt Angiotensinogen den limitierenden Faktor des Systems dar^{14,21,22,23-25}. Zur Selbstregulierung des RAAS wirken verschiedene Faktoren wie etwa ein erhöhter Blutdruck sowie Angiotensin II selbst über negative Rückkopplungsmechanismen hemmend auf die Freisetzung von Renin¹⁴. Neben dem systemischen RAAS existieren auch lokale Renin-Angiotensin-Systeme. Diese sind im Herz, in den Blutgefäßen, den Nebennieren, den Ovarien und im Uterus, im Pankreas und im Gehirn zu finden. Vermutlich sind diese gewebespezifischen Systeme wichtig bei der Regulierung der Organfunktionen unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen²⁶⁻²⁸.

1.2 Renin

Renin wird hauptsächlich in den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) gebildet. Dort findet auch die Transkription des auf Chromosom 1 gelegenen Ren1-Gens statt. Während die Reningene von Maus und Ratte 9 Exons und 8 Introns besitzen, weisen die Reningene von Mensch und Schaf ein zusätzliches Exon (Exon 5A) auf, welches für 3 Aminosäuren codiert²⁹. In manchen Mausstämmen finden sich, im Unterschied zu anderen Säugetierarten, zwei verschiedene Reningene, Ren1d und Ren2^{30,31}. Andere Mausstämme besitzen hingegen lediglich ein Reningen (Ren1c). Da sich die zwei Reningene Ren1d und Ren2 strukturell sehr ähnlich sind, nimmt man an, dass sie durch Genduplikation entstanden sind^{32,33}. Während dem Ren2-Genprodukt Glykosylierungsstellen fehlen, und es dadurch konstitutiv freigesetzt

wird, werden die Ren1c- und Ren1d-Genprodukte über regulierte Exozytose sezerniert³⁴⁻³⁶. Ursprünglich nahm man an, dass Mausstämme mit zwei Reningenen erhöhte Plasma-Renin-Konzentrationen aufweisen müssen. Wie sich jedoch herausstellte, hatten Mausstämme, die zusätzlich das Ren2 Gen exprimierten, einen normalen Blutdruck sowie normale Plasma-Renin-Spiegel³⁷⁻³⁹.

Die Renin-Genexpression unterliegt einer strengen transkriptionellen Kontrolle. Die speziellen Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren innerhalb des proximalen Reninpromotors sind charakteristisch sowohl für das humane als auch das murine Reningen. Beide enthalten auch eine stark konservierte TATA-Box. Der proximale Reninpromotor ist wichtig für die basale Aktivität der Reningene, die transkriptionelle Regulation durch cAMP (CRE/CREB, Pit-1, HOX/PBX, RB; LXR- α /CNRE) und nukleäre Rezeptoren (LXR- α , PPAR- γ), wie auch für die Kontrolle der Renin-Genexpression während der Entwicklung (CBF1, HOX/PBX, Ets). Zusätzlich zur proximalen Promotor-Region wird das Reningen durch ein

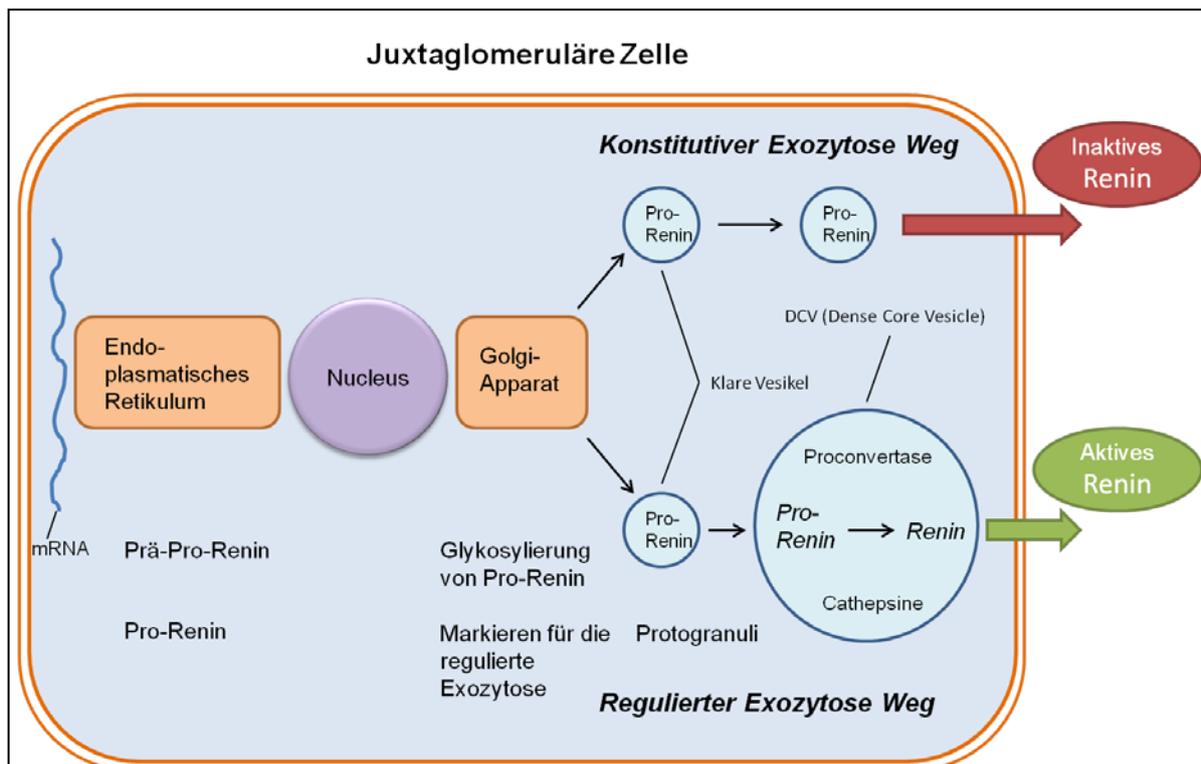


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Prozessierung von Renin. Nach der Translation der Renin mRNA gelangt das Prä-Pro-Segment in das Endoplasmatische Retikulum. Dabei wird das Prä-Signalpeptid abgespalten, und das dabei entstandene Pro-Renin wandert weiter zum Golgi-Apparat. Dort findet die Glykosylierung des Pro-Renins und dessen Markierung für den regulierten Exozytose Weg statt. Von dem trans-Golgi werden klare Vesikel abgeschnürt, die über den konstitutiven Exozytose Weg Pro-Renin in den Kreislauf abgeben. In dem regulierten Exozytose Weg wird Pro-Renin zunächst in Progranulen gespeichert, welche daraufhin zu Reningranulen (sog. Dense Core Vesicles, DCVs) reifen. In den DCVs findet die Abspaltung des Pro-Segmentes statt. Aktives Renin wird dann gespeichert und erst bei Bedarf sezerniert. (Grafik adaptiert nach Schweda et al, 2007⁵).

(Maus) bis zwei (Mensch) 5'-flankierende enhancer-Elemente kontrolliert. Das sind regulatorische DNA-Sequenzen, die in der Lage sind, die Transkription stark zu induzieren. Bereits bekannte enhancer-Elemente des Reningens sind: NF- κ B, Sp1/Sp3, WT1, CRE/CREB/CREM, E-Box/USF1/USF2, HRE/RAR/RXR/Ear2/PPAR γ und NF-Y.

Neben der starken transkriptionellen Kontrolle wird Renin auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. So ist bekannt, dass die Stabilität der Renin mRNA maßgeblich durch mRNA Bindeproteine, welche an die 3'-UTR der Renin mRNA binden, beeinflusst wird. Stabilisierende Effekte wurden für HuR, CP1/hnRNP E1, Nucleolin, Dynamin und YB-1 beobachtet. HADHB hingegen hat wahrscheinlich einen destabilisierenden Effekt²⁹.

Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen zunächst als primäres Translationsprodukt, welches als Prä-Pro-Renin bezeichnet wird, gebildet. Daraufhin wird es über das Prä-Segment, welches das Signalpeptid für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) darstellt, in die ER-Zisternen aufgenommen, wobei die Prä-Sequenz abgespalten wird^{5,14,34}. Das dadurch entstandene enzymatisch noch inaktive Pro-Renin wird anschließend in den Golgi Apparat geschleust, wo es in sogenannte „klare“ Vesikel verpackt und konstitutiv sezerniert wird. Eine weitere Möglichkeit der Reninsekretion stellt die regulierte Exozytose dar. Dabei wird Pro-Renin mit Mannose-6-Phosphatresten glykosyliert und in elektronenoptisch dichte, lysosomenartigen Dense Core Vesicles (DCV) gespeichert. Dort erfolgt die Umwandlung von inaktivem Pro-Renin in aktives Renin. Dabei wird die 46 Aminosäuren lange N-terminale Pro-Sequenz abgespalten (s. Abbildung 2). Lediglich 25 % des synthetisierten Pro-Renins wird den DCVs zugeführt und dort in aktives Renin umgewandelt, während 75% konstitutiv als Pro-Renin sezerniert wird^{5,40}.

Mechanistisch ist der Prozess der Umwandlung von Pro-Renin zu Renin noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sowohl Cathepsin B⁴¹ als auch Prohormon Konvertase PC5⁴², die sich zusammen mit Pro-Renin in den Vesikeln befinden, entscheidend zu der Umwandlung beitragen. Auch der saure pH-Wert von 4-6 innerhalb dieser Vesikel, der eine optimale Proteaseaktivität gewährleistet, spielt womöglich eine wichtige Rolle. Das aktive Renin wird erst bei physiologischem Bedarf in den Kreislauf abgegeben und bleibt so lange in den DCVs gespeichert^{5,13,24,43,44}.

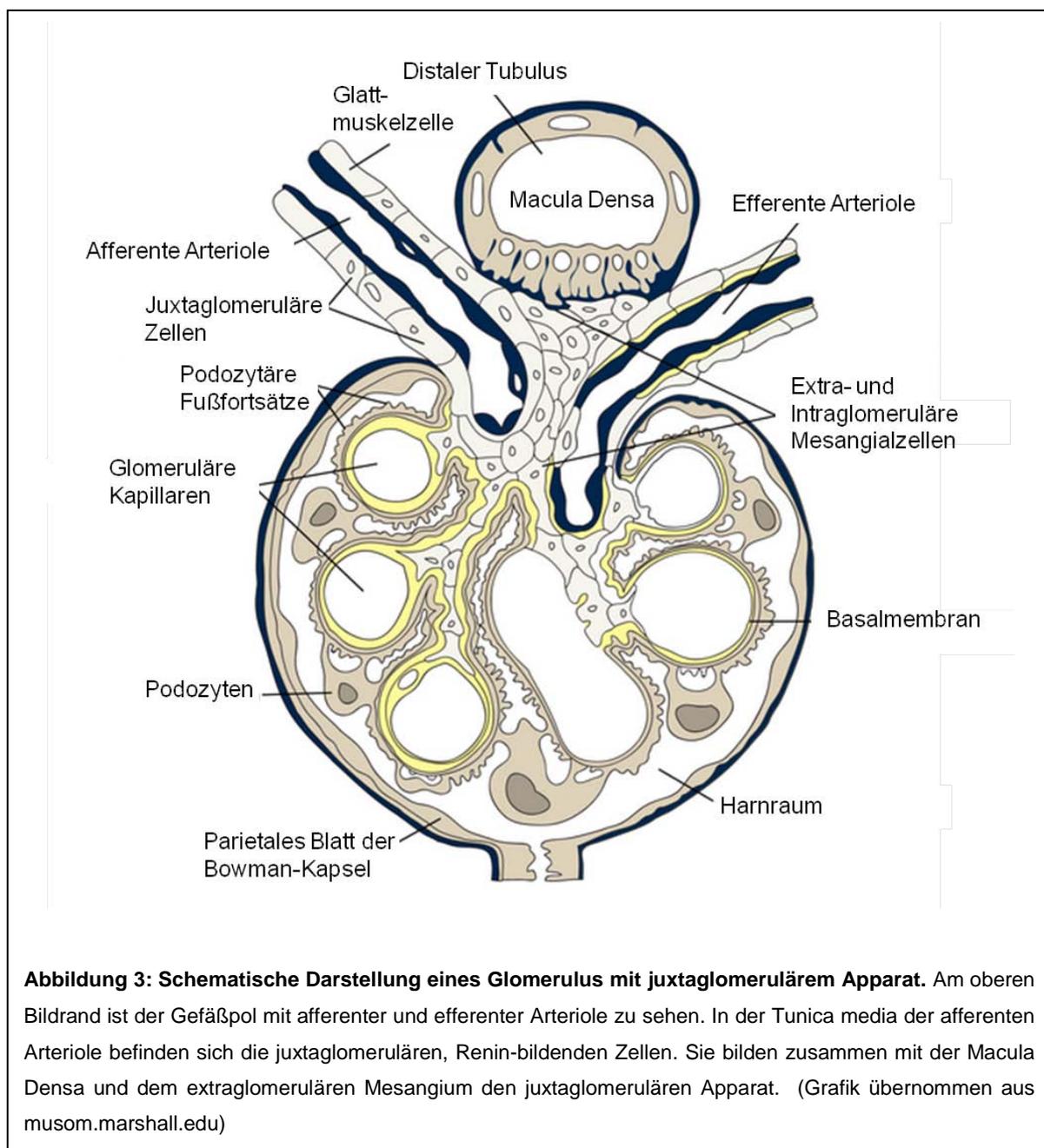
1.3 Bildungsorte von Renin

Renin-bildende Zellen finden sich in verschiedenen Organen des Körpers als Teil von lokalen Renin-Angiotensin-Systemen wie etwa im Gehirn und im Herz, sowie in den Nebennieren^{45,46}. Diese Reninquellen sind systemisch nicht sehr bedeutend. Das

aktive Renin wird fast ausschließlich in den Nieren gebildet. Wie bereits erwähnt, wird Renin in der adulten Niere in den juxtaglomerulären Zellen gebildet.

1.3.1 Die juxtaglomeruläre Zelle

Die klassischen Renin-bildenden Zellen der Niere sind die juxtaglomerulären Zellen, die in der Tunica media der afferenten Arteriole am Gefäßpol des Glomerulus beim Übergang zum glomerulären Kapillargeflecht lokalisiert sind (s. Abbildung 3) ^{47,48}. Sie bilden zusammen mit angrenzenden spezialisierten Zellen des distalen Tubulus, den sogenannten Macula Densa Zellen, und den extraglomerulären Mesangialzellen den juxtaglomerulären Apparat ⁴⁹.



JG-Zellen haben eine kuboide und damit eine den Epithelzellen ähnliche Form, weshalb sie auch juxtaglomeruläre Epitheloidzellen genannt werden ⁴⁹. In der Maus sind sie durchschnittlich $500 \mu\text{m}^3$ groß ⁵⁰. Die JG-Zellen enthalten viele elektronendichte Renin-haltige Vesikel, Peroxisomen, sowie einige kleinere Vesikel, sogenannte Protogranula, die hauptsächlich inaktives Prorenin enthalten ⁵¹. Weitere Charakteristika dieser Zellen sind ein vergrößertes raues endoplasmatisches Retikulum, ein ausgeprägter Golgi-Apparat, Myofilamente wie auch einige Mitochondrien ^{14,49}. Etwa die Hälfte der Zellen des juxtaglomerulären Apparates wird neural durch adrenerge Nervenfasern innerviert ^{52,53}. Außerdem sind JG-Zellen über Gap-Junctions untereinander, aber auch mit benachbarten extraglomerulären Mesangialzellen und Endothelzellen der afferenten Arteriole verbunden, und bilden so ein funktionelles Synzytium ⁵⁴⁻⁵⁶. Das vorrangig in JG-Zellen exprimierte Gap-Junction-Protein ist Connexin 40 (Cx40), welches aber auch in Endothelzellen, wie auch in extra- und intraglomerulären Mesangialzellen zu finden ist ^{57,58}.

1.3.2 Weitere Renin-produzierende Zellen

Es ist bekannt, dass unter Stimulation des RAAS und somit erhöhtem Bedarf an Renin die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole durch metaplastische Transformation zu Renin-produzierenden Zellen werden können ⁵⁹. Dieser auch als retrograde Rekrutierung bekannte Prozess geht einher mit deutlichen strukturellen Veränderungen in der Zelle. Diese äußern sich durch eine Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates, sowie mit dem Verschwinden von Myofilamenten und der Bildung Renin-haltiger Vesikel. Am Ende dieser Transformation haben diese Zellen eine kuboide Form angenommen und enthalten kaum noch Myofilamente. Sobald der Bedarf an Renin wieder sinkt, erfolgt wiederum die Umwandlung vom sekretorischen zum kontraktilen Zelltyp ⁶⁰. Auch Interlobular-Arterien sowie Muskelzellen der efferenten Arteriole können unter lang anhaltender Stimulation des RAAS Renin produzieren ⁶¹. Auch außerhalb der Gefäße wird unter bestimmten Umständen Renin produziert, wie etwa im extra- und intraglomerulären Mesangium ⁶²⁻⁶⁴, in interstitiellen Zellen ⁶⁵ und seltener auch in Zellen des distalen Tubulus ^{48,66}. Durch Verfolgung der Reninzelllinie konnte gezeigt werden, dass diese Zellen bereits während der fötalen Entwicklung Renin synthetisiert haben, sich aber dann zu anderen Zelltypen entwickelten. Bei starker Stimulation des RAAS können sie aber wieder Renin produzieren ⁶⁷ (vgl. Kapitel 1.5.4 + Abbildung 6).

1.3.3 Organkontrolle der Reninexpression und -sekretion

Da Renin das Schlüsselenzym des RAAS darstellt, unterliegt dessen Synthese und Sekretion regulierten Kontrollmechanismen. Dadurch wird sichergestellt, dass der Körper Änderungen des Blutdrucks oder Störungen des Salz- und Wasserhaushaltes entsprechend regulierend entgegenwirken kann ²⁹.

1.3.3.1 Sympathisches Nervensystem

Die Reninsekretion wird entscheidend durch das sympathische Nervensystem beeinflusst. Die Existenz von β -adrenergen Rezeptoren auf juxtaglomerulären Zellen wurde durch diverse Rezeptor-Bindestudien, in situ Hybridisierung ¹⁴ sowie durch immunhistochemische Färbungen ⁶⁸ nachgewiesen. So ist eine Aktivierung der β_1 -adrenergen Rezeptoren der JG-Zellen nötig, um eine basal konstante Expression und Sekretion von Renin zu gewährleisten. Die β_1 -adrenergen Rezeptoren der JG-Zellen werden durch im Kreislauf zirkulierende oder von sympathischen Nervenendigungen freigesetzte Katecholamine stimuliert, wodurch es zu einer Aktivierung eines G_s -Protein-gekoppelten Rezeptors kommt. Dieser vermittelt daraufhin über eine Aktivierung von Adenylatzyklasen einen Anstieg von intrazellulärem cAMP, das die Freisetzung von Renin bewirkt ^{69,70} (s. Kapitel 1.3.4.1). Dadurch erklärt sich die reduzierte Reninsekretion nach pharmakologischer Inhibition der β_1 -adrenergen Rezeptoren ^{71,72}. Ebenso konnte durch renale Denervierung eine verminderte Reninexpression und -sekretion beobachtet werden ^{73,74}, wobei hierbei zu beachten ist, dass dadurch auch tubuläre und hämodynamische Effekte des sympathischen Nervensystems betroffen sind ⁷⁵. Weitere Aufklärung der Bedeutung des sympathischen Nervensystems auf die Reninexpression und -sekretion brachte die Generierung einer β_1/β_2 -Adrenorezeptor-defizienten Maus. Diese wies im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle eine um 85% verminderte Plasma-Renin-Konzentration auf. Neben der verminderten basalen Plasma-Renin-Konzentration, konnte in den β_1/β_2 -Adrenorezeptor-Knockout Mäusen dennoch eine Veränderung der Reninsekretion durch chronische Stimuli, wie etwa orale Salzaufnahme, Schleifendiuretika, ACE-Hemmer oder AT_1 -Rezeptor Antagonisten induziert werden ⁷⁶. Dies zeigt, dass eine Änderung der Aktivität des Reninsystems nur bedingt abhängig von dem β -adrenergen Input ist.

1.3.3.2 Angiotensin II

Die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat in den Blutkreislauf führt über die RAAS-Kaskade zu einer vermehrten Bildung von Angiotensin II. Über einen negativen Feedback-Schleife hemmt ANG II die Synthese und Sekretion von Renin ¹⁴. Es konnte gezeigt werden, dass ANG II einen direkten Einfluss auf die Reninsynthese und -sekretion

besitzt. So führt eine Blockierung des AT_1 -Rezeptors zu einer Erhöhung der Reninfreisetzung. Die Expression von AT_1 -Rezeptoren wurde für die JG-Zellmembran bereits nachgewiesen^{77,78}. Die inhibierende Wirkung auf die Reninsekretion durch ANG II kommt einerseits durch eine Erhöhung von intrazellulärem Kalzium (s. Kapitel 1.3.4.3), sowie indirekt durch eine Erhöhung des Blutdrucks, bedingt durch eine Vasokonstriktion bzw. durch verstärkte Salzresorption zustande⁷⁹. Beide Effekte wirken hemmend auf die Reninsekretion. Zusätzlich bewirkt ANG II die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere, was zusätzlich zu einer Erhöhung des Blutdrucks beiträgt.

1.3.3.3 Aldosteron

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet. Als Grundbaustein für die Aldosteronsynthese dient Cholesterin. Die Sekretion von Aldosteron wird v.a. direkt durch ANG II, aber auch durch einen Mangel an Natrium oder eine erhöhte Kaliumkonzentration stimuliert. Auch das Peptid-Hormon Adrenocorticotropin (ACTH) wirkt stimulierend auf die Aldosteronsekretion, während atriales natriuretisches Peptid (ANP) hemmend wirkt. Aldosteron wirkt über den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR). Dieser liegt in Abwesenheit von Aldosteron in inaktiver Form im Zytosol vor. Aldosteron kann durch seinen lipophilen Charakter die Zellmembran passieren und an den Rezeptor binden. Dieser durchläuft daraufhin eine Konformationsänderung, löst sich aus einem Multiproteinkomplex, dimerisiert und transloziert in den Zellkern. Dort bewirkt er die Transkription Aldosteron-regulierter Gene^{80,81}. Eines der wichtigsten Proteine, die durch Aldosteron induziert werden, ist die serum and glucocorticoid inducible kinase 1 (SGK1). SGK1 übt ihrerseits eine regulatorische Wirkung auf den endothelialen Natriumkanal (ENaC), den renal outer medullary potassium channel (ROMK), die Na^+ - K^+ -ATPase und den Na^+ / K^+ / Cl^- -Kotransporter aus⁸²⁻⁸⁵. In der Niere bewirkt Aldosteron hauptsächlich eine Reabsorption von Natrium (ENaC) und gleichzeitig die Sekretion von Kalium (ROMK) im distalen Tubulus und in den kortikalen Abschnitten des Sammelrohrs. Da der Wasserhaushalt eng an den Elektrolythaushalt gekoppelt ist, reguliert Aldosteron somit auch das Blutvolumen und damit den Blutdruck. In MR- bzw. Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen konnte eine starke Erhöhung der Reninexpression und -synthese festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der durch Abwesenheit von Aldosteron bedingte verminderte Blutdruck sein, welcher möglicherweise eine kompensatorische Erhöhung der Reninsynthese und -sekretion nach sich zieht^{86,87}.

1.3.4 Zelluläre Regulation der Reninexpression und -sekretion

Es wird angenommen, dass der cAMP/PKA/CREB und der Kalzium/PKC Signalweg hauptsächlich für die Regulation der Renin-Genexpression und somit die Synthese und Sekretion von Renin verantwortlich sind. Signalwege, die über STAT, NF κ B und Mitglieder der nukleären Rezeptor Superfamilie laufen, kommen wahrscheinlich eher bei pathologischen Situationen zum Tragen ²⁹.

1.3.4.1 cAMP und Proteinkinase A

Der Second-Messenger cAMP ist eindeutig das wichtigste intrazelluläre Signal für die Reninsynthese und -sekretion. cAMP wird von Adenylatzyklasen (AC) aus ATP gebildet. In Renin-produzierenden Zellen sind hauptsächlich die AC5 und AC6 Isoformen der Adenylatzyklasen zu finden ^{88,89}. Die Aktivierung von β -Adrenorezeptoren steigert die Aktivität der Adenylatzyklasen über das stimulierende G-Protein G_s α ^{29,90}. An isolierten JG-Zellen konnte festgestellt werden, dass eine Stimulation der Reninexpression auch via Katecholamine, Dopamin ⁹¹, dem calcitonin gene-related peptide ⁹², dem pituitary adenyl cyclase activating polypeptide (PACAP) ⁹³, Adrenomedullin ⁹⁴ und den Prostaglandinen E₂

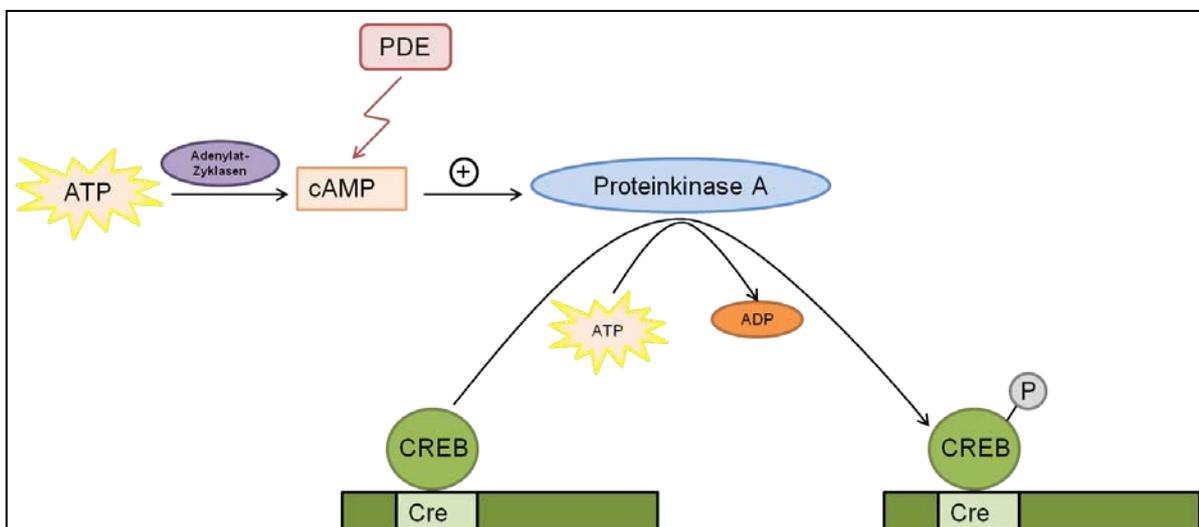


Abbildung 4: Schematische Darstellung des cAMP/PKA Signalweges. Der Second-Messenger zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) wird von Adenylatzyklasen aus ATP gebildet. cAMP wirkt aktivierend auf die Proteinkinase A (PKA), welche daraufhin unter Verbrauch von ATP im Nukleus den Transkriptionsfaktor cAMP response element binding protein (CREB) phosphoryliert. CREB ist konstitutiv an die cAMP response elements (CRE) der regulatorischen Sequenzen der cAMP gesteuerten Gene gebunden und wird durch die PKA induzierte Phosphorylierung transaktiviert. Phosphodiesterasen (PDEs) bauen cAMP ab und können dadurch die Reninsynthese und -sekretion beeinflussen ³. (Grafik adaptiert nach Desch, 2010 ⁶)

und I_2 ⁹⁵ über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels stattfindet. Die Reninsynthese und -sekretion kann aber auch erhöht werden, indem cAMP abbauende Phosphodiesterasen (PDEs) inhibiert werden¹³. Innerhalb der PDEs findet man überwiegend PDE3 und PDE4 in Renin-produzierenden Zellen^{96,97}. Auch die PDE1 könnte eine Rolle spielen⁹⁸, da bekannt ist, dass sie durch Kalzium/Calmodulin aktiviert wird (s. Kapitel 1.3.4.3)⁹⁹. Der genaue molekulare Mechanismus, über den cAMP auf die Reninsekretion wirkt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel aktivierend auf die Proteinkinase A wirkt, welche schlussendlich Zielproteine (CRE/CREB) phosphoryliert, die daraufhin ihrerseits die Expression, Synthese und Sekretion von Renin beeinflussen (s. Abbildung 4)^{5,96,100}.

1.3.4.2 cGMP

cGMP wird entweder über lösliche (sGC) oder membranständige (pGC) Guanylatzyklen aus GTP gebildet. Welchen Einfluss der cGMP Signalweg auf die Reninsynthese und -sekretion hat, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die Untersuchung von in vivo Effekten durch cGMP wird erschwert, weil dadurch auch der Blutdruck verändert wird, was per se einen Einfluss auf die Reninfreisetzung hat¹³. In vitro konnten für den cGMP Signalweg sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Reninsynthese und -sekretion gezeigt werden. So kann die Stimulation von pGCs durch natriuretische Peptide (NP) sowohl zu einer Inhibierung (niedrige NP Konzentration), als auch zu einer Stimulation (hohe NP Konzentration) der Reninfreisetzung führen¹⁰¹⁻¹⁰³. Das über sGCs wirkende Stickstoffmonoxid (NO) hingegen zeigt ausschließlich einen stimulierenden Effekt auf die Reninsekretion¹⁰⁴. Eine Verbindung des cAMP- mit dem cGMP Signalweges konnte außerdem insofern hergestellt werden, da PDE3 durch zyklisches GMP inhibiert wird⁹⁹, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beiträgt.

1.3.4.3 Kalzium und Proteinkinase C

Im Gegensatz zu dem stimulierenden Effekt von cAMP, wirken zytosolisches Kalzium und die Protein Kinase C (PKC) hemmend auf die Reninsekretion^{105,106}. Dies wird als „Kalzium Paradoxon“ bezeichnet, da eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration in anderen sekretorischen Zellen typischerweise die Exozytose von Vesikeln stimuliert¹⁰⁷. Manche Hormone wie beispielsweise Angiotensin II und Endotheline bewirken einen Anstieg der Kalziumkonzentration und hemmen somit die Reninfreisetzung^{14,101,108-110}. Im Gegensatz dazu wirkt eine Erniedrigung der zytosolischen Kalziumkonzentration stimulierend auf die Reninsekretion^{89,111,112}. Wie genau eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration die Reninsekretion hemmt, ist noch nicht genau bekannt. Denkbare Mediatoren sind Kalzium-

bindende Proteine, wie Calmodulin oder Calcineurin, sowie die Proteinkinase C^{21,101,113-116}. Auch Myofilamente, die durch eine Kalzium-bedingte Kontraktion mögliche Kontakte von Reninvesikeln mit der Plasmamembran verhindern könnten¹¹⁶, oder Kalzium-aktivierte Chloridkanäle, die durch Depolarisation inhibierend auf die Reninfreisetzung wirken könnten, sind denkbar²¹. Möglich erscheint auch ein direkter Einfluss von Kalzium auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration, da die Adenylatzyklen AC5 und AC6 durch Kalzium inhibiert werden können. Dies würde demnach zu einem Absinken des cAMP-Spiegels und somit zu einer Inhibierung der Reninsekretion führen^{88,89}.

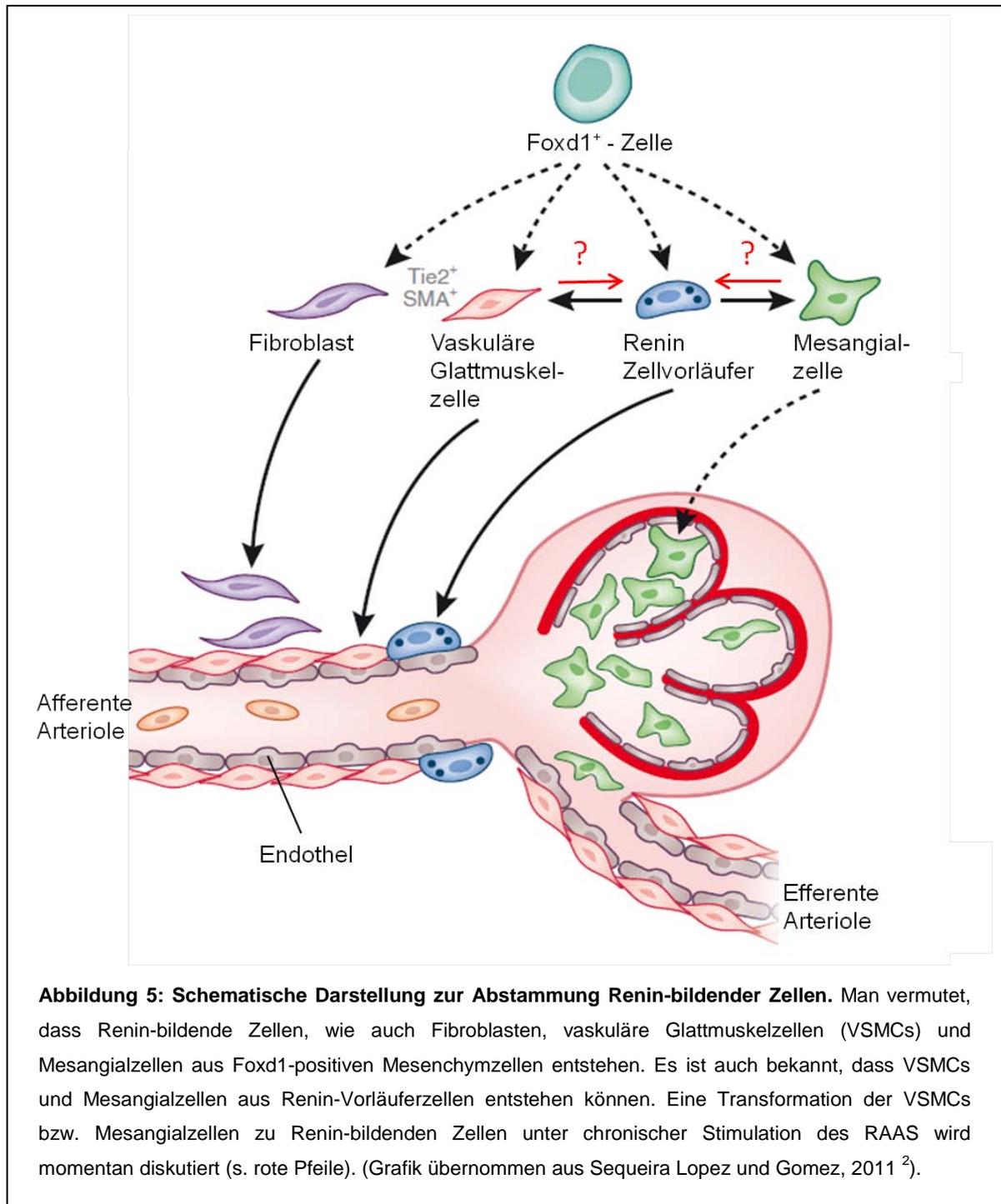
1.4 Entwicklung der Reninzellen

In frühen Embryonalstadien (E14, E15) der Nierenentwicklung bei Mäusen finden sich Renin-exprimierende Zellen bereits im undifferenzierten metanephrischen Mesenchym, entweder als einzelne Zellen oder Zellgruppen von 2-3 Zellen^{117,118}. Das ist der Zeitraum, in dem auch die Vaskularisierung in der Niere beginnt. Diese frühen Reninzellen sind vor allem in der Nähe sich bildender Gefäße, aber auch in sich entwickelnden Glomeruli zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass die Reninzellen die innerhalb der Gefäße liegen, hauptsächlich in arcuaten Arterien und arcuaten Seitenarterien lokalisiert sind, während die meisten afferenten Arteriolen zu diesem Zeitpunkt noch frei waren von Renin¹¹⁸. Ab E18 sind die Renin-bildenden Zellen bereits eng mit den Gefäßen verbunden, mit Ausnahme von wenigen Reninzellen innerhalb der Glomeruli und dem Interstitium¹¹⁷. Das Maximum der Reninexpression wird in etwa 2-3 Tage nach der Geburt erreicht^{119,120}. Danach sinkt die Anzahl Renin-bildender Zellen wieder und sie sind dann ausschließlich in sich neu entwickelnden afferenten Arteriolen und nicht mehr in den größeren renalen Gefäßen zu finden. In adulten Tieren beschränkt sich die Reninproduktion letztendlich nur noch auf die klassischen juxtaglomerulären Zellen. Dieses Verteilungsmuster von Renin während der Entwicklung konnte für alle Säugetiere inklusive des Menschen nachgewiesen werden¹²¹. Man nimmt an, dass die Reninzellen der adulten Niere von bestimmten Vorläuferzellen abstammen, die sich aus Foxd1-positiven Mesenchymzellen entwickeln. Es konnte durch Verfolgung der Reninzelllinie gezeigt werden, dass die adulten Renin-bildenden Zellen aus Zellen entstehen, die diesen Transkriptionsfaktor exprimieren. Auch Glattmuskelzellen, Mesangialzellen sowie Fibroblasten entstehen aus Foxd1-positiven Vorläuferzellen (s. Abbildung 5)^{2,122}.

Durch Manipulationen, die zu einer Störung des Salz- und Wasserhaushaltes bzw. des Blutdrucks führen, steigt die Zahl Renin-exprimierender Zellen entlang der präglomerulären Arterien, innerhalb des Glomerulus und im Niereninterstitium an. Diese Reninzellverteilung ähnelt dann sehr der Verteilung von Renin-bildenden Zellen embryonaler Nieren. Es konnte

gezeigt werden, dass diejenigen Zellen, die über die Plastizität verfügen, auch später Renin zu bilden, bereits während der Entwicklung Renin exprimiert haben. Reninzellen sind demnach sehr plastisch. Sie sind Vorläufer für verschiedene renale Zelltypen, welche ihrerseits bei Bedarf (Störung des RAAS) wieder den Reninzell-Phänotyp annehmen können

123



1.5 Plastizität der Reninexpression und -sekretion in der adulten Niere

1.5.1 Blutdruck

Als Teil der negativen Feedback-Schleife steuert der Blutdruck die Synthese und Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen der Niere. So wirkt ein erhöhter Blutdruck inhibierend, ein verminderter Blutdruck stimulierend auf die Reninsynthese und -sekretion^{124,125}. Ein in der Niere lokalisierter Barorezeptor-Mechanismus ist sehr wahrscheinlich für die Perzeption des Perfusionsdrucks zuständig. Wie genau die Änderung des renalen Perfusionsdrucks in der Niere registriert wird, ist allerdings noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass dehnungsabhängige Kalziumkanäle durch die mechanische Dehnung der Zellmembran zu einem gesteigerten Kalzium-Influx beitragen, was die Freisetzung von Renin hemmt (vgl. Kapitel 1.3.4.3)¹²⁶. Dieser Befund wird bestätigt durch die Tatsache, dass die druckabhängige Inhibierung der Reninsekretion ausbleibt, wenn extrazelluläres Kalzium fehlt¹²⁷.

1.5.2 Modulatoren der Plastizität Renin-bildender Zellen

1.5.2.1 Connexin 40

Es ist seit längerem bekannt, dass die verschiedenen Zelltypen des juxtaglomerulären Apparates über Gap-Junctions verbunden sind. So verbinden sie Renin-produzierende Zellen sowohl untereinander¹²⁸, als auch mit benachbarten Endothel-, glatten Muskel- und extraglomerulären Mesangialzellen^{54,56,129,130}. Gap-Junctions setzen sich aus einzelnen Connexin (Cx)-Proteinen zusammen, wobei jeweils 6 Connexine einen Halbkanal, das sogenannte Connexon, bilden. In der Zellmembran kann sich dieser mit einem Halbkanal einer direkt angrenzenden Zelle verbinden, wodurch zwischen den Zytoplasmen der beiden Zellen eine Verbindung entsteht. Es sind unterschiedliche Isoformen von Connexin-Proteinen bekannt. Sie sind in der Lage, sowohl homo- als auch heteromere Kanäle zu bilden¹³¹, die sich je nach Aufbau in ihrer Porengröße und Permeabilität unterscheiden. Gap-Junctions sind für kleine Moleküle bis zu einer Molekülmasse von 1 kDa frei passierbar. Auch die Ladung der Ionen und Moleküle ist entscheidend für die Zell-Zell-Übertragung, da Gap-Junctions ladungsselektiv sind. Gap-Junctions sind somit essentiell für die Signalweiterleitung zwischen den Zellen, da auch Second Messenger Moleküle, wie cAMP oder Kalzium übertragen werden. Connexone können Signal-Moleküle auch in den

extrazellulären Raum freisetzen, da sie nicht immer an andere Zellen gekoppelt sein müssen. Das in juxtaglomerulären Zellen am häufigsten vorkommende Connexin ist Cx40. Zu einem weitaus geringeren Anteil sind auch Cx37 und Cx43 vertreten^{57,132-134}. Renin-produzierende Zellen, die durch Rekrutierung in afferenten Arteriolen neu entstanden sind und fötale Reninzellen der größeren Arteriolen enthalten ausschließlich Cx40. Cx40-Expression kann daher als grundlegendes Merkmal für Renin-bildende Zellen angesehen werden¹³⁵. Es konnte in mehreren Studien bereits gezeigt werden, dass Cx40 einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion und die korrekte Lokalisation Renin-bildender Zellen nimmt^{136,137}. So sind Cx40-defiziente Mäuse hypertensiv¹³⁸, weisen aber trotzdem eine erhöhte Plasma-Renin-Konzentration auf^{136,139}. Die Tatsache, dass in Cx40-defizienten Mäusen trotz des hohen Blutdrucks vermehrt Renin freigesetzt wird, könnte darauf hindeuten, dass die Übertragung inhibitorischer Signale an Renin-bildende Zellen, durch die Abwesenheit von Cx40 gestört ist. So ließ sich die Reninsekretion durch Angiotensin II in Cx40 Knockout Mäusen nicht mehr in dem Maße inhibieren, wie dies bei Wildtyp-Tieren der Fall war¹³⁶. Anhand von Untersuchungen an der isoliert-perfundierten Niere von Cx40-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Perfusionsdrucks zu einer gesteigerten, anstatt zu einer erniedrigten Reninsekretionsrate führt^{136,139}. Welcher Mechanismus dafür sorgt, dass Cx40 in den juxtaglomerulären Zellen regulierend auf die Reninsekretion wirkt, ist bisher noch unklar. Diskutiert wird, ob über Cx40-Gap-Junctions die Weiterleitung von inhibitorisch-wirkenden Kalzium-Ionen erfolgen könnte. Dadurch würde es, durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, zu einer starken Inhibition der Reninsekretion in den juxtaglomerulären Zellen kommen (s. Kap. 1.3.4.3). Wie bereits gezeigt werden konnte, nimmt die intrazelluläre Kalziumkonzentration mit steigendem renalen Perfusionsdruck zu¹⁴⁰⁻¹⁴². Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf einen erhöhten transmembranen Kalzium-Einstrom zurückzuführen^{21,143}. Verstärkend hinzu kommt der Befund, dass in Abwesenheit von Kalzium die Erhöhung des Perfusionsdrucks zu einer gesteigerten Reninsekretion führt^{111,144}. Diese fehlende Kontrolle der Reninsekretion durch den Perfusionsdruck konnte auch bei Cx40 Knockout Mäusen festgestellt werden, was für die Übertragung eines inhibierenden Kalzium-Signals durch Cx40-Gap-Junctions spricht¹⁴⁵.

Es wäre auch denkbar, dass Cx40 als Halbkanal fungiert und so beispielsweise ATP im Sinne einer parakrinen Sekretion freigesetzt wird. Dieses könnte für einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sorgen, indem es an purinerge Rezeptoren der benachbarten Zellen bindet¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Außerdem könnten Cx40-Halbkanäle als Mechanorezeptoren dienen, die zug- bzw. druckabhängig den Einstrom von Kalzium in Renin-produzierende Zellen oder aber auch die Freisetzung von ATP vermitteln^{142,149}. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Reninsekretion über einen Gap-Junction-vermittelten

Mechanismus abläuft, wie Versuche mit nicht-selektiven Gap-Junction-Blockern zeigten^{136,150,151}.

Neben dem beschriebenen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften hat das Fehlen von Cx40 auch Konsequenzen für die Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen. Diese finden sich normalerweise in der Media Schicht der afferenten Arteriolen. In Cx40-defizienten Mäusen allerdings sind sie außerhalb der Gefäßwände lokalisiert. Sie befinden sich im Bereich des extraglomerulären Mesangiums sowie im periglomerulären Interstitium¹³⁷.

1.5.2.2 Akr1b7

Die Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs) gehören einer Superfamilie von Enzymen an, die NADPH-abhängig Carbonylgruppen von Aldehyden und Ketonen reduzieren und dadurch in Hormon-synthetisierenden Zellen zur Entgiftung beitragen^{7,152,153}. Sie werden in 15 Familien eingeteilt, wobei AKR1B7 der AKR1B Familie angehört. In der adulten Niere wird Akr1b7 ausschließlich in den juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen exprimiert und kann somit als Marker für Renin-produzierende Zellen verwendet werden. Während der Nierenentwicklung findet Akr1b7 Expression zusammen mit der Renin Genexpression in Zellen der präglomerulären Gefäße, in Mesangialzellen sowie in Zellen des Sammelrohrs statt^{7,152}. Die transkriptionelle Kontrolle beider Gene wird durch den cAMP-Signalweg reguliert^{152,154-156}. Es wurde vermutet, dass Akr1b7 möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Produktion, Prozessierung, Speicherung und Sekretion von Renin spielt^{7,152}. Außerdem konnte erst kürzlich ein Zusammenhang zwischen Akr1b7 und der Cyclooxygenase-2, welches für die Synthese von Prostaglandinen verantwortlich ist, hergestellt werden^{157,158}. Von der Cyclooxygenase-2 ist bereits bekannt, dass sie an der Macula Densa kontrollierten Expression und Sekretion von Renin entscheidend beteiligt ist^{72,159}.

1.5.2.3 Prostanoiden und Cyclooxygenase-2

Prostanoiden werden aus Arachidonsäure über das Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ (PGH₂) durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) synthetisiert. Die weitere Synthese spezifischer Prostanoiden wird durch verschiedene Prostanoidsynthasen vermittelt. Für die Prostanoiden Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Prostazyklin (PGI₂) konnte nachweislich ein stimulierender Effekt auf die Reninsekretion festgestellt werden^{29,160-163}. Die Steigerung der Reninsekretion durch PGE₂ und PGI₂ wird durch die Aktivierung von EP₂, EP₄ oder IP Rezeptoren vermittelt, welche als G_s-gekoppelte Rezeptoren für einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration sorgen^{162,164,165}. In der Niere findet COX-2 Expression

vor allem in den Zellen der Macula Densa (MD) statt, aber auch in interstitiellen Zellen der Medulla und in MD-nahen Bereichen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife (TALH) ^{29,166}. Es sprechen einige Befunde für eine Kontrolle der Macula Densa und COX-2 auf die Reninexpression und -freisetzung. So konnte am Modell des isoliert-perfundierten juxtaglomerulären Apparates gezeigt werden, dass ein spezifischer COX-2-Hemmer (NS-398) die Stimulierbarkeit der Reninsekretion durch Nidrigsalzdiät abschwächt ¹⁵⁹. Ebenso konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Inhibition der COX-2 durch NS-398 oder SC 58236 eine Erhöhung der Plasma-Renin-Aktivität durch Nidrigsalzdiät ¹⁶⁷, verminderten renalen Perfusionsdruck ¹⁶⁸ oder die Gabe von Furosemid ^{169,170}, verhindern ¹⁷¹. Auch in COX-2 Knockout Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass der Reningehalt der Niere, sowie die Renin mRNA-Spiegel und die Reninaktivität in sehr viel geringerem Ausmaß durch Nidrigsalzdiät stimuliert werden ¹⁷². All diese Befunde weisen darauf hin, dass der Macula Densa Mechanismus an der Kontrolle der Reninsekretion beteiligt ist. Somit spielen die von der COX-2 der Macula Densa gebildeten Prostaglandine eine wichtige Rolle innerhalb des Signalwegs, der durch die Reduktion der NaCl Konzentration und des NaCl-Transportes durch das tubuläre Epithel in der Nähe des vaskulären Pols, regulierend auf die Reninsekretion wirkt ¹⁷¹.

1.5.3 Salzaufnahme

Es ist bekannt, dass die Aktivität des RAAS entscheidend durch orale Salzaufnahme beeinflusst wird. So wird die Reninsynthese und -sekretion durch eine verminderte Salzzufuhr gesteigert und durch eine erhöhte Salzzufuhr vermindert ¹²⁴. Es wurden verschiedene Mechanismen postuliert, die solche Salz-abhängigen Veränderungen der RAAS -Aktivität vermitteln könnten: systemisch-humorale Faktoren, intrarenale Faktoren, renale Innervierung oder der sogenannte intrarenale Macula Densa (MD) Mechanismus ²⁹. Noch ist nicht geklärt, welcher dieser Faktoren oder Mechanismen für die Salz-induzierten Veränderungen verantwortlich ist. Es scheint, als wäre die MD-abhängige, tubuläre Kontrolle der Reninsynthese eher auf akute als auf chronische Veränderungen der NaCl-Konzentration zurückzuführen. Weiterhin wirken von dem Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) abgeleitete Prostanoiden sowie NO eher modulierend und weniger als Hauptmediatoren auf das Reninsystem, v.a. in Bezug auf die Langzeit-Regulation. Dasselbe gilt für den stimulierenden Effekt der renalen Innervierung auf die Reninsynthese und -sekretion ^{29,173,174}. Auch extrarenale Faktoren könnten eine wichtige Rolle bei der Regulation des RAAS spielen. Durch die Aufnahme von zu viel bzw. zu wenig Salz, kann es zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung des Blutdrucks kommen, was wiederum zu Veränderungen in der Aktivität des RAAS führt. Somit könnte also auch der systemische Blutdruck regulierend auf die

Reninexpression und -sekretion wirken, wobei einige Studien belegen, dass die Natriuresis sowie die Regulation des Reninsystems durch den Blutdruck unabhängig reguliert werden¹⁷⁵⁻¹⁸⁰. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Reninfreisetzung nach erniedrigter Salzaufnahme nicht nur unabhängig vom Blutdruck ist, sondern auch unabhängig von der Herzleistung, GFR, β ANP, α_1 -adrenergen Rezeptoren, Plasma Natriumkonzentration, Osmolalität, renaler Innervierung und von nNOS gebildetem NO ist¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Demnach ist nicht konkret geklärt, welcher Mechanismus bzw. welche Mechanismen die Natriuresis und die Reninexpression und -sekretion bei erhöhter bzw. erniedrigter Natriumchloridzufuhr steuern. Nach dem momentanen Wissensstand erscheint der MD-Mechanismus am wahrscheinlichsten wobei auch ein momentan noch unbekannter Faktor oder Mechanismus nicht ausgeschlossen werden kann²⁹.

1.5.4 Genetische RAAS-Defekte

Es sind einige Krankheiten bekannt, die zu einer starken Stimulation des RAAS führen. Ein Beispiel ist das Bartter-Syndrom. Dabei kann Natrium im dicken aufsteigenden Ast der Henleschleife nicht ausreichend rückresorbiert werden, wodurch es zu Salzverlust und einer Erniedrigung des Blutdrucks kommt¹⁸⁵. Dies führt auch zu stark vergrößerten juxtaglomerulären Zellkomplexen, sowie zur Expression von Renin im extraglomerulären Mesangium¹⁸⁶. Der Missbrauch von Diuretika und Laxantien resultiert in dem sogenannten Pseudo-Bartter-Syndrom. Dabei kommt es ebenfalls zu einer Umwandlung von extraglomerulären Mesangialzellen zu Renin-produzierenden Zellen⁶⁴. Auch bei Anorexia nervosa sowie Morbus Addison-Patienten konnte eine derartige Umwandlung beobachtet werden¹⁸⁷.

Auch genetische Defekte innerhalb der RAAS-Kaskade können eine Rekrutierung von zusätzlichen Renin-bildenden Zellen bewirken. So lässt sich eine starke Reninzell-Hyperplasie in Mäusen mit einer genetischen Deletion im Locus für Angiotensinogen¹⁸⁸⁻¹⁹¹, ACE¹⁹²⁻¹⁹⁴, und AT_{1a}-Rezeptor¹⁹⁵ finden. Die Lokalisation dieser Reninzellen ist in diesen Modellen nicht mehr nur auf den JG-Bereich beschränkt. Sowohl in der Gefäßwand afferenter Arteriolen als auch in mehrschichtigen Zelllagen um die präglomerulären Gefäße konnten Reninzellen gefunden werden (s. Abbildung 6). Die Nieren dieser Knockout Mäuse zeigten außerdem starke strukturelle Störungen. Die Nieren wurden nach der Geburt hydronephrotisch mit schlecht ausgebildeter Medulla, einer atrophischen Papille und einem erweiterten Nierenbecken. Neben interstitieller Fibrose und sklerotischen Glomeruli, hatten die Mäuse auch Probleme mit der Aufkonzentrierung des Urins. Auffallend ist auch eine Verdickung der Media-Schicht der arteriellen Blutgefäße durch eine Zunahme der Zellzahl an der Gefäßinnenwand.

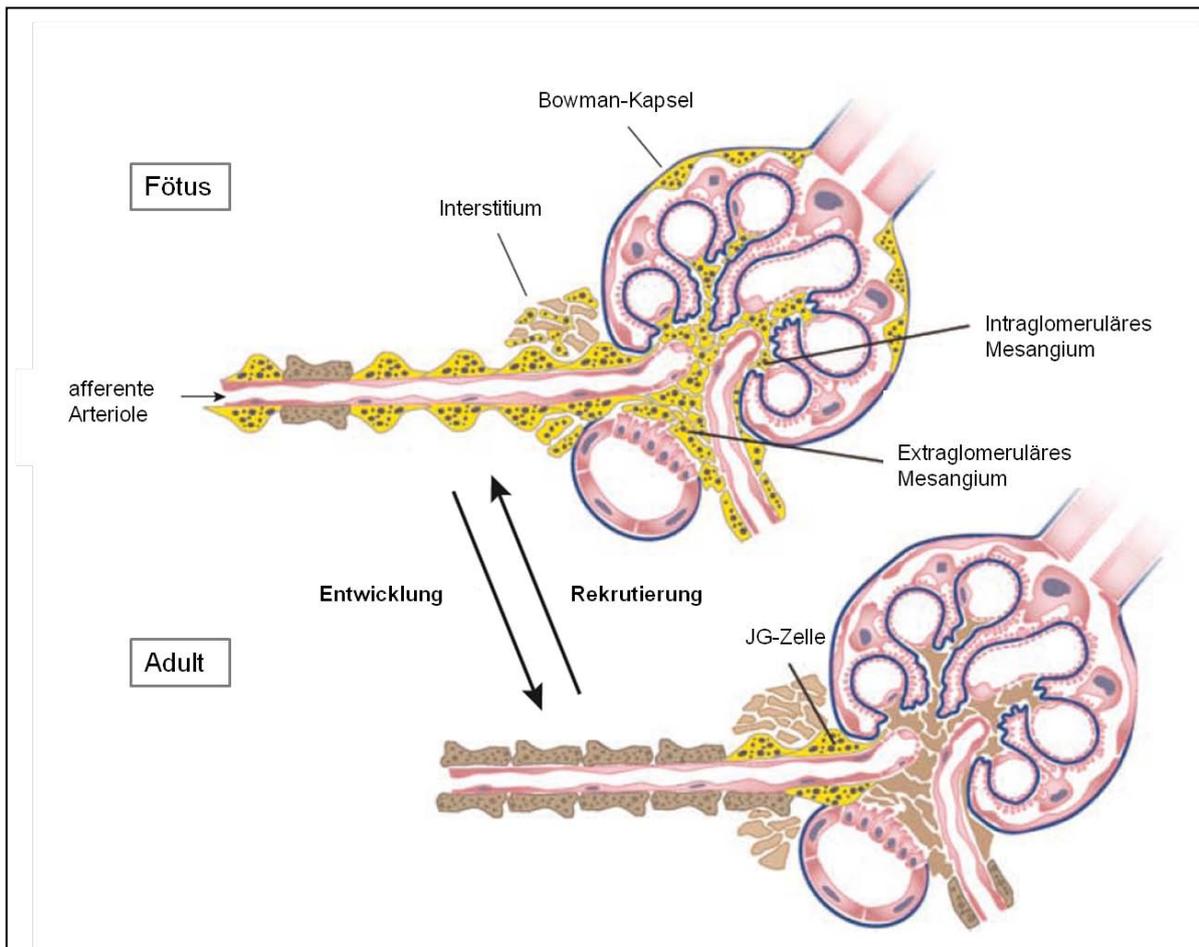
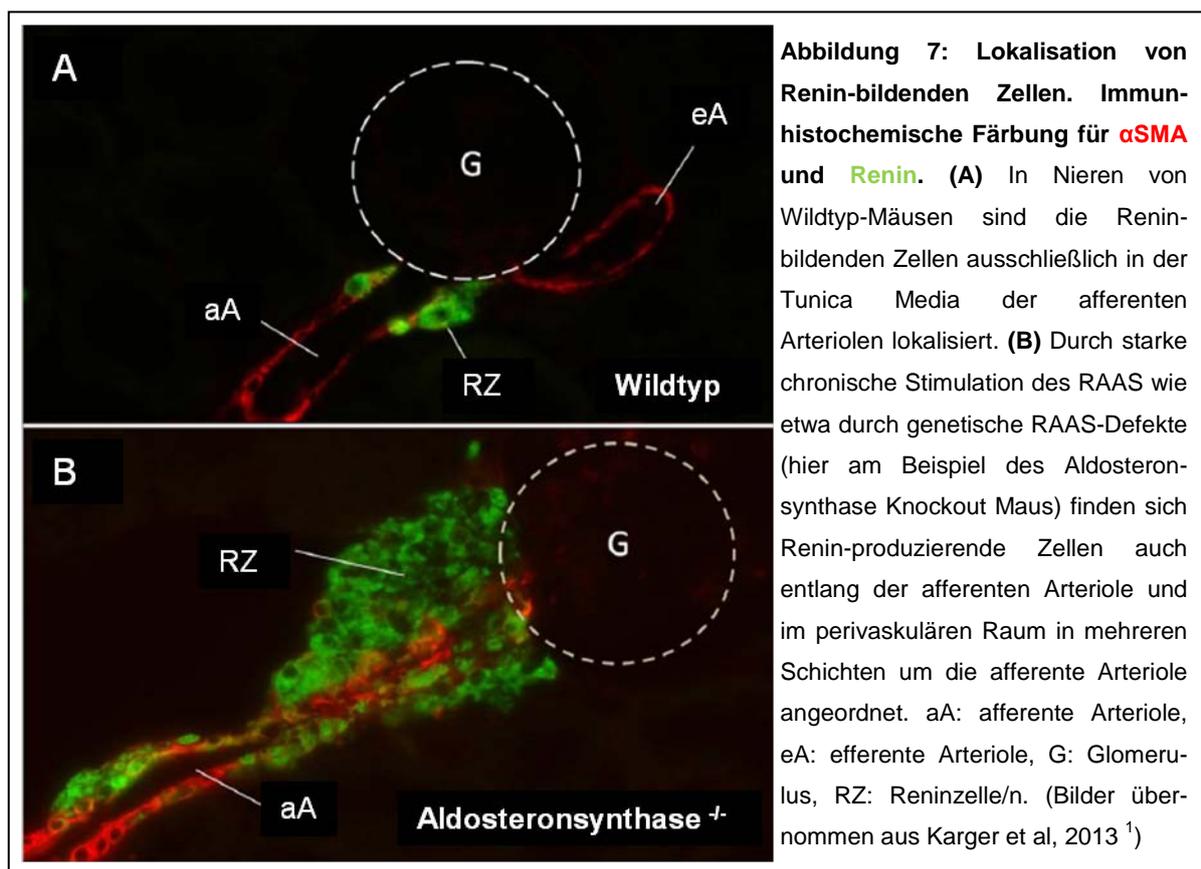


Abbildung 6: Verteilung Renin-bildender Zellen während der Entwicklung und Rekrutierung. Während der Embryonalentwicklung sind Renin-bildende Zellen (dargestellt in gelb mit schwarzen Punkten, welche Reninvesikel repräsentieren) entlang der intrarenalen Arterien, innerhalb der Glomeruli und des renalen Interstitiums lokalisiert. Mit fortschreitender Entwicklung nimmt die Zahl der Reninzellen kontinuierlich ab und begrenzt sich zunehmend auf den juxtaglomerulären Bereich, wie es typisch für adulte Nieren ist. Während des Vorgangs der Rekrutierung breiten sich die Renin-bildenden Zellen wieder aus, wobei dies davon abhängt, welche physiologischen Alterationen vorgenommen wurden und wie lange diese Stimuli wirken. Für gewöhnlich erfolgt die Rekrutierung Renin-produzierender Zellen stromaufwärts der afferenten Arteriolen. Die Zunahme Renin-bildender Zellen kann aber auch im intra- und/oder extraglomerulären Mesangium, im Interstitium und manchmal auch in der Bowman-Kapsel oder der efferenten Arteriole beobachtet werden. (Grafik übernommen aus Brunskill et al, 2011⁷).

Einen ähnlichen Phänotyp hinsichtlich der Reninzellhyperplasie, allerdings ohne auffällige morphologische Veränderungen, konnte bei Mäusen mit einem Knockout des Aldosteronsynthasegens festgestellt werden (s. Abbildung 7B)⁸⁷. Die Aldosteronsynthasedefizienten Tiere waren lediglich leicht hypoton und ihre Nieren allenfalls geringfügig hydronephrotisch. Außerdem konnten keine Verdickungen der arteriellen Gefäßwände gefunden werden. Für den Menschen sind zwei Defizienzen des Aldosteronsynthasegens beschrieben: die Corticosteron-Methyloxidase Defizienz Typ I und Typ II. Typ I wird

verursacht durch Mutationen im CYP11B2 Gen, wodurch eine funktionsunfähige Aldosteronsynthese gebildet wird. Patienten, die unter Corticosteron-Methyloxidase Defizienz Typ I leiden, weisen Aldosteronkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze auf, sowie erhöhte Spiegel des 18-Hydroxy-11-Deoxycorticosterons und erniedrigte Spiegel von 18-Hydroxycorticosteron. Außerdem leiden sie an extremem Salzverlust, erniedrigtem Blutdruck, Hyperkaliämie, Hyponatriämie, und sehr hohen Plasma-Renin-Aktivitäten. Neugeborene weisen zudem metabolische Azidose auf und im Kindesalter leiden sie unter Wachstumsstörungen. Die Typ II-Form der Corticosteron-Methyloxidase Defizienz zeichnet sich durch niedrige Aldosteron- und erhöhte 18-Hydroxycorticosteronspiegel aus. Bei dieser Variante sind lediglich die Funktionen der 18-Hydroxylase und 18 Methyl-Oxidase der Aldosteronsynthese beeinträchtigt, nicht hingegen die der 11 β -Hydroxylaseaktivität. Der Phänotyp unterscheidet sich allerdings nur marginal von dem der Typ I Corticosteron-Methyloxidase Defizienz ¹⁹⁶⁻²⁰⁰.



Auf zellulärer Ebene ist noch nicht eindeutig geklärt, wie die Umwandlung glatter Muskelzellen oder anderer Nierenzellen in Renin-produzierende Zellen reguliert wird. Bestimmte nicht kodierende RNAs, die die Expression von Genen auf posttranskriptioneller Ebene regulieren, sogenannte Mikro-RNAs (miR-330 und miR-125b-5p), sollen an der Ausdifferenzierung und Aufrechterhaltung des Reninzell-Phänotyps beteiligt sein. Ebenso

wurde postuliert, dass eine Signalübertragung über den Notch-Signalweg von Bedeutung sein könnte ²⁰¹. So haben Mäuse, bei denen der durch Notch aktivierbare Transkriptionsfaktor RBP-J ausschließlich in Reninzellen deletiert ist, kaum Renin-bildende Zellen, eine erniedrigte Renin-Genexpression und niedrige Plasma-Renin-Spiegel sowie einen erniedrigten Blutdruck. Auch die metaplastische Transformation von glatten Muskelzellen zu Reninzellen war in diesen Tieren vermindert ²⁰². Für die Umwandlung in eine Renin-bildende Zelle scheint auch der cAMP-Signalweg besonders wichtig zu sein. So konnten Experimente mit Fluoreszenz-markierten glatten Muskelzellen aus der Reninzelllinie zeigen, dass diese nach Zugabe von cAMP-Analoga das Reningen transkribieren und so zu Renin-produzierenden Zellen wurden. Dies ist begleitet von einer Herabregulation Glattmuskel-spezifischer Gene wie β -Glattmuskelaktin und Myosin schwere Kette (MHC). Die Wirkung von cAMP auf die Genexpression wird vermutlich über die Phosphorylierung des cAMP responsive element binding (CREB)-Proteins vermittelt, das im Kern durch Bindung an die cAMP responsive Element- (CRE)-Region im Renin-Promoter-Bereich die Expression des Renin-Gens reguliert ¹²³. Außerdem wurden noch weitere Transkriptionsfaktoren gefunden, die an enhancer- oder Promotor-Regionen des Reningens binden können, und so dessen Transkription regulieren ²⁰³⁻²⁰⁶. Während der Ausdifferenzierung zur Reninzelle wird neben dem Reningen noch eine Vielzahl weiterer Gene reguliert. Es wurde erst kürzlich eine umfassende Auflistung Reninzell-spezifisch hochregulierter Gene veröffentlicht, die durch Untersuchung FACS-isolierter Reninzellen zustande kam ⁷.

Eine detailliertere Betrachtung der Reninzellhyperplasie von Aldosteronsynthase Knockout Mäusen mittels Konfokal- und Elektronenmikroskopie konnte bereits zeigen, dass diese hyperplastischen Zellen dieselbe kuboide Form aufweisen, wie die juxtaglomerulären Reninzellen und dass sie ebenfalls Renin-positive Vesikel enthalten ¹. Dies zeigt, dass diese perivaskulären Reninzellen fähig sind, Renin in Vesikel zu verpacken, was die Voraussetzung für eine regulierte Reninfreisetzung darstellt. Die kontrollierte Exozytose Renin-haltiger Vesikel ^{13,207,208} scheint innerhalb der juxtaglomerulären Zellen durch Aktivierung des cAMP-Signalweges zu verlaufen ^{13,209}.

Es wurde außerdem die Funktionalität der hyperplastischen renalen Reninzellen in Aldosteronsynthase Knockout Tieren am Modell der isoliert perfundierten Mausniere untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Reninsekretion durch Katecholamine und der Hemmbarkeit durch Angiotensin II und den Perfusionsdruck sowie der „paradoxen“ Wirkung von Kalzium keine auffälligen Unterschiede zu den Wildtyp-Nieren gab. Die Funktionalität der perivaskulären Reninzellen unterscheidet sich demnach nicht von der der klassischen juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen ¹.

1.6 Zielsetzung

Bei einer starken Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, wie beispielsweise bei genetischen Defekten innerhalb der RAAS-Kaskade, kommt es zu einer Hyperplasie Renin-produzierender Zellen, die hauptsächlich im perivaskulären Raum um die afferenten Arteriolen auftritt. Über die Herkunft dieser perivaskulären Renin-bildenden Zellen ist bisher noch wenig bekannt.

Als Tiermodell mit Reninzellhyperplasie sollen Mäuse mit einem genetischen Defekt innerhalb des RAAS verwendet werden. Da die meisten dieser Genotypen starke morphologische Veränderungen in der Niere aufweisen, werden Mäuse mit einem Knockout des Aldosteronsynthasegens verwendet, da diese strukturell eher unauffällige Nieren besitzen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Salzabhängigkeit der perivaskulären Renin-bildenden Zellen zu untersuchen, um einen Anhaltspunkt darüber zu erhalten, ob sie bei erhöhtem Bedarf an Renin durch Proliferation bereits bestehender Renin-bildender Zellen neu entstehen oder ob sie durch Transformation aus anderen renalen Zelltypen hervorgehen können. Außerdem soll geklärt werden, ob, bei vermindertem Bedarf an Renin, die perivaskulären Renin-bildenden Zellen durch Apoptose verschwinden, oder lediglich die Produktion von Renin einstellen.

Durch die Stimulierung des RAAS mit Nidrigsalzdiät bzw. durch dessen Suppression durch Hochsalzdiät soll geklärt werden, wie schnell eine Änderung der Salzzufuhr auf die Reninexpression und -sekretion wirkt. Auch die Reinduzierbarkeit der Reninexpression nach deren längerer salzbedingter Suppression wird in dieser Arbeit untersucht. Dazu werden sowohl die Renin mRNA- und Plasma-Renin-Konzentrationen bestimmt als auch immunhistochemische Methoden herangezogen. Gleichzeitig soll die salzabhängige Regulierbarkeit von Genen überprüft werden, deren Expression charakteristisch für Renin-bildende Zellen ist. Auch die Reninzelllinie wurde gekennzeichnet. So soll gewährleistet werden, dass alle Zellen, in denen der Reninpromotor während der Entwicklung aktiv war, einen fluoreszenten Reporter bilden. Dadurch sind diese Zellen auch in der adulten Maus noch nachweisbar. Dies soll Aufschluss über eine mögliche Verwandtschaft der Renin-bildenden Zellen mit anderen renalen Zelltypen geben. Um zu ermitteln, ob die durch erniedrigte Salzzufuhr bedingte Zunahme der Reninexpression und -synthese auf einer Proliferation bereits bestehender Renin-bildender Zellen beruht, bzw. ob bei erhöhter Salzzufuhr die Abnahme der Reninexpression und -synthese durch Apoptose der Renin-produzierenden Zellen reguliert wird, werden Nierengewebeschnitte auf Proliferations- bzw. Apoptosemarker hin untersucht. Des Weiteren soll anhand der ermittelten Fläche der

Reninzelllinie und der entsprechenden Zellkerndichte in diesen Feldern festgestellt werden, ob die Reninzellzahl bei unterschiedlichen Aktivitätszuständen des RAAS zu- oder abnimmt.

Diese Erkenntnisse sollen zu einer genaueren Charakterisierung perivaskulärer Reninbildender Zellen beitragen und auch Aufschluss über die Herkunft dieser Zellen geben.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Genotypisierung

NaOH für gDNA Extraktion

NaOH	25 mM
------	-------

Tris-HCl für gDNA Extraktion (pH 8,0)

Tris-HCl	1 M
----------	-----

TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

Agarosegel

TAE	
Agarose	1,5 %

Perfusion

PBS-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

Fixierlösung (pH 7,4; filtriert)

PBS	1 x
Paraformaldehyd	3 %

Einbettung

Kryoprotektionslösung

Saccharose	18 %
Paraformaldehyd in PBS (filtriert)	1 %

Färbungen**Tris/EDTA Puffer (pH 8,5)**

Tris Base	10 mM
EDTA	1 mM
Tween 20	0.05 %

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

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

Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %
HS	10 %

Blockierlösung für Cx40

PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %
HS	10 %
Triton X-100	0,3 %

Proteinisolierung**TNEET-Puffer (pH 7,5)**

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Triton X-100	1 %

+ Zugabe von Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablette, Roche, Penzberg)

SDS-PAGE**SDS-Probenpuffer (5x)**

Tris	625 mM
Glycerin	50 %
SDS	12,5 %
β-Mercaptoethanol	12,5 %
Bromphenolblau	0,05 %

Laufpuffer (10x)

Tris	0,25 M
Glycin	1,9 M
SDS	1 %

Western Blot**Waschlösung (PBS-T)**

PBS	1 x
Tween 20	0,5 %

Blockierungslösung

PBS	1 x
Magermilchpulver	5 %
Tween 20	0,5 %

TUNEL**PBS-Puffer (pH 7,4)**

NaCl	137 mM
KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

Lösungspuffer (für Proteinase K)

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
EDTA	50 mM

(Endkonzentration: 10 mg/ml)

SSC-Puffer (20x)

Tri-Natriumcitrat	0,3 M
NaCl	3 M

RIA**Maleatpuffer**

Tris	1,22 %
Maleinsäure	1,74 %
EDTA	0,89 %

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Verwendete Mauslinien

Alle Tierexperimente wurden gemäß der „National Institutes of Health guidelines for the care and use of animals in research“ durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Auf optimale Haltungsbedingungen für Nager wurde geachtet (Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Hell-/Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- Aldosteronsynthase Knockout: Knockout des Aldosteronsynthasegens *cyp11b2* (zur Verfügung gestellt von Maria Luisa Sequeira Lopez, University of Virginia)^{87,196,210}.
- Ren1d-Cre: Insertion der Cre-Rekombinase in den Ren1d-Lokus und damit Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Reninpromotors (Knock-in) (zur Verfügung gestellt von Maria Luisa Sequeira Lopez, University of Virginia)⁶⁷.
- mT/mG-Reporter: doppelt-fluoreszierende Cre-Reporter Maus; gezielte Insertion in den Gt(ROSA)26Sor-Lokus; exprimiert membranständiges „tandem dimer tomato“ (mT) vor Cre-vermittelter Exzision und membranständiges „green fluorescent protein“ (mG) nach der Exzision (Jackson Laboratory, Maine, Stock number: 007576)²¹¹ (s. Abbildung 8).

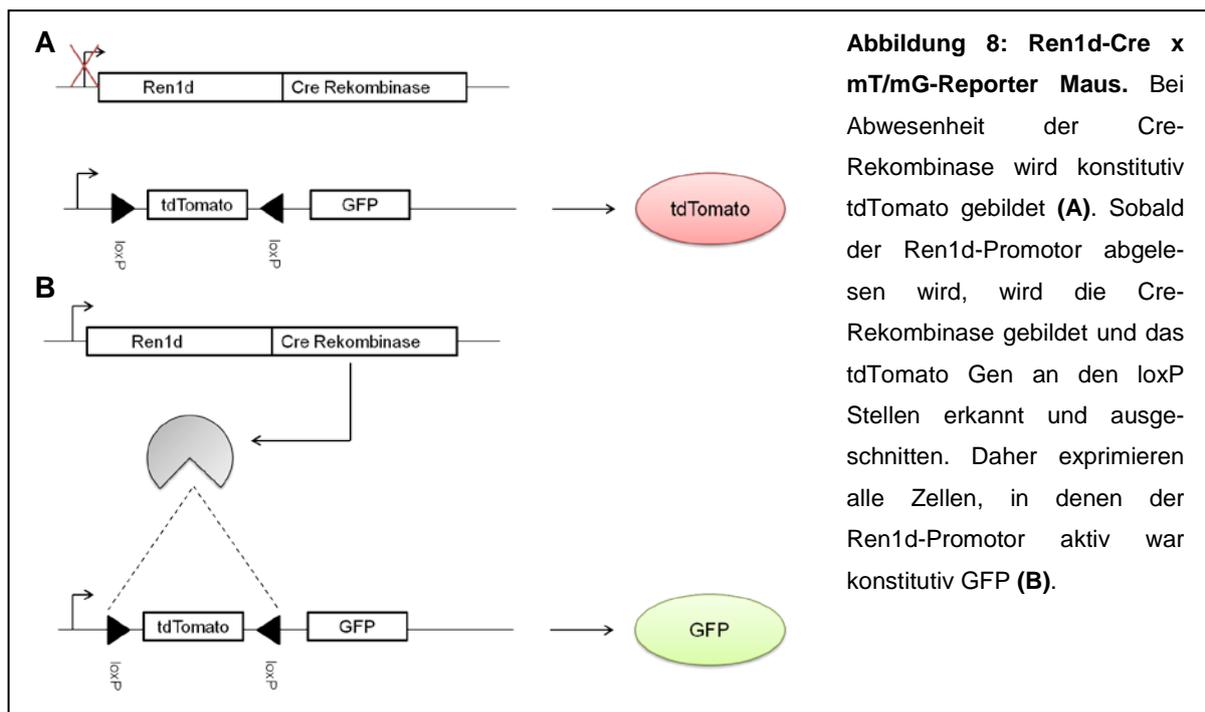
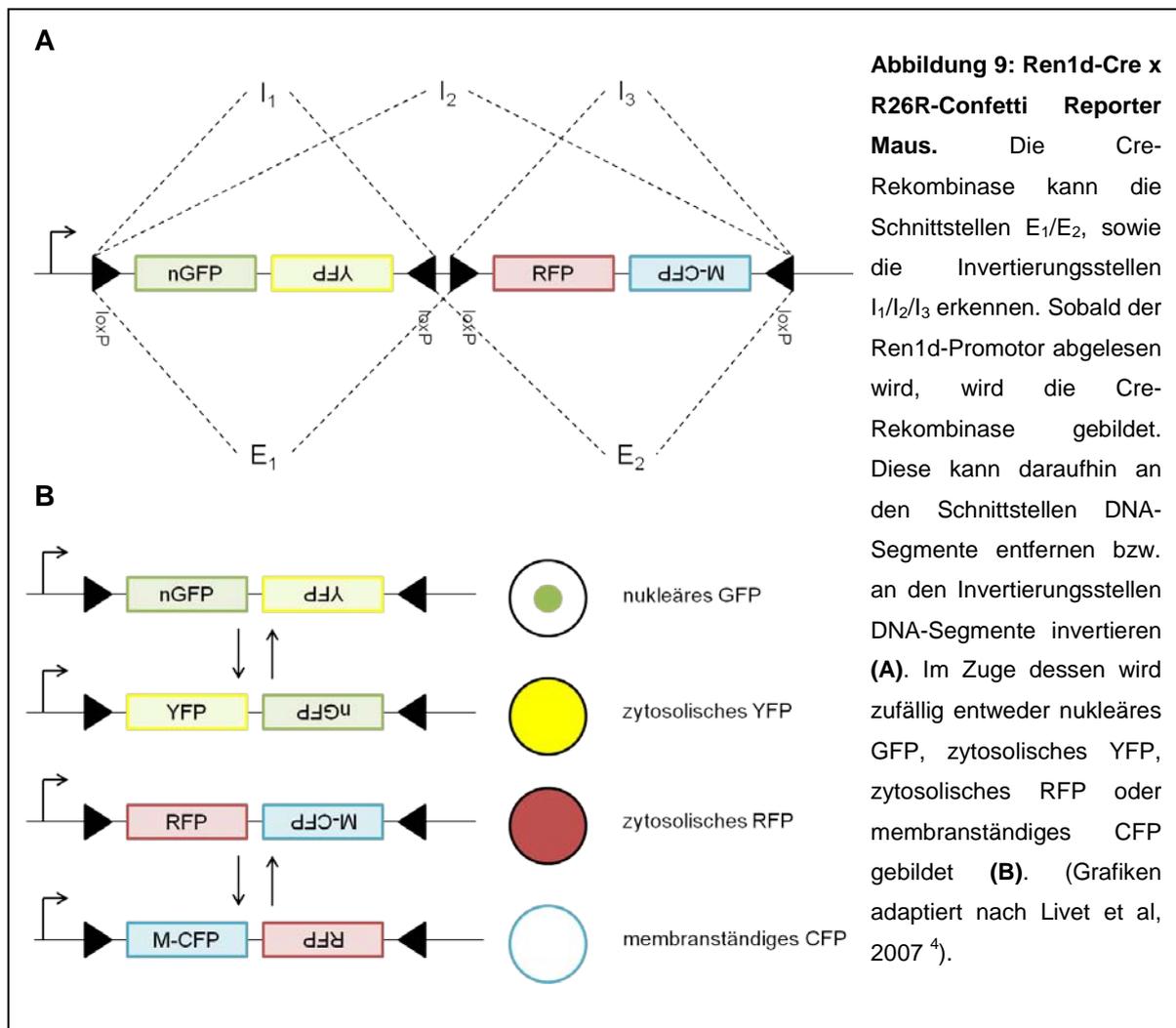


Abbildung 8: Ren1d-Cre x mT/mG-Reporter Maus. Bei Abwesenheit der Cre-Rekombinase wird konstitutiv tdTomato gebildet (**A**). Sobald der Ren1d-Promotor abgelesen wird, wird die Cre-Rekombinase gebildet und das tdTomato Gen an den loxP Stellen erkannt und ausgeschnitten. Daher exprimieren alle Zellen, in denen der Ren1d-Promotor aktiv war konstitutiv GFP (**B**).

- R26R-Confetti-Reporter (Brainbow 2.1): stochastischer mehrfarbiger Cre-Rekombinase Reporter; gezielte Insertion in den Gt(ROSA)26Sor-Lokus; exprimiert zufällig nGFP, RFP, YFP oder M-CFP nach Cre-Rekombinase Aktivität (Jackson Laboratory, Maine, Stock number 013731)^{212,213}. Dieses Modell eignet sich vor allem dafür, um Verwandtschaftsbeziehungen von Zellen und Zelltypen zu verfolgen (s. Abbildung 9).



Nach entsprechenden Verpaarungen wurden demnach folgende Genotypen kombiniert:

- Aldosteronsynthase^{+/+} x Ren1d-Cre x mT/mG
- Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG
- Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x R26R-Confetti

2.2.2 Genotypisierung der Mauslinien

Alle Tiere wurden mittels PCR genotypisiert. Die Extraktion der genomischen DNA geschah wie folgt:

- abschneiden von etwa 2 mm Mausschwanz
- Zugabe von 100 μ l 25 mM NaOH
- Inkubation bei 96°C für 1-1.5 h im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg)
- kurz vortexen und 10 μ l 1 M Tris HCl (pH 8,0) zugeben
- 6 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- 0,5 μ l des erhaltenen Überstands (gDNA) werden in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt

25 μ l PCR-Reaktionsansatz:

15,05 μ l	dd H ₂ O
5 μ l	GoTaq Puffer
0,75 μ l	Sense Primer (10 pmol/ μ l)
0,75 μ l	Antisense Primer 1 (10 pmol/ μ l)
0,75 μ l	Antisense Primer 2 (10 pmol/ μ l)
2 μ l	dNTPs (2,5 mM)
0,2 μ l	GoTaq
0,5 μ l	gDNA

PCR-Protokolle:

Aldosteronsynthese:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	3/5 min	Aktivierung
┌	94 °C	30 s	Denaturierung
35	60-62 °C	30 s	Annealing
└	72 °C	40 s	Elongation
1	72 °C	10 min	Elongation
1	4 °C	∞	

Ren1d-Cre:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	5 min	Aktivierung
┌	94 °C	30 s	Denaturierung
35	58 °C	50 s	Annealing
└	72 °C	50 s	Elongation
1	72 °C	10 min	Elongation
1	4 °C	∞	

mT/mG:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	3/5 min	Aktivierung
┌	94 °C	30 s	Denaturierung
35	64 °C	45 s	Annealing
└	72 °C	45 s	Elongation
1	72 °C	10 min	Elongation
1	4 °C	∞	

R26R-Confetti:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	3 min	Aktivierung
┌	94 °C	30 s	Denaturierung
35	58-60 °C	30 s	Annealing
└	72 °C	30 s	Elongation
1	72 °C	2 min	Elongation
1	4 °C	∞	

Primersequenzen:

Ren1d-Cre:

sense	GAAGGAGAGCAAAGGTAAGAG
antisense 1	GTAGTAGAAGGGGGAGTTGTG
antisense 2	TTGGTGTACGGTCAGTAAATTGGAC

PCR-Produkte: 600 bp wenn Ren1d positiv
400 bp wenn Ren1d-Cre positiv

Aldosteronsynthase:

sense	ACCAGAGCCCAAATGTCTCA
antisense 1	CTGATGCATCTCCAGGTGTA
antisense 2	CTGAACCTGTGGCCGTTTAC

PCR-Produkte: 330 bp bei Aldosteronsynthase^{+/+}
210 bp bei Aldosteronsynthase^{-/-}

mT/mG:

sense	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT
antisense 1	CGAGGCGGATCACAAGCAATA
antisense 2	TCAATGGGCGGGGGTCGTT

PCR-Produkte: 330 bp bei WT
250 bp bei mT/mG

R26R-Confetti:

sense	GAATTAATTCCGGTATAACTTCG
antisense 1	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
antisense 2	CCAGATGACTACCTATCCTC

PCR-Produkte: 386 bp bei WT

300 bp bei R26R-Confetti

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1.5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch horizontale Gelelektrophorese bei 130V aufgetrennt.

2.3 Salzdiäten

Um festzustellen, wie schnell eine Änderung der Reninexpression nach einer Veränderung der Salzzufuhr auftritt, wurde 6-8 Wochen alten Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG Mäusen Futter mit unterschiedlichem Natriumgehalt (Hochsalzdiät: 1,7 % Na; Niedrigsalzdiät: 0,03 % Na, ssniff, Soest) über unterschiedliche Zeiträume (0, 2, 3.5, 21, 42,

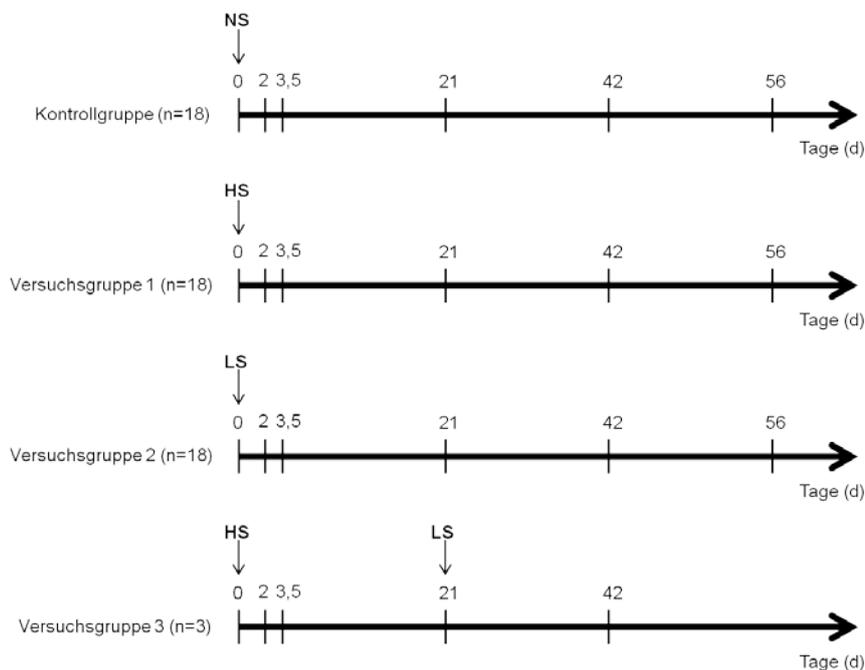


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Während die Kontrollgruppe lediglich Normalnatrium (0,25 % Na) erhielt, wurde Versuchsgruppe 1 mit Futter mit erhöhter Salzkonzentration (1,7 % Na⁺) und Versuchsgruppe 2 mit Futter mit erniedrigter Salzkonzentration (0,03 % Na⁺) gefüttert. Jeweils 3 Tiere wurden jeweils nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen getötet und die Nieren entnommen. Um die Reinduzierbarkeit der Reninexpression nach dessen längerer salzbedingter Suppression zu testen, bekamen die Tiere der 3. Versuchsgruppe zunächst 21 Tage lang HS-Futter und anschließend 21 d lang LS-Futter. Nach insgesamt 42 Tagen wurden auch diese Tiere getötet und die Nieren entnommen.

56 d) verabreicht. Kontrolltiere erhielten Standardfutter mit normalem Natriumgehalt (0,25 % Na, ssniff, Soest). Mindestens 3 Tiere unterschiedlichen Geschlechts wurden nach entweder 0, 2, 3.5, 21, 42 oder 56 Tagen nach Beginn der speziellen Diät getötet und die Nieren entweder in flüssigem Stickstoff für molekularbiologische Untersuchungen (Plasma-Renin-Konzentration, s. Kapitel 2.7.1; mRNA, s. Kapitel 2.7.2) weggefroren, oder für Immunhistochemie entsprechend verarbeitet (s. Kapitel 2.5). Zur Klärung der Frage, ob die Reninexpression nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression wieder normal stimulierbar ist, wurde einer dritten Versuchsgruppe zunächst 21 Tage lang eine Hochsalzdiät und direkt anschließend 21 Tage lang eine Niedrigsalzdiät verabreicht (s. Abbildung 10).

2.4 Retrograde arterielle Perfusion

Die Nieren von adulten Mäusen, die für immunhistochemische Färbungen bestimmt waren, wurden durch retrograde arterielle Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zunächst wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg KG i.p.; WDT, Garbsen) und Xylazin (16 mg/kg KG i.p.; Serumwerk, Bernburg) anästhesiert. Daraufhin wurde das Abdomen geöffnet und die Bauchorta freigelegt. Die jeweils linke Niere wurde mit einem Bindfaden an der zuführenden Nierenarterie abgebunden, da diese Niere für molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden sollte und deshalb nicht perfundiert werden musste. Die Bauchorta wurde danach unterhalb des Abgangs der Nierenarterie (Arteria renalis) mit einer Gefäßklammer abgeklemmt, so dass die Durchblutung der rechten Niere nicht beeinträchtigt wurde. Distal zur Klemme wurde die Aorta abdominalis mittels einer Augenschere geöffnet und ein Perfusionskatheter mit Hilfe eines Gefäßdilators eingeführt. Dann wurde die obere Gefäßklammer entfernt und die Vena cava zum Zweck des Druckausgleichs geöffnet. Über den Perfusionskatheter wurde anschließend mit 10 ml PBS perfundiert. Eine erfolgreiche Perfusion machte sich durch eine rasche Entfärbung der Abdominalorgane bemerkbar. Daraufhin erfolgte die Perfusion mit 40 ml der 3 %-igen Paraformaldehydlösung mit einem konstanten Fluss von 40 ml/3 min. Die perfundierte Niere wurde daraufhin entnommen, halbiert und bis zur Paraffineinbettung in 70 % Methanol bei 4°C aufbewahrt oder für die Kryoeinbettung in eine Kryoprotektionslösung gegeben, bis die Nieren abgesunken waren. Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Nierenhälften in Tissue-Tek-Medium (Hartenstein, Würzburg) eingebettet und langsam mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die rechte Niere wurde ebenfalls entnommen, halbiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -80°C für molekularbiologische Untersuchungen aufbewahrt.

2.5 Immunhistochemische Methoden

2.5.1 Paraffin-Einbettung

Für die Paraffin-Einbettung erfolgte eine Überführung des Nierengewebes in Gewebe-Einbettkassetten (Roth, Karlsruhe) und eine schrittweise Dehydrierung durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration:

- 2 x 30 min. 70 % Methanol (RT)
- 2 x 30 min. 80 % Methanol (RT)
- 2 x 30 min. 90 % Methanol (RT)
- 2 x 30 min. 100 % Methanol (RT)
- 2 x 30 min. 100 % Isopropanol (RT)
- 1 x 30 min. 100 % Isopropanol (45°C)
- 1 x 30 min. Isopropanol/Paraffin (1:1)-Gemisch (55°C)
- 2 x 24 h Paraffin (60°C)
- Einbettung in mit 60°C warmen Paraffin gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen und Aushärten bei RT

Nach Entfernen der eingebetteten Präparate aus den Silikon-Kautschuk-Einbettformen (Roth, Karlsruhe) wurden diese jeweils mit einer Rasierklinge angetrimmt. Der Block wurde in ein Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar) eingespannt. Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen wurden. Daraufhin wurden die Schnitte bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Objektträger zunächst folgendermaßen entparaffiniert:

- 2 x 15 min. 100 % Xylol
- 2 x 10 min. 100 % Isopropanol
- 1 x 5 min. 96 % Isopropanol
- 1 x 5 min. 80 % Isopropanol
- 1 x 5 min. 70 % Isopropanol

Die Färbung erfolgte anschließend gemäß folgendem Protokoll:

Standardprotokoll:

- 3 x 5 min. waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer
- 30 min. blockieren mit 10 % HS/1 % BSA in PBS-Otto bei RT (Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer (Verdünnung des Primärantikörpers in 10 % HS/1 % BSA in PBS-Otto)
- am folgenden Tag: 3 x 5 min. waschen der Präparate mit 1 % BSA in PBS-Otto-Puffer
- Inkubation des Sekundärantikörpers 1,5 h bei RT (unter Lichtausschluss) (Verdünnung des Sekundärantikörpers in 10 % HS/1 % BSA in PBS-Otto)
- 3 x 5 min. waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer (unter Lichtausschluss)
- eindeckeln mit Einbettmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako, Glostrup, Dänemark).

Je nach verwendetem Primärantikörper musste das Standardprotokoll (**S**) leicht modifiziert werden:

- Variante 1 (**V1**): Vor dem Blockieren mit 10 % HS: 20 min. Inkubation in Citratpuffer pH 6.0 (Dako, Glostrup, Dänemark) im 95°C Wasserbad
- Variante 2 (**V2**): Vor dem Blockieren mit 10 % HS: 20 min. Inkubation in Tris-EDTA-Puffer pH 8.5 im 95°C Wasserbad
- Variante 3 (**V3**): Blockierung und Verdünnung des Primär- und Sekundärantikörpers in 10%HS/1%BSA/0,3% Triton X-100 in PBS-Otto-Puffer

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Primärantikörper	Spezies	Klonalität	Verd.	Bestellnummer	Variante
GFP	Huhn	polyklonal	1:600	ab13970	S
Renin	Ziege	polyklonal	1:400	AF4277	S
α-SMA	Maus	monoklonal	1:600	ab7817	S
Cx40	Kaninchen	polyklonal	1:250	CX40-A	V2 + V3
Akr1b7	Ziege	polyklonal	1:100	Sc-27763	S
COX-2	Kaninchen	polyklonal	1:200	160126	V2
Ki-67	Ratte	monoklonal	1:50	M7249	V1

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Sekundärantikörper	Verd.	Firma	Konjugation
Esel-anti-Huhn	1:400	Dianova	Cy2
Esel-anti-Ziege	1:400	Dianova	Cy5
Esel-anti-Maus	1:400	Dianova	Cy2/Cy5
Esel-anti-Kaninchen	1:400	Dianova	TRITC
Esel-anti-Ratte	1:400	Dianova	TRITC
DAPI	1:200	Dianova	

2.5.3 TUNEL Färbung

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen auf Nierengewebeschnitten wurde der TUNEL Assay (Promega, Mannheim) verwendet. Das verwendete Protokoll verlief wie folgt:

- entparaffinieren bis 50 % Isopropanol
- kurz in dH₂O
- 5 min. in 0,89 % NaCl
- 2x 5 min. in 1x PBS
- 15 min. in 4 % PFA
- 2x 5 min. in 1x PBS
- 8 min. in Proteinase K (1:500 in 1x PBS)
- 10 min. in Equilibrierungspuffer (Kit)
- 1 h in Inkubationslösung bei 37 °C (unter Lichtausschluss) (Inkubationslösung bestehend aus: 45 µl Equilibrierungspuffer (Kit) + 5 µl Nukleotidmix (Kit) + 1 µl rTdT pro 2 Schnitte)
- 15 min. in 2x SSC-Puffer
- 5 min. in 1x PBS
- 5 min. in dH₂O

Weitere Kofärbungen wurden anschließend wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durchgeführt.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung und Aufnahme des immunfluoreszent gefärbten Nierengewebes erfolgte mit Hilfe eines Axiovert200M-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) sowie der Software ZEN lite (2012) von Zeiss. Die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper wurden unter Zuhilfenahme passender Fluoreszenzfilter angeregt und das entstandene Emissionslicht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen

Tabelle 3: Für Fluoreszenzfärbungen verwendete Konjugate mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen

Konjugation	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy2	450-490	500-550
TRITC	533-558	570-640
Cy5	625-655	665-715
DAPI	345	455

2.6.2 Konfokale Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von Nierengewebe von R26R-Confetti Reportermausen ein Carl Zeiss LSM710-Mikroskop verwendet. Dabei handelt es sich um ein konfokales Laser Scanning-Mikroskop, bei dem das Präparat, mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls abgerastert wird. Über ein bewegliches Spiegelsystem wurde der Laser über die Nierenschnitte gefahren und dabei entstandenes Fluoreszenzlicht von einem Detektor aufgefangen und an einen Computer weitergeleitet. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Software Zeiss ZEN lite (2012). Zur Anregung der Fluoreszenz wurden folgende Wellenlängen verwendet:

Tabelle 4: Fluorochrome der R26R-Confetti-Reportermaus mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen

Fluorochrom	Anregung (nm)	Emission (nm)
GFP	514	552
RFP	561	668
YFP	488	503
CFP	405	485

2.6.3 Bestimmung der präglomerulären GFP-, Renin- und Cx40-positiven Flächen

Zur Bestimmung der präglomerulären GFP-, Renin- und Cx40-positiven Flächen bei unterschiedlichen Salzdiäten wurden jeweils 10 verschiedenen Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Verarbeitung erfolgte anschließend mit Hilfe der Software Zeiss ZEN lite (2012). Dabei wurde unter der Rubrik „Grafik“ das Tool „Kontur“ ausgewählt und damit das jeweilige Feld umkreist. Man erhält dann automatisch die Größe des umrandeten Feldes in μm^2 . So wurde mit jedem präglomerulären Feld in den 10 Aufnahmen verfahren und über alle Werte der Mittelwert gebildet. Dadurch konnte die durchschnittliche Fläche der präglomerulären GFP-, Renin- oder Cx40-positiven Felder ermittelt werden.

2.6.4 Bestimmung der Zellkerndichte

Um die Zellkerndichte in den GFP-positiven präglomerulären Feldern zu bestimmen, wurde zunächst die Fläche wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben bestimmt. Daraufhin wurden die mit DAPI markierten Zellkerne innerhalb dieser Fläche, für jedes einzelne GFP-positiv präglomeruläre Feld ausgezählt. Der Quotient aus Zellkernen pro Fläche ergab schließlich die Zellkerndichte (Kerne/ μm^2).

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration

2.7.1.1 Blutentnahme

Vor und nach der jeweiligen Diät wurde den Mäusen Blut aus der Vena facialis durch Punktion entnommen und in eine Kunststoff EDTA Kapillare überführt (Sanguis Counting, Nümbrecht). Die Kapillaren wurden anschließend an einer Seite mit Hilfe eines Hämatokrit-Versiegelungskitts (Brand, Wertheim) verschlossen und in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) bei 12000 rpm, 4 min. zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für die Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration mittels Radioimmunoassay aufbewahrt.

2.7.1.2 Radioimmunoassay (RIA)

Um die Plasma-Renin-Konzentration zu bestimmen, wurde die von Renin katalysierte Reaktion betrachtet, bei welcher Angiotensin I aus Angiotensinogen gebildet wird. Die zu untersuchenden Plasmaproben wurden dazu zusammen mit Reninsubstrat (Angiotensinogen aus dem Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten stammend) inkubiert. Die Menge an entstandenem Angiotensin I war proportional zum Reningehalt der untersuchten Probe. Sie wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay-Kits (RIA; DiaSorin, Saluggia, Italien) mit den vom Hersteller bereitgestellten Reagenzien und Standards bestimmt.

Die zu vermessende Plasmaprobe wurde nach erwarteter Plasmareninmenge (1:10 – 1:2000), das Reninsubstrat 1:5 mit Maleatpuffer verdünnt. Nun wurden 50 µl verdünnte Probe, 50 µl Mix aus 4 Teilen verdünntem Reninsubstrat und 5 Teilen RIA-Reaktionspuffer (Kit), sowie 2 µl Enzyminhibitor (PMSF, Kit) vermengt. Von diesem Mix wurde jeweils eine Hälfte bei 37°C und die andere bei 4°C 90 min lang inkubiert. Anschließend wurden jeweils 45 µl mit 500 µl Tracer (Kit) in RIA-Röhrchen (Kit) überführt und diese zusammen mit 5 Standardproben (Kit) 3-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationsphase binden proportional zur vorhandenen Konzentration Angiotensin I-Moleküle an die mit anti-Angiotensin I-Antikörpern beschichtete Innenseite der RIA-Röhrchen. An die übrigen Bindestellen binden sich kompetitiv die radioaktiven Tracermoleküle. Anschließend wurde die Radioaktivität der Röhrchen gemessen, und anhand einer aus den Standardwerten gebildeten Kurve die Angiotensin I-Konzentration in den Proben bestimmt.

2.7.1.3 Isoliert-perfundierte Niere (IPN)

Die Methode der isoliert perfundierten Niere, wurde entsprechend nach dem Protokoll von Schweda et al., (2003) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, den Einfluss verschiedener Parameter auf die Sekretion von Renin in vivo zu untersuchen. Die Mausniere wurde dazu ex situ in einer speziellen Wärmeschale über die Nierenarterie perfundiert. Die Ableitung des Perfusates erfolgte über eine Kanulierung der renalen Vene. Als Basislösung für die Perfusion der Niere wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, welche mit Rinderserum-Albumin (6 g/100 ml) und humanen roten Blutkörperchen (10 % Hämatokrit) versetzt war. Es konnten Veränderungen der Renin-Sekretion als Reaktion auf Zugabe von Isoproterenol, Angiotensin II oder Ethylenglycol-144 Tetraacetat (EGTA) untersucht werden. Zur Beurteilung der Reninsekretionsrate wurden alle 2 min. Proben des venösen Abflusses gesammelt und die Reninaktivität im Probenvolumen anschließend mittels Radioimmunoassay (s. 2.7.1.2) bestimmt. Unter der Reninsekretionsrate versteht

man die Reninaktivität (ng ANG-I/ml*h⁻¹ des Perfusates) multipliziert mit dem Perfusatfluss (ml/g Organgewicht*min⁻¹).

2.7.2 Bestimmung der Renin mRNA-Konzentration

2.7.2.1 Isolierung renaler mRNA

Die Methode der RNA-Isolierung aus Nieren basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987)²¹⁴. Zunächst wurde das Nierengewebe in Trizol-Reagenz homogenisiert. Trizol ist eine einphasige Lösung, die Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Mit Hilfe von Chloroform folgte die Auftrennung des Homogenisats in drei Phasen. Die RNA wurde anschließend mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt.

Bei jedem Arbeitsschritt wurden zur Vermeidung von RNase-Kontamination Latex-Handschuhe getragen. Soweit möglich wurden RNase-freie Einmal-Artikel und -Geräte verwendet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt und sämtliche Arbeitsschritte, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

Protokoll zur RNA-Isolierung:

- 1 ml TRISure (Trizol)-Reagenz für ½ adulte Mausniere in 12 ml-Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30 s mit einem Ultra-Turrax-Mixer homogenisieren
- Mix in 2 ml Eppendorf-Cups überführen und 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen (Proteine denaturieren und lösen sich in Phenol)
- 200 µl Chloroform zugeben; schütteln (nicht vortexen)
- 20 min. bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugieren
- ca. 500 µl wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Cup überführen; dabei auf keinen Fall Interphase mitnehmen (unten rote Phenolphase - dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500 µl) mit Isopropanol mischen und kräftig schütteln
- 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen (Fällung der RNA)
- 10 min. bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 75 % Ethanol aufnehmen
- 5 min. bei 4 °C und 7500 rpm zentrifugieren; Überstand abkippen

- Pellet 10 min. bei Raumtemperatur trocknen lassen und je nach Größe in 100-300 µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2 min. bei 65 °C im Schüttler resuspendieren; bei -80 °C lagern

2.7.2.2 Quantifizierung der mRNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop Spektralphotometer Gerätes (Peqlab, Erlangen) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei beiden Wellenlängen wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

2.7.2.3 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde im nächsten Schritt mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um dabei nur mRNA-Moleküle zu transkribieren, wurden Oligo (dT)₁₅-Primer verwendet, welche selektiv an den 3'-poly(A)-Schwanz der renalen mRNA binden.

1 µg der Ausgangs-RNA wurde mit 1 µl Oligo (dT)₁₅-Primer vermengt und der Ansatz mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach 5 min bei 65 °C wurde der Ansatz auf Eis gestellt und ein Mix aus 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase, 1 µl dNTPs, 4 µl 5 x First Strand-Puffer und 3 µl H₂O zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte während 1 h bei 37 °C. Abschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 2 min. auf 96 °C erhitzt. Vor der weiteren Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die erhaltene cDNA mit 30 µl H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.7.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ist es möglich, DNA zu vervielfältigen und gleichzeitig Auskunft über die Menge der amplifizierten DNA zu erhalten. Dies geschieht durch einen Fluoreszenzfarbstoff (hier: SYBRGreen), der sich während jedem Vervielfältigungsschritt an die neu gebildete doppelsträngige DNA anlagert. Das Signal des Farbstoffs wird nach jedem Zyklus neu gemessen und korreliert quantitativ mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt.

Um die quantitative Echtzeit-PCR durchzuführen wurde das Lightcycler 480 SYBR Green I Master Kit und ein Roche Lightcycler LC480 genutzt. Zum Ausgangsmaterial von 1 µl cDNA wurden 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix (Roche, Penzberg) sowie je 0,5 µl des sense- und antisense-Primers (je 10 pmol) und 3 µl H₂O gegeben. Auf eine

Aktivierungsphase (15 min. bei 95 °C) folgten 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierungsphase (15 s bei 95 °C), Annealingphase (20s bei 58°C) und Elongationsphase (20 s bei 72 °C). Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Um das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA zu analysieren, wurde nach Ablauf des Amplifikationsprogrammes die DNA langsam (0,1 °C/s) von 60 °C auf 95 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Haushaltsgen diente GAPDH.

2.7.3 Quantitative Bestimmung der Renin-Proteinmenge

2.7.3.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Für die Proteinisolierung wurde jeweils eine halbe Niere gewogen und pro Milligramm des Organs die 10-fache Menge TNEET-Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Nieren mittels Ultraturrax homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 12.500 rpm für 20 Minuten bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des BCA-Kits ermittelt, wobei die homogenisierten Proben zur Vermessung in dem Kit stets 1:10 in TNEET-Puffer verdünnt wurden. 25 µl der Probenverdünnungen sowie der jeweiligen Standardverdünnungen (für die Herstellung der Standardverdünnungsreihe siehe Anleitung BCA-Kit Thermo Scientific, Dreieich) wurden mit 200 µl BCA-Arbeitslösung (für die Herstellung der BCA-Arbeitslösung siehe Anleitung BCA-Kit Thermo Scientific, Dreieich) versehen und 30 Minuten im Inkubator bei 37°C geschüttelt. Danach folgte die Extinktionsmessung bei 562 nm mit dem ELISA Reader (Anthos, Krefeld). Sämtliche Schritte der Probenvorbereitung mit Ausnahme der Proteinbestimmung wurden auf Eis durchgeführt.

2.7.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versehen und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und danach nicht mehr auf Eis gestellt. Es wurden jeweils 5 µg der zuvor bestimmten Gesamtproteinmenge auf das SDS-Gel (Bio-Rad, München) aufgetragen und die Proteinbanden bei 110 Volt für 120 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt (Apparatur: Bio-Rad, München). Anschließend wurden die Proteinbanden bei 150 Milliampere für 120 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran mit einem Porendurchmesser von 0.45 µm (Bio-Rad, München) mittels Western-blotting (Apparatur: Bio-Rad, München) übertragen.

2.7.3.3 Immunmarkierung der Reninproteinbanden

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Western-blotting für 2 Stunden in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde einmal für 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und die Membran über Nacht bei 4°C (oder 2 Stunden bei Raumtemperatur) mit dem primären Antikörper gegen Renin inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal für 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Daraufhin wurde nochmals 3-mal für 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Thermo Scientific, Dreieich). Dabei wurden die Lösungen 1 und 2 des Kits im Verhältnis 1 zu 1 vermischt und auf die angetrocknete Membran gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 50-60 Sekunden, wurde überschüssige ECL-Flüssigkeit entfernt und die Membran im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette für mindestens 5 Minuten auf einen Film (GE Healthcare, München) aufgelegt. Anschließend wurde der Film mit Entwicklerlösung (AGFA, Morsel, Belgien) inkubiert bis Banden zu erkennen waren, mit Wasser gespült und danach mit Fixierungslösung (AGFA, Morsel, Belgien) fixiert. Nach einer Trocknungsphase von 50 Minuten konnte der Film abfotografiert werden.

Tabelle 5: Verwendeter Primärantikörper für die Immunmarkierung von Western Blots

Primärantikörper	Spezies	Klonalität	Verd.	Bestellnummer
Renin	Ziege	polyklonal	1:1000	AF4277

Tabelle 6: Verwendeter Sekundärantikörper für die Immunmarkierung von Western Blots

Sekundärantikörper	Firma	Bestellnummer	Verd.	Konjugation
Esel-anti-Ziege	Santa Cruz	SC-2033	1:2000	HRP

Die Quantifizierung des Reninproteins wurde anschließend mit Hilfe des Programmes Bio1D durchgeführt. Dabei wurde die Intensität der Reninproteinbanden, welche sich auf Höhe der 37 kDa Markierung des Standards befanden, gemessen.

2.8 Statistik

Für jeden Punkt bzw. jeden Balken der Diagramme wurden mindestens 3 Tiere untersucht, um den Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) bilden zu können. Alle Daten stammen von männlichen und weiblichen Mäusen, da keine signifikanten

geschlechtsabhängigen Unterschiede zu beobachten waren. Die Entnahme der Niere von unterschiedlich behandelten Mäusen wurde als Letalexperiment durchgeführt, weshalb sich die Daten zu bestimmten Zeitpunkten der Diäten (0, 2, 3.5, 21, 42, 56 Tage Niedrig-, Normal- und Hochsalzdiät) auf einmalige Messungen einzelner Mäuse beziehen. Dementsprechend wurde der ungepaarte Student's t-test zur Berechnung von Signifikanzen verwendet. Unterschiede wurden ab einem P-Wert < 0.05 als signifikant bezeichnet. 1.6 Zielsetzung

3. Ergebnisse

3.1 Änderung der Reninexpression und -sekretion in Abhängigkeit von der Salzdiät

Um zu ermitteln, wie stark und wie schnell sich eine Änderung der Salzzufuhr auf die Renin-expression und -sekretion in der Niere auswirkt, wurde adulten Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG Mäusen Futter mit unterschiedlichem Natriumgehalt (Niedrigsalzdiät: 0.03 % Na⁺, Hochsalzdiät: 1.7 % Na⁺) über unterschiedliche Zeiträume (0, 2, 3.5, 21, 42, 56 Tage) verabreicht. Kontrolltiere erhielten Standardfutter mit normalem Natriumgehalt (Normalsalzdiät: 0.25 % Na⁺). Mindestens 3 Tiere unterschiedlichen Geschlechts wurden nach entweder 0, 2, 3.5, 21, 42 oder 56 Tagen nach Beginn der jeweiligen Diät getötet und die Renin mRNA Expression und Plasma-Renin-Konzentration untersucht, sowie immunhistochemische Färbungen angefertigt. Außerdem wurde die Fläche präglomerulärer Reninzellfelder und die Quantität des Reninproteins nach den verschiedenen Salzdiäten bestimmt.

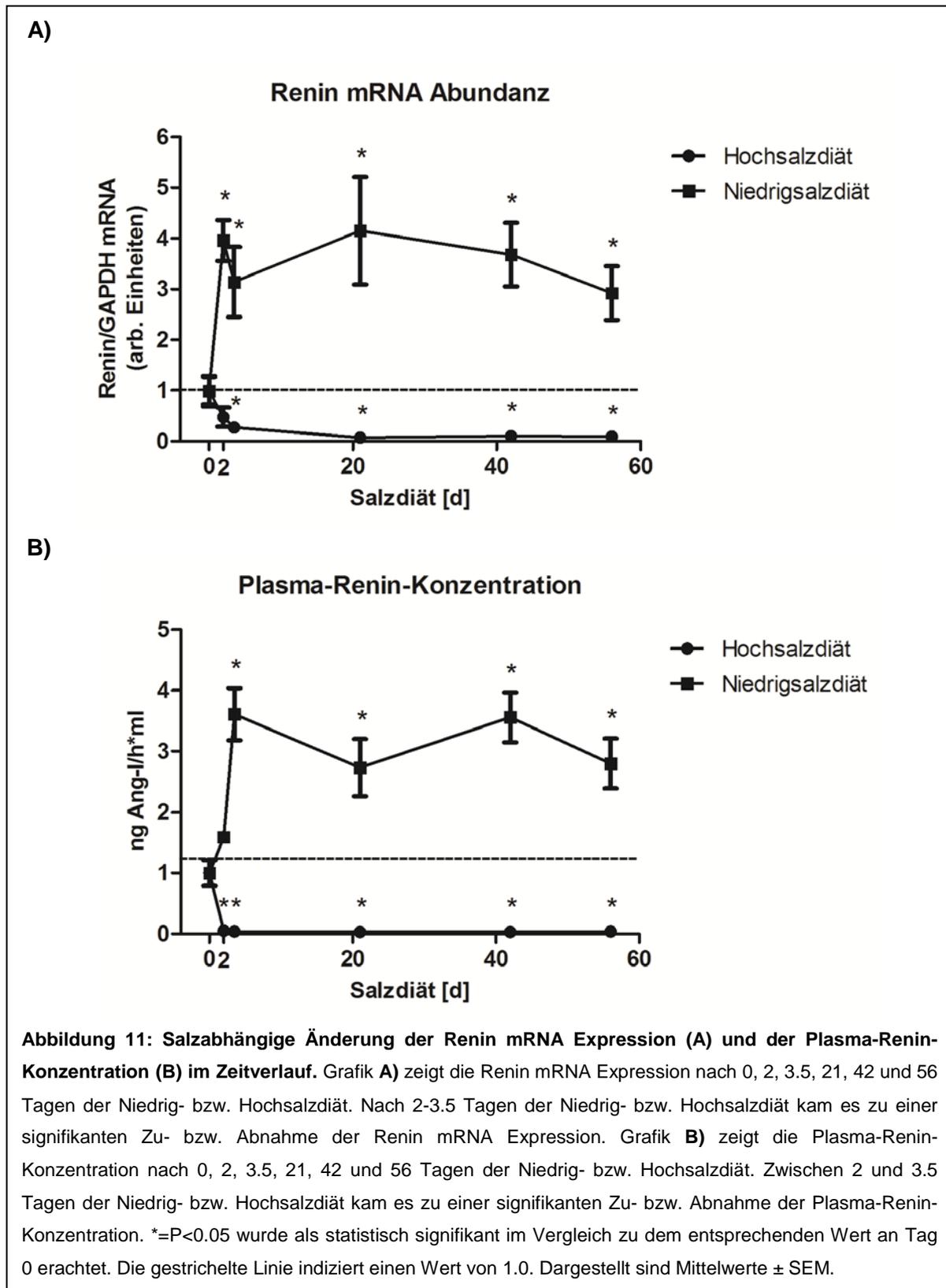
3.1.1 Renin mRNA Expression

Bei der Untersuchung der Renin mRNA Expression unter Niedrigsalzdiät zeigte sich nach 2 Tagen ein 4-facher Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0. Im weiteren Zeitverlauf der Niedrigsalzdiät blieben die Renin mRNA Werte innerhalb der Streuung auf diesem Niveau konstant. Unter Hochsalzdiät konnte eine Halbierung der Renin-mRNA-Werte nach dem zweiten Tag der Diät im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 festgestellt werden. Die Renin mRNA Expression nahm daraufhin bis Tag 21 stetig ab und blieb im folgenden Zeitverlauf konstant niedrig. Dabei kam es zu einem Rückgang der Renin mRNA Expression um bis zu 92% (s. Abbildung 11A). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Renin mRNA Expression (nicht gezeigt).

3.1.2 Plasma-Renin-Konzentration

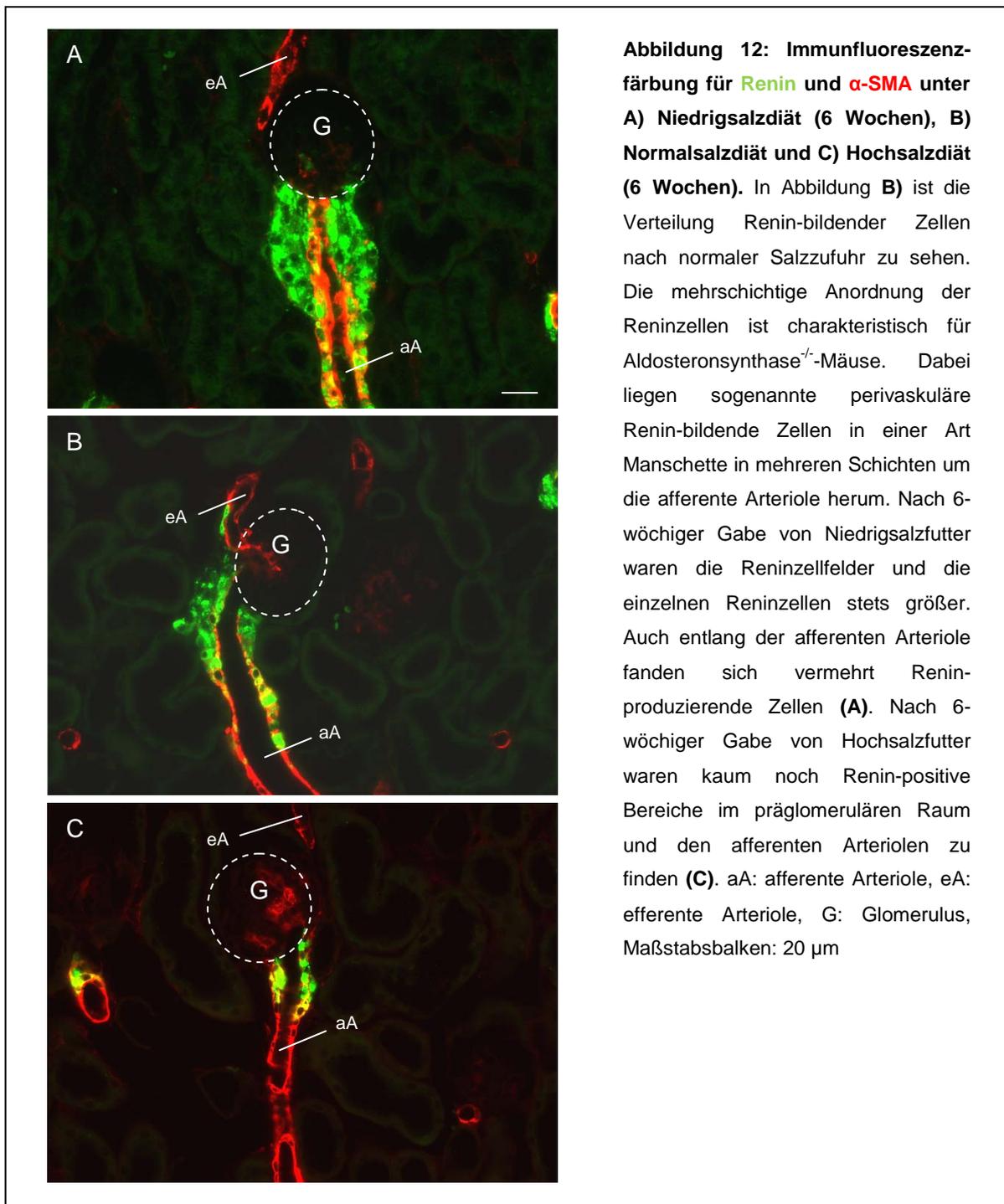
Die Plasma-Renin-Konzentration stieg nach 3.5 Tagen der Niedrigsalzdiät etwa auf das 3.6-fache, ausgehend von der Plasma-Renin-Konzentration an Tag 0. Sie blieb während der fortdauernden Niedrigsalzdiät im Mittel bei etwa 10790 ng Ang-I/h*ml konstant. Durch die Gabe von Hochsalzfutter reduzierte sich die Plasma-Renin-Konzentration nach 2 Tagen der Diät um 97%. Danach blieben die Werte bei andauernder Hochsalzdiät (3.5, 21, 42 und 56

Tage) bei durchschnittlich 137 ng Ang-I/h*ml konstant (s. Abbildung 11B). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Plasma-Renin-Konzentration von durchschnittlich 3800 ng Ang-I/h*ml (nicht gezeigt).



3.1.3 Immunhistochemische Färbung

Für eine visuelle Darstellung der Lokalisation Renin-bildender Zellen in Abhängigkeit von der Salzzufuhr wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Dabei wurde in Paraffin eingebettetes Nierengewebe von Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen verwendet. In Abbildung 12B ist der Nierengewebsschnitt eines Tieres zu sehen, das eine normale Salzdiät erhalten hatte, um die normale Lokalisation Renin-produzierender Zellen in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen darzustellen. Die Renin-bildenden Zellen (grün) ordneten sich hier im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten



um die afferente Arteriole (rot) herum an. Außerdem waren Renin-bildende Zellen entlang der afferenten Arteriole zu finden. In Abbildung 12A ist ein Gewebeschnitt eines 6 Wochen lang mit Nidrigsalz behandelten Tieres zu sehen. Die in grün Immunfluoreszenz-gefärbten Reninzellfelder waren stets erheblich größer als die Reninzellfelder unter Normalsalzdiät (vgl. Abbildung 12B). Wie in der immunhistochemischen Färbung in Abbildung 12C exemplarisch zu sehen ist, führte eine 6 Wochen lange Fütterung mit Hochsalzdiät zu einer starken Abnahme Renin-positiver Bereiche im präglomerulären Raum und innerhalb der afferenten Arteriole.

3.1.4 Bestimmung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder

Durch die Bestimmung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder pro Glomerulus sollte festgestellt werden, ob und wie stark sich die Fläche der Reninzellfelder in Abhängigkeit von der Salzzufuhr verändert. Unter Nidrigsalzdiät vergrößerte sich die Fläche der Renin-positiven Zellfelder pro Glomerulus nach 2 Tagen von $1724 \mu\text{m}^2$ (an Tag 0) auf $2707 \mu\text{m}^2$. Dies entspricht einer Flächenzunahme um 57%. Im weiteren Zeitverlauf der Nidrigsalzdiät blieb die durchschnittliche Fläche daraufhin konstant bei $2634 \mu\text{m}^2$. Unter Hochsalzdiät verringerte sich die Fläche der präglomerulären Reninzellfelder pro Glomerulus stetig bis Tag 56. An diesem Tag betrug die durchschnittliche Flächengröße der präglomerulären Reninzellfelder pro Glomerulus noch $277 \mu\text{m}^2$. Dies entspricht einer Verkleinerung um 84%, ausgehend von der Zellfeldfläche an Tag 0 der Diät (s. Abbildung 13A). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Fläche von durchschnittlich $1715 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (nicht gezeigt).

3.1.5 Quantitative Bestimmung des Reninproteins

Zur Quantifizierung des Reninproteins wurden Western Blots angefertigt und die Intensität der Reninproteinbanden an den Tagen 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 der Nidrig- bzw. Hochsalzdiät bestimmt. Unter Nidrigsalzdiät kam es an Tag 3.5 zu einer signifikanten Steigerung der Intensität der Reninbanden und damit der Quantität des Reninproteins, verglichen mit der gemessenen Intensität an Tag 0 um 30%. Im weiteren Zeitverlauf der Nidrigsalzdiät stieg die Intensität noch weiter, aber maximal um 63%, ausgehend von der Intensitätsmessung an Tag 0. Ein signifikanter Effekt auf die Quantität des Reninproteins durch Hochsalzdiät konnte an Tag 3.5 festgestellt werden. Dabei wurde eine Abnahme der Intensität um 42% im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 beobachtet. Im weiteren Verlauf nahm die Intensität noch weiter ab, aber maximal um 82% (s. Abbildung 13B).

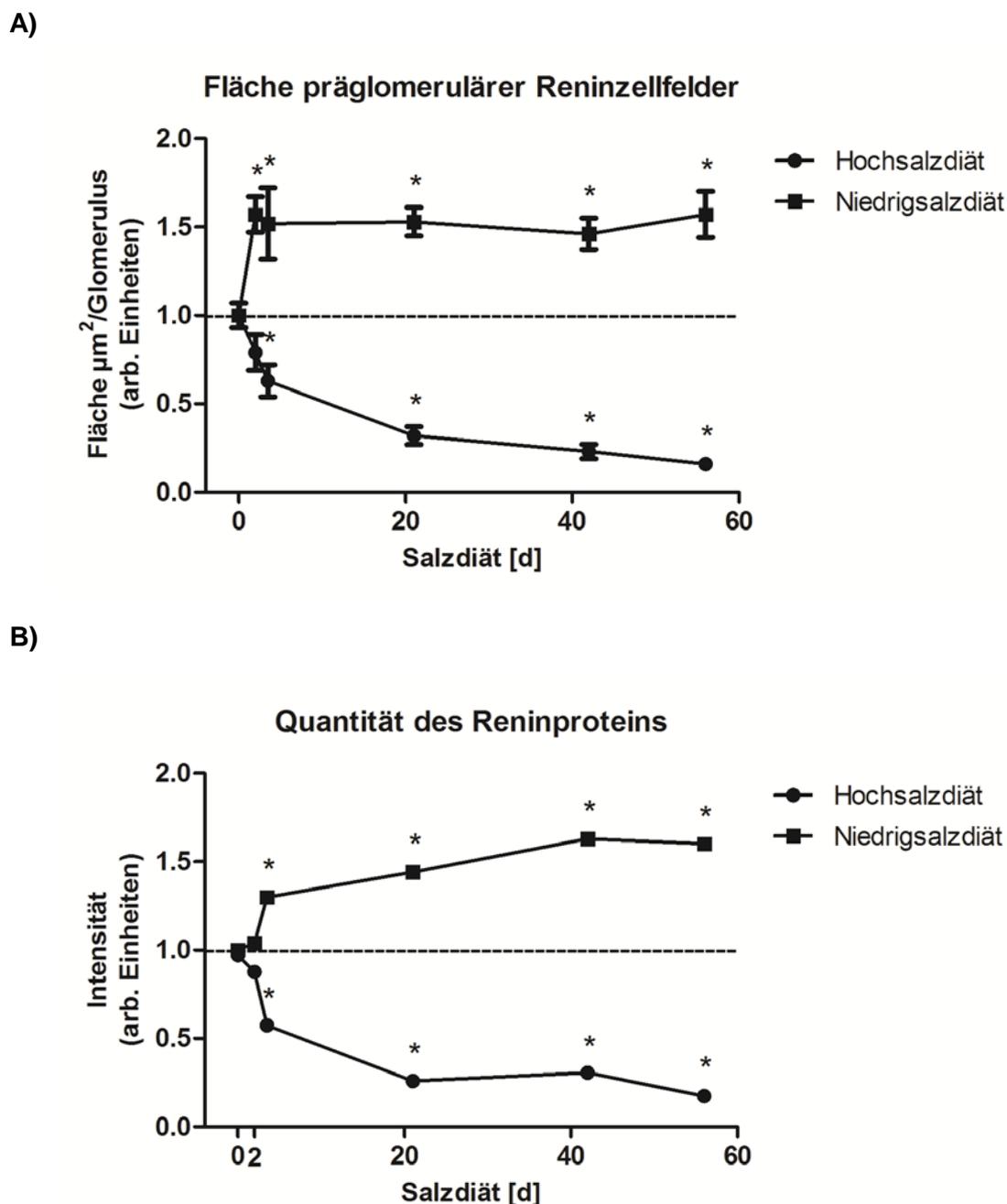


Abbildung 13: Salzabhängige Änderung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder (A) und der Quantität des Reninproteins in der Niere (B) im Zeitverlauf. Grafik A) zeigt die Veränderung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. Nach 2 bzw. 3.5 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder. Grafik B) zeigt die salzabhängige Veränderung der Reninproteinmenge nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. Die Intensität entspricht dabei der Quantität. Nach jeweils 3.5 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Zu- bzw. Abnahme der Reninproteinmenge. $*=P<0.05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zu dem entsprechenden Wert an Tag 0 erachtet. Die gestrichelte Linie indiziert einen Wert von 1.0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.2 Mit Renin koregulierte Gene in der Niere

Es sind bereits verschiedene Gene und deren Proteine bekannt, die zusammen mit Renin in Renin-produzierenden Zellen koreguliert werden. Darunter zählen vor allem das Gap-Junction Protein Connexin 40 (Cx40) und die Aldose-Ketose-Reduktase 1b7 (Akr1b7). Es sollte untersucht werden, ob eine Änderung der Salzzufuhr die Cx40- bzw. Akr1b7 Genexpression beeinflusst und ob eine gesteigerte bzw. verminderte Salzaufnahme die Fläche der Cx40-positiven präglomerulären Zellfelder verändert. Auch von dem Prostaglandin Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird angenommen, dass es die Expression von Renin beeinflusst. Aus diesem Grund wurde auch COX-2 auf eine mögliche Salzabhängigkeit hin untersucht.

3.2.1 Connexin 40

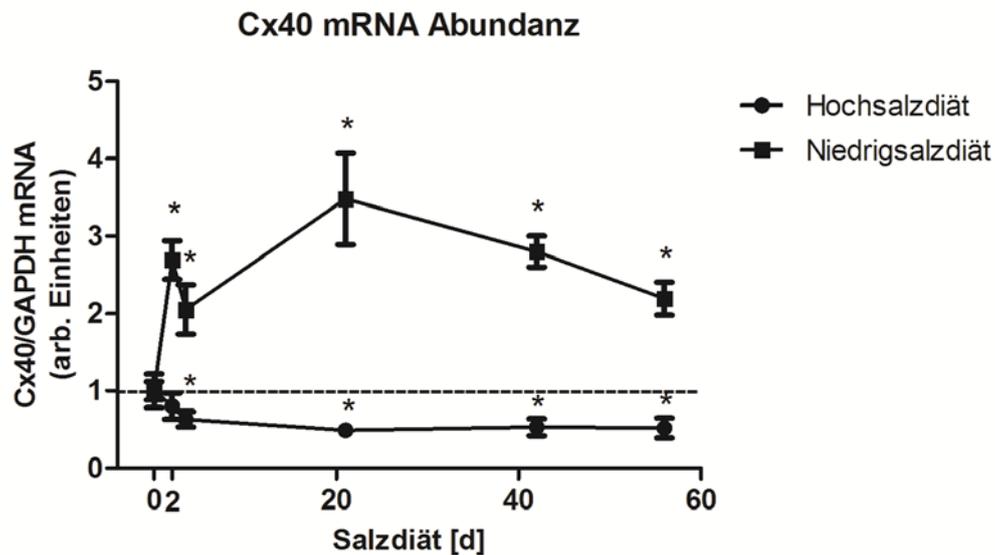
Das Gap-Junction Protein Connexin 40 verbindet die juxtaglomerulären Zellen untereinander, mit dem Endothel der Blutgefäße und mit dem benachbarten extraglomerulären Mesangium. Cx40 ist innerhalb des Glomerulus in den intraglomerulären Mesangialzellen lokalisiert. Studien zeigten, dass die Expression von Cx40 eng mit der Expression und Synthese von Renin verbunden ist ¹³⁵.

Die Bestimmung der Cx40 mRNA Expression unter Nidrigsalzdiät ergab einen signifikanten Anstieg um das 2.5-fache an Tag 2 der Diät verglichen mit der Cx40 mRNA Expression an Tag 0. Die Cx40 mRNA Expression blieb daraufhin im weiteren Zeitverlauf im Durchschnitt konstant. Unter Hochsalzdiät zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Cx40 mRNA Werte an Tag 3.5 um 37%. Bei länger andauernder Gabe von Hochsalzfutter kam es maximal zu einem Rückgang der Cx40 mRNA Expression um 51% (s. Abbildung 14A). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Cx40 mRNA Expression (nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Fläche der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder unter Nidrigsalzdiät ergab eine signifikante Flächenzunahme an Tag 2 der Diät um 34% (von 1805 μm^2 pro Glomerulus an Tag 0 auf 2412 μm^2 pro Glomerulus an Tag 2 der Nidrigsalzdiät). Maximal kam es unter Nidrigsalzdiät zu einem Anstieg der Fläche präglomerulärer Cx40-positiver Zellfelder um 58% (auf 2698 μm^2 pro Glomerulus). Unter Hochsalzdiät kam es an Tag 3.5 zu einer signifikanten Verringerung der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder von 1805 μm^2 pro Glomerulus auf 1220 μm^2 pro Glomerulus. Dies entspricht einer Verkleinerung um 32%. Maximal konnte unter Hochsalzdiät eine Verkleinerung der Fläche der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder um 55% festgestellt werden (s. Abbildung 14B). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante

Fläche der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder von durchschnittlich $1820 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (nicht gezeigt).

A)



B)

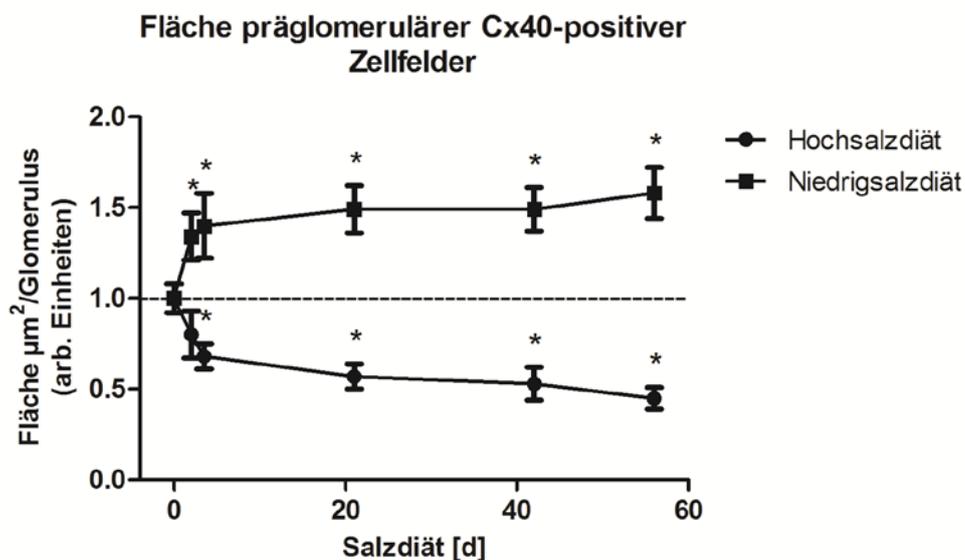


Abbildung 14: Salzabhängige Änderung der Cx40 mRNA Expression (A) und der Fläche Cx40-positiver präglomerulärer Zellfelder (B) im Zeitverlauf. Grafik A) zeigt die Cx40 mRNA Expression nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. Nach 2-3.5 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Zu- bzw. Abnahme der Cx40 mRNA Expression. Grafik B) zeigt die Veränderung der Fläche präglomerulärer Cx40-positiver Zellfelder nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät. An Tag 2 bzw. 3.5 der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Fläche präglomerulärer Cx40-positiver Zellfelder. *= $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zu dem entsprechenden Wert an Tag 0 erachtet. Die gestrichelte Linie indiziert einen Wert von 1.0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

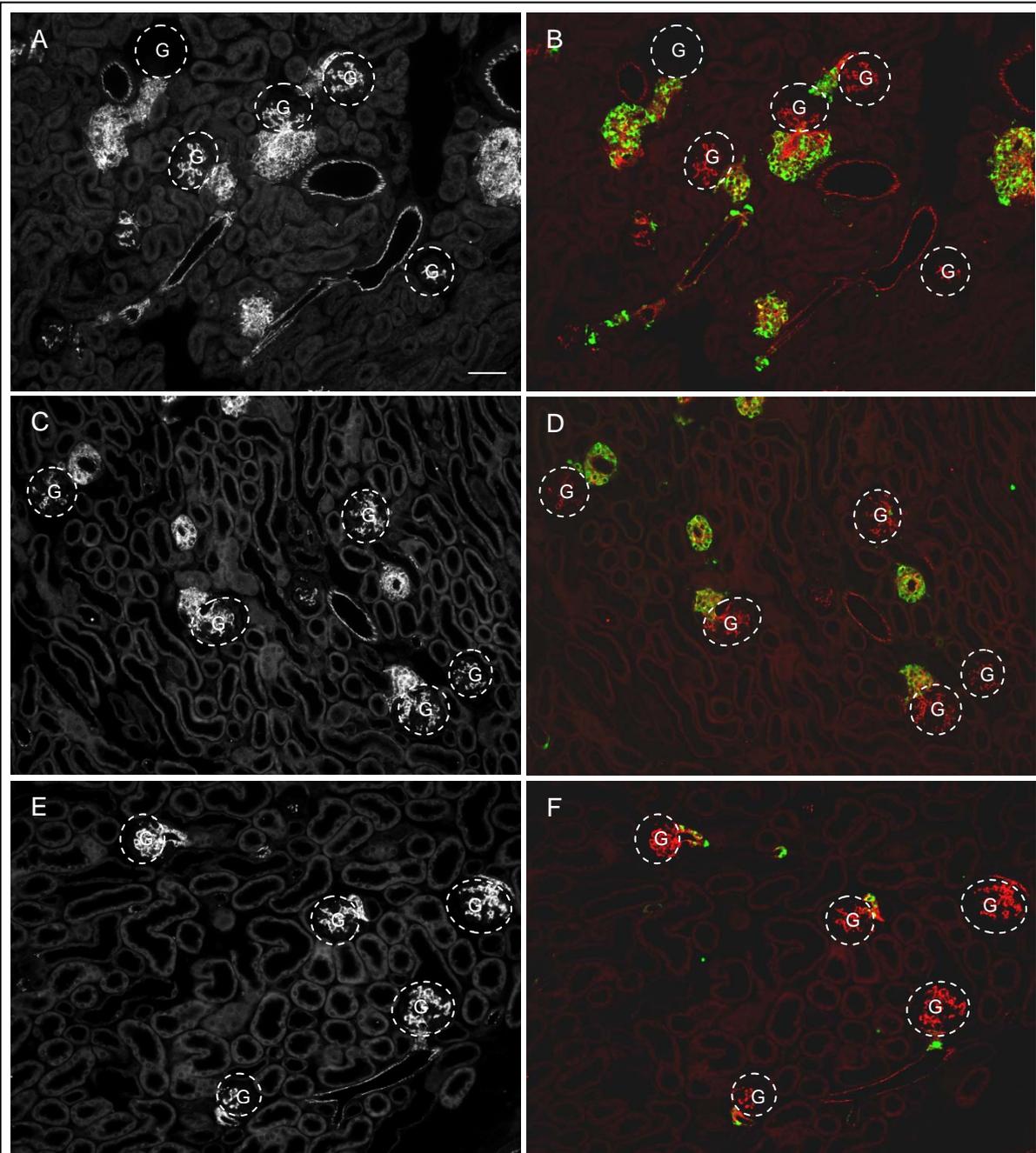


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung für **Renin** und **Cx40** unter: **A-B** Niedersalzdiet (**6 Wochen**), **C-D** Normalsalzdiet und **E-F** Hochsalzdiet (**6 Wochen**). **A, C, E:** Cx40-Färbung alleine. In **Abbildung C** ist die Verteilung Cx40-positiver Zellen nach normaler Salzzufuhr zu sehen. Die Cx40-positiv gefärbten Bereiche deckten sich vollständig mit der Renin-Immunfluoreszenzfärbung (**D**). Nach 6-wöchiger Gabe von Niedersalzfutter waren die Cx40-Zellfelder (**A bzw. B rot**), entsprechend wie die Reninfelder (**B, grün**), stets größer, verglichen mit den Feldern unter Normalsalzdiet. Nach 6-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter waren kaum noch Cx40-positive Bereiche im präglomerulären Raum zu finden (**E+F**). G: Glomerulus, Maßstabsbalken: 50 μ m

Zur Darstellung der Kolo­kalisierung des Cx40-Proteins mit Renin sind in Abbildung 15 immunhistochemisch gefärbte Nierengewebs­snitte zu sehen. In Abbildung 15C ist der Nierengewebs­schnitt eines Tieres dargestellt, das eine normale Salz­diät erhalten hatte, um die normale Lokalisation Cx40-produzierender Zellen in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen darzustellen. Die Cx40-positiven Zellen ordneten sich im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum an. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 15A ein Gewebeschnitt eines 6 Wochen lang mit Niedrigsalz behandelten Tieres zu sehen. Die präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder waren stets erheblich größer als die Cx40-positiven Zellfelder unter Normalsalz­diät (vgl. Abbildung 15C). Die immunhistochemische Färbung eines 6 Wochen lang mit Hochsalz behandelten Tieres (s. Abbildung 15E) zeigte einen starken Rückgang Cx40-positiver Bereiche im präglomerulären Raum. Unter allen Salz­diäten war stets eine starke Kolo­kalisierung zwischen Renin-produzierenden und Cx40-produzierenden Zellen erkennbar (s. Abbildung 15B, D, F). Obgleich die Cx40-Immunreaktivität unter Hochsalz­diät deutlich zurückging, konnten an vielen Glomeruli Bereiche gefunden werden, die positiv für Cx40 färbten, nicht aber für Renin (s. Abbildung 16).

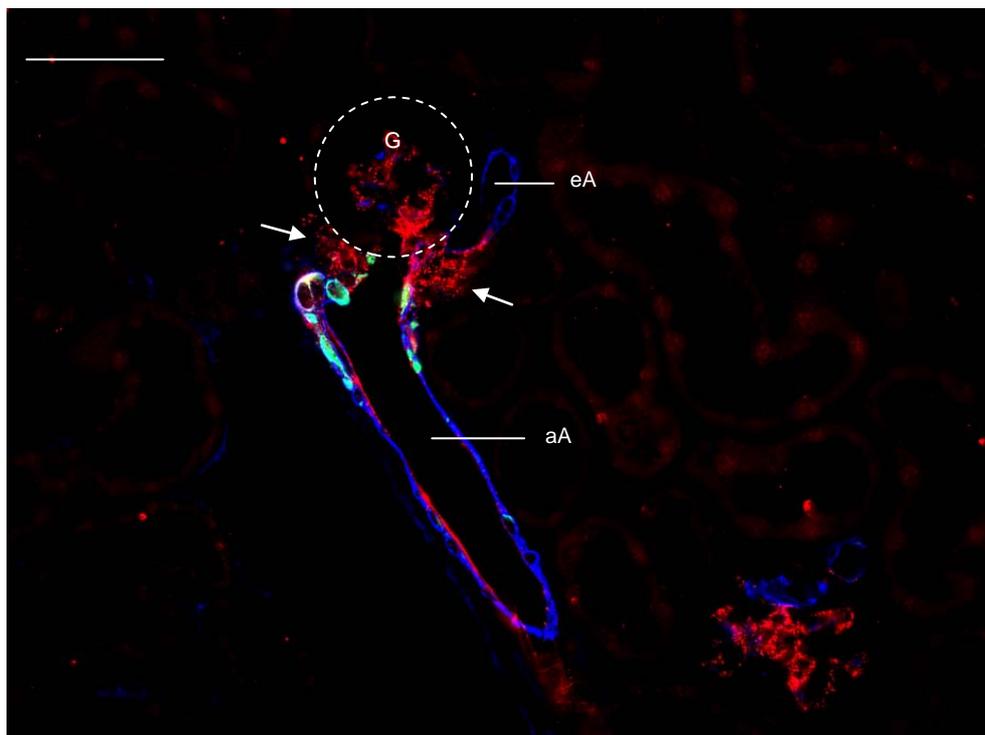
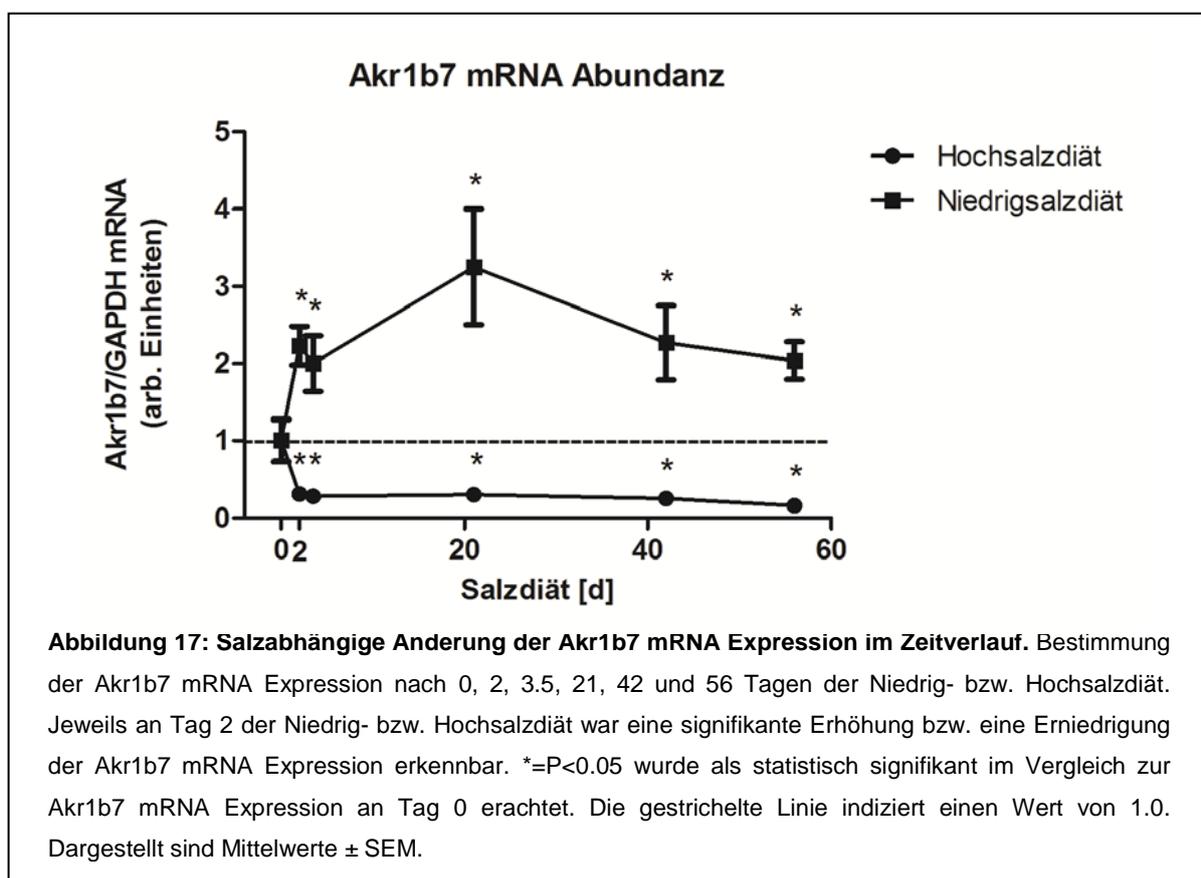


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung für Renin, Cx40 und α -SMA nach 6-wöchiger Hochsalz­diät. Nach 6-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter waren Cx40-positive Bereiche im präglomerulären Raum zu finden, die nicht positiv für Renin färbten. Pfeile weisen auf Cx40-positive Felder hin, die nicht positiv für Renin waren. G: Glomerulus, aA: afferente Arteriole, eA: efferente Arteriole, Maßstabsbalken: 50 μ m

3.2.2 Aldose-Ketose-Reduktase 1b7

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Aldose-Ketose-Reduktase 1b7 in der Niere ausschließlich in juxtaglomerulären Zellen exprimiert wird und somit als Marker für Renin-produzierende Zellen verwendet werden kann. Aus diesem Grund sollte die Salzabhängigkeit der Akr1b7 mRNA Expression und Produktion untersucht werden, um zu ermitteln, ob diese ähnlich salzabhängig reguliert werden, wie die Renin-Expression und Produktion.

Die Bestimmung der Akr1b7 mRNA Expression ergab einen signifikanten Anstieg der mRNA Werte an Tag 2 der Niedrigsalzdiät. Verglichen mit der Akr1b7 mRNA Expression an Tag 0 der Diät, kam es an Tag 2 zu einer Verdoppelung der mRNA Werte. Die Akr1b7 mRNA Expression blieb im weiteren Zeitverlauf im Durchschnitt innerhalb der Streuung konstant.



Unter Hochsalzdiät zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Akr1b7 mRNA Werte ab Tag 2 um 69%. Bei länger andauernder Gabe von Hochsalzfutter kam es maximal zu einem Rückgang der Akr1b7 mRNA Expression um 84% (s. Abbildung 17).

Zur Darstellung der Kolo-kalisation des Akr1b7-Proteins mit Renin sind in Abbildung 18 immunhistochemisch gefärbte Nierengewebschnitte von adulten Aldosteronsynthesedefizienten Tieren zu sehen. In den Abbildungen 18C+D ist der Nierengewebschnitt eines

Tieres zu sehen, das eine normale Salzdiät erhalten hatte, um die ursprüngliche Lokalisation

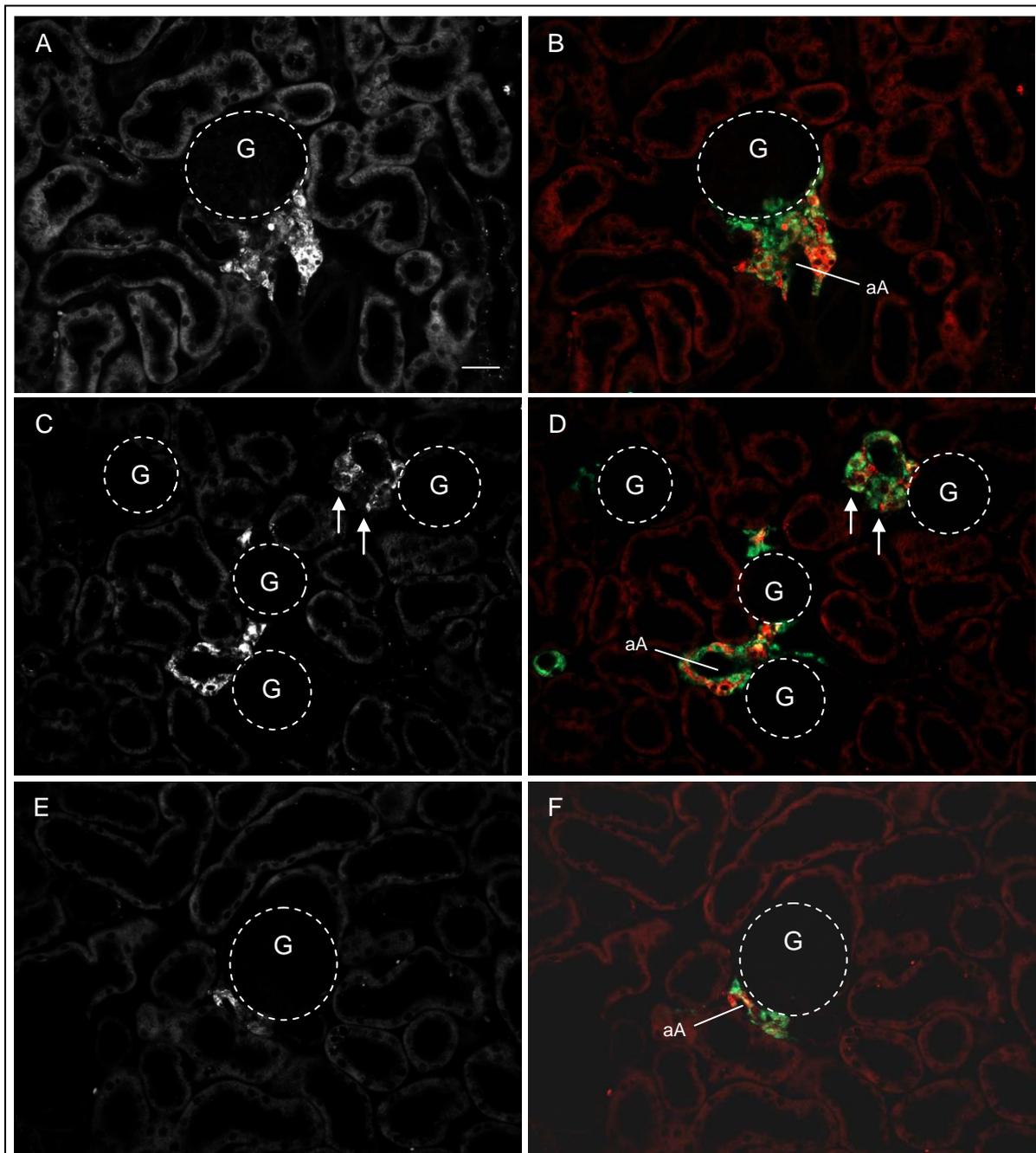


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung für **Renin** und **Akr1b7** unter: **A-B Niedrigsalzdiät (6 Wochen)**, **C-D Normalsalzdiät** und **E-F Hochsalzdiät (6 Wochen)**. **A, C, E:** Akr1b7-Färbung alleine. In **Abbildung C** ist die Verteilung Akr1b7-positiver Zellen nach normaler Salzzufuhr zu sehen. Die Akr1b7-positiven Zellen kolokalisierten hauptsächlich mit den vaskulären Reninzellen (**D**). Die perivaskulären Reninzellen wiesen nur zum Teil eine Akr1b7-Färbung auf, die an manchen Stellen etwas schwächer war (s. Pfeile (**C+D**)). Nach 6-wöchiger Gabe von Niedrigsalzfutter waren die Akr1b7-Zellfelder (**A bzw. B, rot**), entsprechend wie die Reninfelder (**B, grün**), stets größer, verglichen mit den präglomerulären Akr1b7-Zellfeldern unter Normalsalzdiät. Die perivaskulären Reninzellen wiesen zum größten Teil eine Akr1b7-Färbung auf. Nach 6-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter waren kaum noch Akr1b7-positive Bereiche in den vaskulären und perivaskulären Reninzellen bzw. allgemein im präglomerulären Raum zu finden (**E+F**). aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Maßstabsbalken: 20 μ m

Akr1b7-produzierender Zellen in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen darzustellen. Die Akr1b7-positiven Zellen waren vor allem in den vaskulären Reninzellen zu finden. Dort war stets eine starke Färbung zu sehen. Innerhalb der perivaskulären Reninzellfelder war die Färbung teilweise etwas schwächer ausgeprägt. Im Vergleich dazu ist in den Abbildungen 18A+B ein Gewebeschnitt eines 6 Wochen lang mit Nidrigsalz behandelten Tieres zu sehen. Die Akr1b7-Färbung zeigte sich großflächiger im Vergleich zu der Färbung unter Normalsalzdiät. Die perivaskulären Reninzellfelder wiesen zum größten Teil Akr1b7-Färbung auf. Die immunhistochemische Färbung eines 6 Wochen lang mit Hochsalz behandelten Tieres (s. Abbildung 18E+F) zeigte nur noch sehr wenige Akr1b7-positive Bereiche. Diese beschränkten sich ausschließlich auf Renin-positive vaskuläre Zellen.

3.2.3 Cyclooxygenase-2

Es ist bereits bekannt, dass Cyclooxygenase-2 in der Macula Densa und in angrenzenden kortikalen Teilen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife (TALH), sowie in interstitiellen Zellen der Medulla exprimiert wird. COX-2 soll bei der Regulation der Renin-Produktion beteiligt sein ²¹⁵. Es sollte die Salzabhängigkeit der COX-2 mRNA Expression und Produktion untersucht werden, um zu ermitteln, ob diese ähnlich salzabhängig reguliert werden, wie die Renin-Expression und Produktion.

Die Bestimmung der COX-2 mRNA Expression der gesamten Niere ergab einen signifikanten Anstieg der mRNA Werte nach 3-wöchiger Nidrigsalzdiät um einen Faktor von 8.5. Nach 3-wöchiger Hochsalzdiät zeigte sich ein Rückgang der COX-2 mRNA Werte um etwa 25% (s. Abbildung 19A).

Die Untersuchung der Fläche der kortikalen COX-2-positiven Zellfelder unter Nidrigsalzdiät ergab einen Anstieg der Flächengröße um 23% an Tag 3.5 der Diät. Dabei vergrößerte sich die durchschnittliche Fläche von $186 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus an Tag 0 der Diät, nach 3.5 Tagen auf $228 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus an. Im weiteren Zeitverlauf vergrößerte sich die Fläche der kortikalen COX-2 Zellfelder maximal auf $807 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus. Unter Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Verringerung der Fläche der kortikalen COX-2-positiven Zellfelder um 57% nach 2 Tagen, im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 der Diät. Im weiteren Zeitverlauf blieb die Fläche der COX-2-positiven Zellfelder konstant bei durchschnittlich $85 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (s. Abbildung 19B). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Fläche der kortikalen COX-2-positiven Zellfelder von durchschnittlich $190 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (nicht gezeigt).

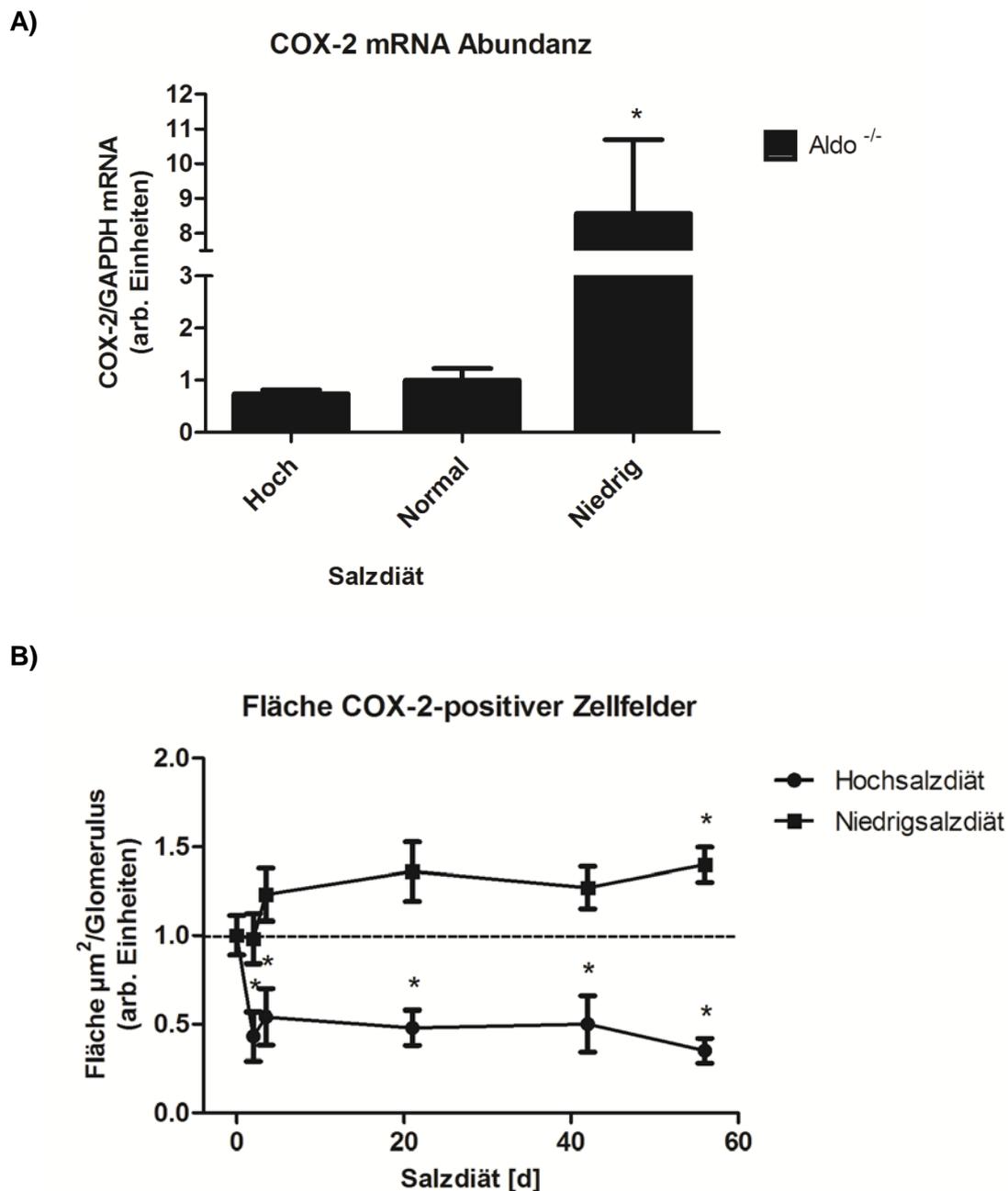


Abbildung 19: Salzabhängige Änderung der COX-2 mRNA Expression unter Hoch-, Normal-, und Nidrigsalzdiät (A) und der Fläche COX-2-positiver kortikaler Zellfelder im Zeitverlauf (B). Grafik **A**) zeigt die COX-2 mRNA Expression nach 21 Tagen der Niedrig- bzw. Hochsalzdiät und unter Normalsalzdiät in Aldosteronsynthase^{-/-}-Mäusen. Die COX-2 mRNA Expression der gesamten Niere ergab einen signifikanten Anstieg der mRNA Werte nach 3-wöchiger Nidrigsalzdiät um einen Faktor von 8.5. Nach 3-wöchiger Hochsalzdiät zeigte sich ein Rückgang der COX-2 mRNA Expression um 25%. Grafik **B**) zeigt die Veränderung der Fläche kortikaler COX-2-positiver Zellfelder nach 0, 2, 3.5, 21, 42 und 56 Tagen der Nidrig- bzw. Hochsalzdiät. Zwischen 2 und 3.5 Tagen der Nidrig- bzw. Hochsalzdiät kam es zu einer signifikanten Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Fläche kortikaler COX-2-positiver Zellfelder. *=P<0.05 wurde als statistisch signifikant im Vergleich zu dem entsprechenden Wert an Tag 0 erachtet. Die gestrichelte Linie indiziert einen Wert von 1.0. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

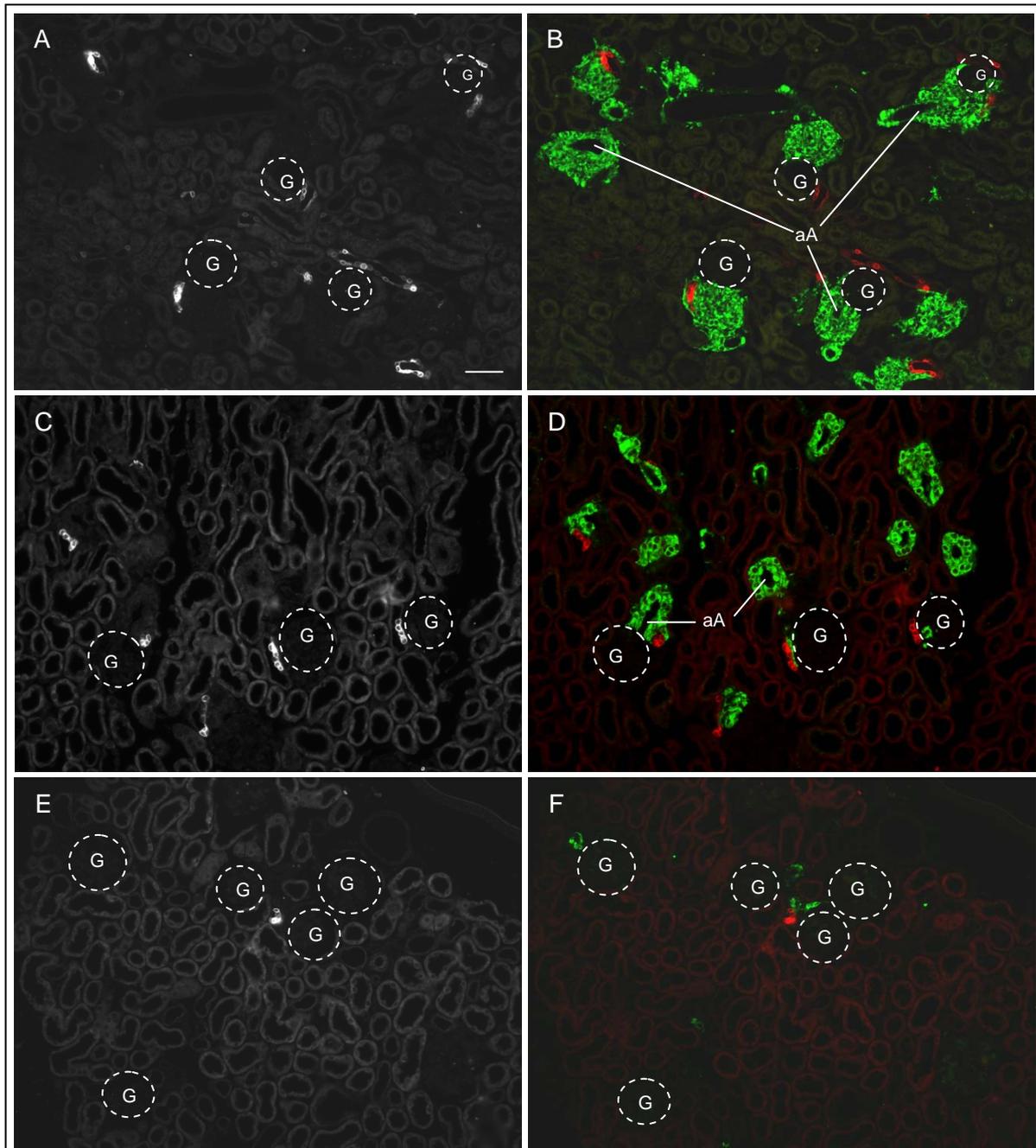


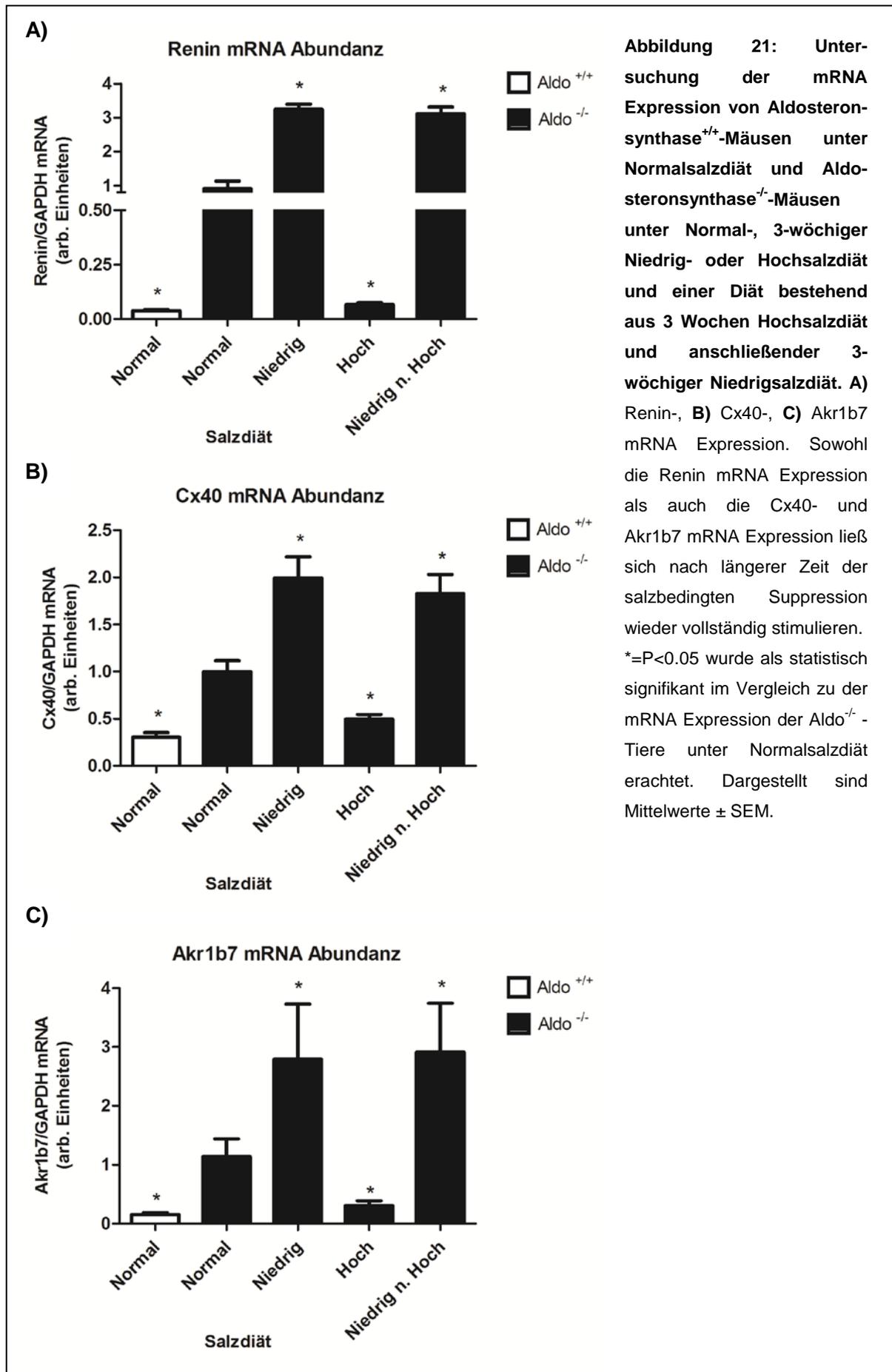
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung für Renin und COX-2 unter A-B Nidrigsalzdiät (6 Wochen), C-D Normalsalzdiät und E-F Hochsalzdiät (6 Wochen). A, C, E: COX-2-Färbung alleine. In Abbildung C) ist die Verteilung COX-2-positiver Zellen nach normaler Salzzufuhr zu sehen. Die COX-2-positiven Zellen waren ausschließlich innerhalb der Macula Densa in unmittelbarer Nähe zu den Glomeruli lokalisiert. Insgesamt fand sich bei 60% der Glomeruli eine COX-2-positive Färbung im Bereich der Macula Densa. Nach 6-wöchiger Gabe von Nidrigsalzfutter waren die COX-2-Zellfelder (A), stets größer und intensiver gefärbt, verglichen mit den COX-2-positiven Zellfeldern unter Normalsalzdiät. Außerdem waren hier auch COX-2-positive Zellen in den Zellen des TALH zu finden. Nach 6-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter waren kaum noch COX-2-positive Bereiche im kortikalen Bereich der Niere zu finden (E+F). Nur noch 32% aller Glomeruli wiesen COX-2 positive Bereiche innerhalb der Macula Densa auf. aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Maßstabsbalken: 50 μ m

Zur Darstellung der Kolo­kalisierung des COX-2-Proteins mit Renin sind in Abbildung 20 immun­histochemisch gefärbte Nierengewebs­schnitte von adulten Aldosteronsynthese-defizienten Tieren zu sehen. In den Abbildungen 20C+D ist der Nierengewebs­schnitt eines Tieres zu sehen, das normale Salz­diät erhalten hatte, um die ursprüngliche Lokalisation COX-2-produzierender Zellen in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen darzustellen. Die COX-2-positiven Zellen waren ausschließlich innerhalb der Macula Densa in unmittelbarer Nähe zu den Glomeruli lokalisiert. Insgesamt fand sich bei 60% der Glomeruli eine COX-2 positive Färbung im Bereich der Macula Densa. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 20A+B ein Gewebeschnitt eines 6 Wochen lang mit Niedrigsalz behandelten Tieres zu sehen. Die COX-2 positiven Felder waren stets etwas größer und intensiver gefärbt als die COX-2-positiven Zellfelder unter Normalsalz­diät (vgl. Abbildung 20C+D). Auch unter Niedrigsalz­diät wiesen etwa 60% aller Glomeruli eine COX-2 positive Färbung innerhalb der Macula Densa auf. Allerdings fanden sich auch COX-2 positive Zellen innerhalb des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife. Die immun­histochemische Färbung eines 6 Wochen lang mit Hochsalz behandelten Tieres (s. Abbildung 20E+F) zeigte nur noch wenige COX-2 positive Bereiche innerhalb des Kortex. Zudem konnte festgestellt werden, dass lediglich noch 32% aller Glomeruli, COX-2 positive Bereiche innerhalb der Macula Densa aufwiesen.

3.3 Stimulierbarkeit der mRNA-Expression und der Reninsekretion nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression

3.3.1 Reinduzierbarkeit der Renin-, Cx40- und Akr1b7-Genexpression

Um zu überprüfen, ob nach einer längeren Periode der salzbedingten Suppression die mRNA Expression von Renin und mit Renin koregulierten Genen (Cx40 und Akr1b7) wieder induziert werden kann, wurde Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen eine Diät bestehend aus einer 3-wöchigen Hochsalz­diät gefolgt von einer 3-wöchigen Niedrigsalz­diät gefüttert. Zum Vergleich wurden Aldosteronsynthese-defiziente Mäuse (Aldo^{-/-}) verwendet, die entweder normale, 3 Wochen lang erniedrigte oder 3 Wochen lang erhöhte Salz­konzentrationen zu sich nahmen. Außerdem wurden zum Vergleich Aldosteronsynthese Wildtyp-Tiere (Aldo^{+/+}) unter Normalsalz­diät untersucht. In Abbildung 21A ist die Renin mRNA Expression in einem Balkendiagramm dargestellt. Die basale Renin mRNA Expression liegt unter Normalsalz­diät in Aldo^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Aldo^{+/+}-Tieren um das 20-fache höher. Bei den Aldo^{-/-}-Tieren konnte nach 3-wöchiger Niedrigsalz­diät im Vergleich zu der mRNA Expression unter Normalsalz­diät ein Anstieg der Renin mRNA Expression um 325% beobachtet werden. Nach 3-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter wurde eine Abnahme



der mRNA Expression von über 90% festgestellt. Wie der Balken rechts in Abbildung 21A zeigt, erfolgte selbst nach einer 3-wöchigen Suppression, eine vollständige Reinduktion der Renin mRNA Expression durch anschließende 3-wöchige Stimulation mit Niedrigsalzfutter. Dies geschah sogar im selben Umfang, wie bei einer 3-wöchigen Niedrigsalzstimulation alleine. Auch hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der Renin mRNA Expression um ca. 325% im Vergleich zu der Renin mRNA Expression unter Normalsalzdiät.

In Abbildung 21B ist die Cx40 mRNA Expression dargestellt. Die basale Cx40 mRNA Expression ist unter Normalsalzdiät in Aldo^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Aldo^{+/+}-Tieren um das 4-fache erhöht. Bei den Aldo^{-/-}-Tieren kam es nach 3-wöchiger Niedrigsalzdiät im Vergleich zu der mRNA Expression unter Normalsalzdiät zu einer Verdoppelung der Cx40 mRNA Werte. Nach 3-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter wurde hingegen eine Halbierung der Cx40 mRNA Expression festgestellt. Wie der Balken rechts in Abbildung 21B zeigt, erfolgte selbst nach einer 3-wöchigen Suppression eine fast vollständige Reinduktion der Cx40 mRNA Expression durch anschließende 3-wöchige Stimulation mit Niedrigsalzfutter. Es kam zu einem signifikanten Anstieg der Cx40 mRNA Expression um ca. 80% im Vergleich zu der Cx40 mRNA Expression unter Normalsalzdiät.

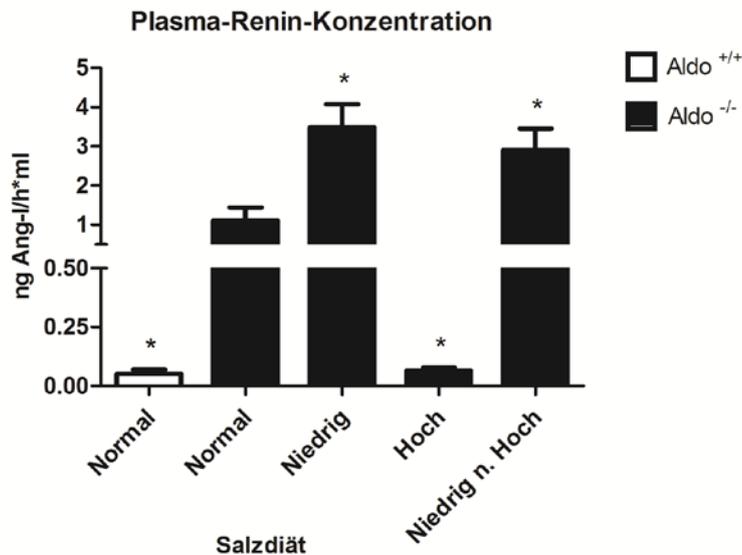
In Abbildung 21C ist die Akr1b7 mRNA Expression dargestellt. Die basale Akr1b7 mRNA Expression liegt unter Normalsalzdiät in Aldo^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Aldo^{+/+}-Tieren um das 20-fache höher. Bei den Aldo^{-/-}-Tieren konnte nach 3-wöchiger Niedrigsalzdiät im Vergleich zu der mRNA Expression unter Normalsalzdiät ein signifikanter Anstieg der Akr1b7 mRNA Expression um 380% beobachtet werden. Nach 3-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter wurde eine Abnahme der mRNA Expression um ca. 80% festgestellt. Wie der Balken rechts in Abbildung 21C zeigt, erfolgte selbst nach einer 3-wöchigen Suppression eine vollständige Reinduktion der Akr1b7 mRNA Expression durch anschließende 3-wöchige Stimulation mit Niedrigsalzfutter. Auch hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der Akr1b7 mRNA Expression um ca. 320% im Vergleich zu der Akr1b7 mRNA Expression unter Normalsalzdiät.

3.3.2 Reinduzierbarkeit der Reninsekretion

Wie für die Renin mRNA Expression sollte auch für die Reninsekretion untersucht werden, ob nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression die Reninsekretion wieder in gleichem Maße reinduziert werden kann.

In Abbildung 22A ist die Plasma-Renin-Konzentration nach unterschiedlichen Salzdiäten dargestellt. Die basale Plasma-Renin-Konzentration liegt unter Normalsalzdiät in Aldo^{-/-}-

A)



B)

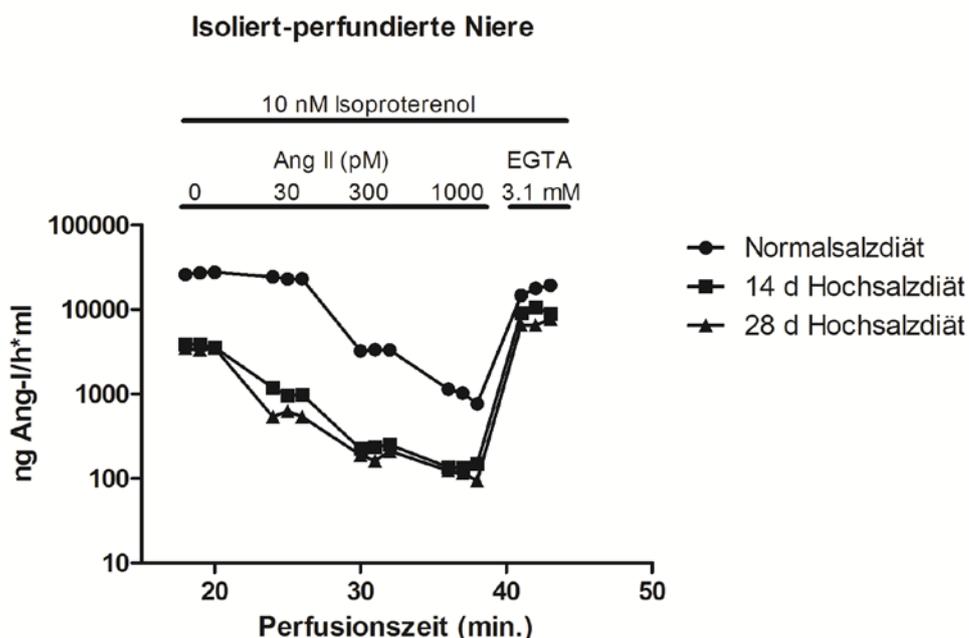


Abbildung 22: A) Untersuchung der Plasma-Renin-Konzentration von Aldo^{+/+}-Mäusen unter Normalsalzdiät und Aldo^{-/-}-Mäusen unter Normal-, 3-wöchiger Niedrig- oder Hochsalzdiät und einer Diät bestehend aus 3 Wochen Hochsalzdiät und anschließender 3-wöchiger Niedrigsalzdiät. *= $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant im Vergleich zu der Plasma-Renin-Konzentration der Aldo^{-/-}-Tiere unter Normalsalzdiät erachtet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. B) Untersuchung der Reninsekretionsrate an der isoliert-perfundierten Niere von Aldo^{-/-}-Mäusen unter Normalsalz-, sowie 2- und 4-wöchiger Hochsalzdiät. Sowohl die Plasma-Renin-Konzentration als auch die Reninsekretionsrate ließ sich nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression wieder vollständig stimulieren.

Tieren im Vergleich zu Aldo^{+/+}-Tieren um das 20-fache höher. Bei den Aldo^{-/-}-Tieren kam es nach 3-wöchiger Niedrigsalzdiät im Vergleich zu der Plasma-Renin-Konzentration unter Normalsalzdiät zu einem Anstieg der Plasma-Renin-Konzentration um etwa 350%. Nach 3-

wöchiger Gabe von Hochsalzfutter konnte eine Abnahme der Plasma-Renin-Konzentration von über 90% festgestellt werden. Wie der Balken rechts in Abbildung 22A zeigt, erfolgte selbst nach einer 3-wöchigen Suppression eine fast vollständige Reinduktion der Plasma-Renin-Konzentration durch anschließende 3-wöchige Stimulation mit Niedrigsalzfutter. Hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Renin-Konzentration um ca. 300% im Vergleich zu der Plasma-Renin-Konzentration unter Normalsalzdät.

Die Reninsekretionsrate wurde unter Verwendung der Methode der isoliert-perfundierten Niere (IPN) ermittelt. Am IPN-Modell konnte durch Applikation verschiedener Wirkstoffe und Stimuli die Reinduzierbarkeit der Reninsekretion in vivo überprüft werden. Das sympathische Nervensystem ist als wichtiger Regulator der Reninsekretion bekannt. Durch Bindung von Katecholaminen an β_1 -adrenerge Rezeptoren wird in juxtaglomerulären Zellen die Aktivität der Adenylatzyklase gesteigert. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, welche die Synthese und Sekretion von Renin stimuliert ¹²⁴. Durch Zugabe des β -Adrenorezeptor-Liganden Isoproterenol zum Perfusat wird demnach die Reninsekretion durch Aktivierung β_1 -adrenerger Rezeptoren stimuliert. Die Bindung von Angiotensin II an AT_1 -Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen führt hingegen zu einer Hemmung der Reninsynthese und -sekretion ²¹⁶. Dies geschieht über die Aktivierung der Phospholipase C, was wiederum die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht ²¹. Die Zugabe von Angiotensin II in ansteigender Konzentration nach vorheriger Stimulierung mit Isoproterenol (10 nmol/l) führt daher zu einer Inhibierung der Reninsekretion. Ein weiterer Regulator der Reninsekretion ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Während in anderen Zellen eine Erhöhung der Kalziumkonzentration einen stimulierenden Effekt auf die Sekretion hat, bewirkt dies in Renin-bildenden Zellen eine Hemmung der Reninfreisetzung ^{88,217}. Eine Erniedrigung des extrazellulären Kalziums durch Zugabe von EGTA (3,1 mmol/l) zum Perfusat führt zu einem deutlichen Anstieg der Reninsekretion ^{89,111,112}.

Um die Reinduzierbarkeit der Reninsekretion via IPN-Methode zu untersuchen, wurden hier Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse verwendet, die entweder normale Salzdät erhalten hatten oder 2 bzw. 4 Wochen lang mit Hochsalzdät gefüttert wurden. Unter basalen Bedingungen (10 nM Isoproterenol) war die Reninsekretionsrate nach Normalsalzdät um das 8-fache höher als bei den beiden Tieren die zuvor eine Hochsalzdät erhalten hatten. Es ergab sich kein Unterschied bezüglich der Reninsekretionsrate zwischen den beiden mit Hochsalz behandelten Tieren. Bei der darauffolgenden stufenweisen Erhöhung der Angiotensin II-Konzentration (30, 300 und 1000 pM) in der Perfusionslösung konnte bei allen Tieren eine entsprechend stufenweise Erniedrigung der Reninsekretionsrate festgestellt werden, wobei die Reninsekretionsrate des mit Normalsalz behandelten Tieres immer um etwa einen Faktor von 10 höher lag, als bei den beiden mit Hochsalz behandelten Tieren.

Am Ende der Untersuchung wurde 3.1 mM EGTA dem Perfusat hinzugefügt. Die Reninsekretionsrate des mit Normalsalzdiät behandelten Tieres erreichte innerhalb weniger Minuten die gleiche Sekretionsrate, wie unter basalen Bedingungen am Anfang. Die Reninsekretionsrate des 2 Wochen lang mit Hochsalz behandelten Tieres stieg nach Zugabe von EGTA sogar über seinen Basalwert hinaus und erreichte annähernd die gleiche Reninsekretionsrate wie das mit Normalsalzdiät behandelte Tier unter EGTA-Einfluss. Das gleiche konnte für das 4 Wochen lang mit Hochsalz behandelte Tier beobachtet werden. Auch hier wurde unter Einfluss von EGTA eine höhere Reninsekretionsrate als bei der Ausgangssituation erreicht (s. Abbildung 22B).

3.4 Die Rolle von Zellproliferation und Apoptose bei der salzinduzierten Änderung der Reninexpression

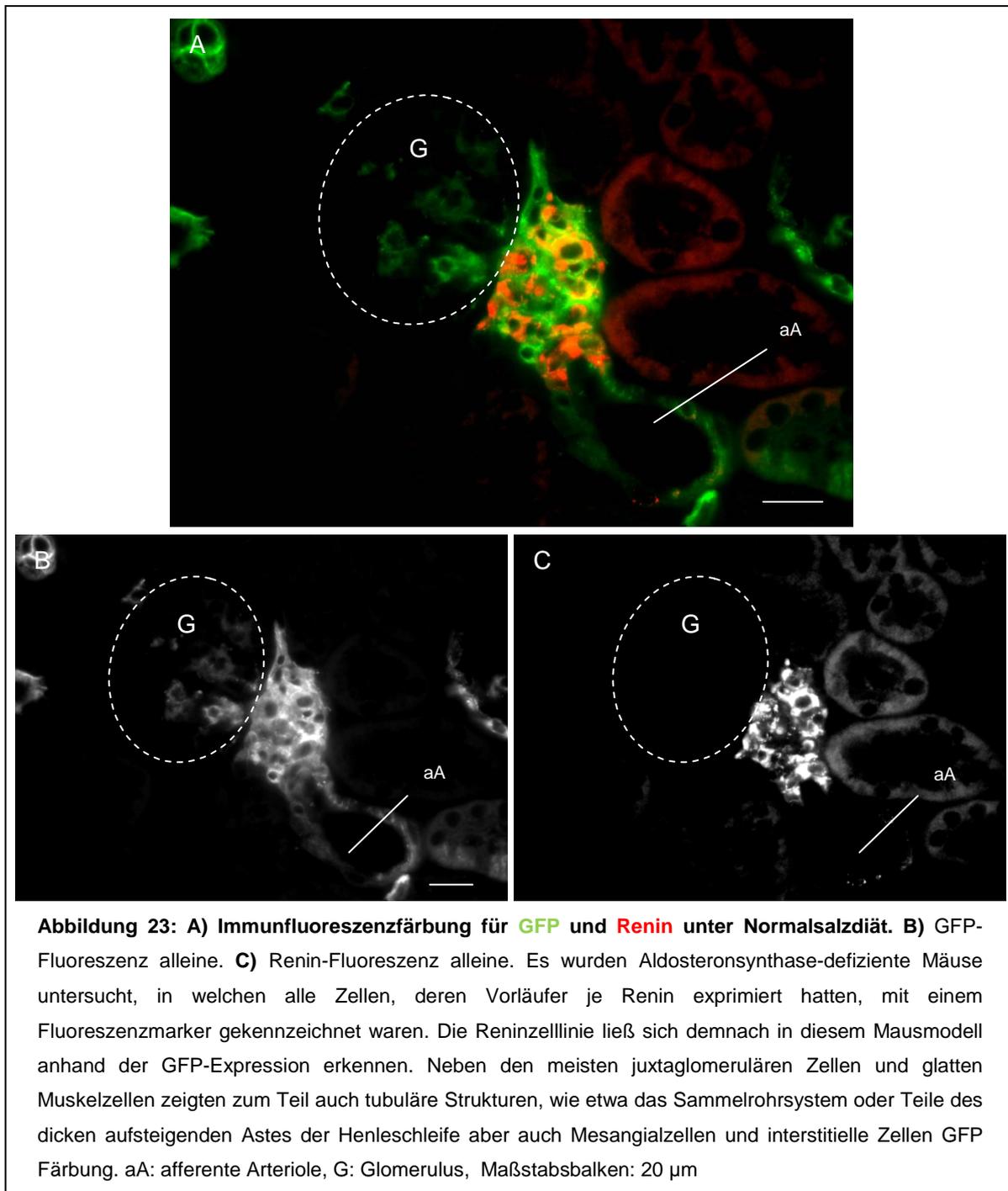
Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Salzabhängigkeit der Reninexpression und -sekretion auf bereits vorhandene Reninvorläuferzellen (Reninzellanlagen) zurückzuführen ist, oder ob diese zusätzlichen Reninzellen durch Proliferation bereits vorhandener Reninzellen neu entstehen bzw. durch Apoptose wieder verschwinden können. Diese Frage sollte in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen untersucht werden, in welchen alle Zellen, deren Vorläufer je Renin exprimiert hatten mit einem Fluoreszenzmarker (GFP oder R26R-Confetti) gekennzeichnet waren. Dadurch konnten also Zellen, die der Reninzelllinie angehören, markiert werden. In Übereinstimmung mit früheren Befunden zeigte sich, dass neben juxtaglomerulären Zellen und glatten Muskelzellen zum Teil auch tubuläre Strukturen, wie etwa das Sammelrohrsystem oder Teile des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife aber auch Mesangialzellen und interstitielle Zellen Fluoreszenzfärbung aufwiesen.

3.4.1 Die Reninzelllinie

3.4.1.1 Grün-fluoreszierendes Protein (GFP)

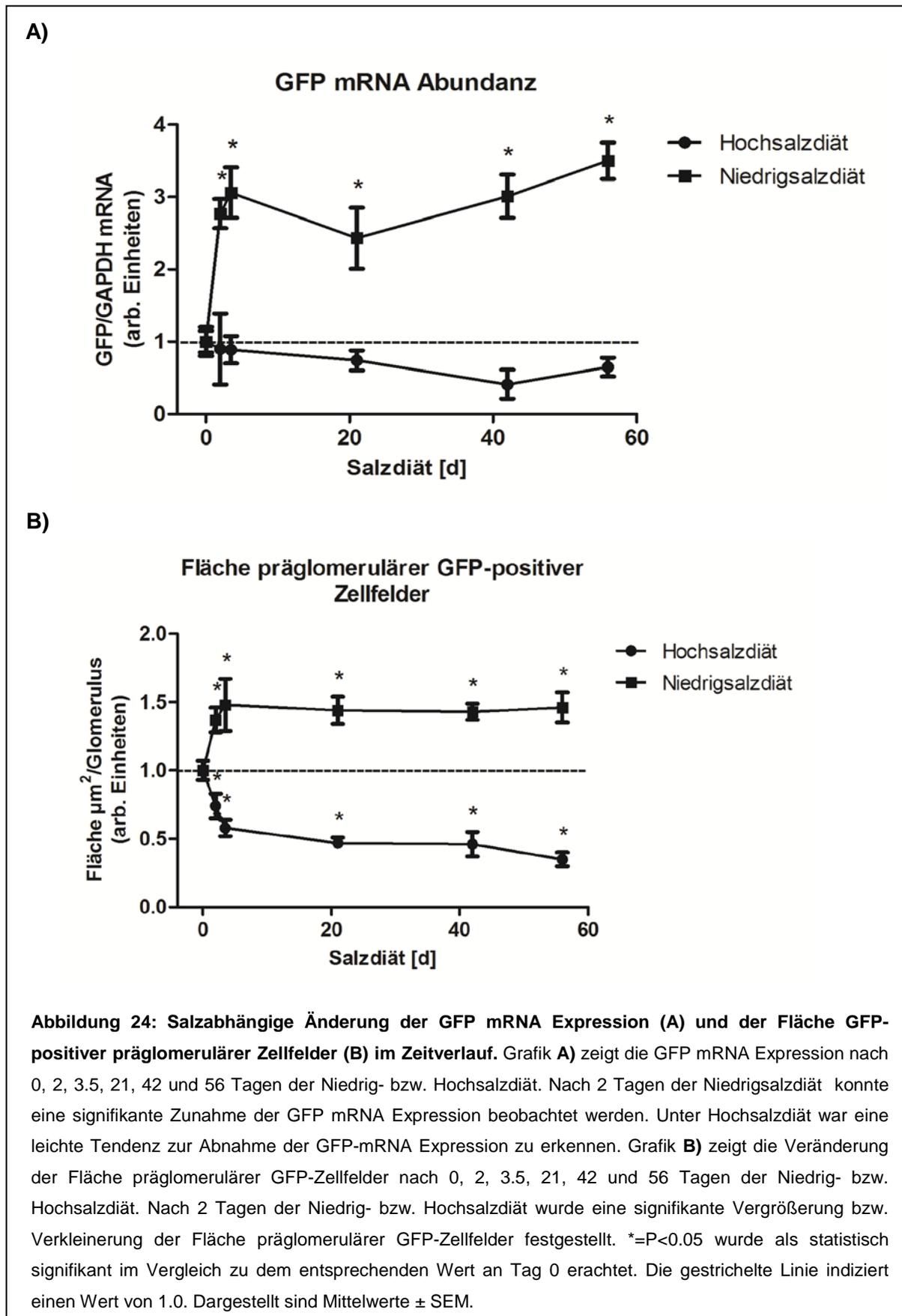
In der für diese Arbeit verwendeten Mauslinie (Aldosteronsynthese^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG) exprimierten alle Zellen, die der Reninzelllinie angehörten, das Markerprotein GFP. mT/mG ist ein doppelt-fluoreszenter Reporter, wodurch GFP ausschließlich bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase exprimiert wird. Da die Cre-Rekombinase in dieser Mauslinie unter der Kontrolle des endogenen Ren1d-Promotors stand, wurde demnach immer dann GFP gebildet, wenn der Reninpromotor während der Entwicklung aktiv war (vgl. Abbildung 8,

Kapitel 2.2.1). Daher waren im adulten Tier alle Renin-produzierenden Zellen auch zugleich GFP positiv (s. Abbildung 23A-C).



Die Untersuchung der GFP mRNA Expression der gesamten Niere ergab einen signifikanten Anstieg bereits an Tag 2 der Niedrigsalzdiät. Dabei stieg die mRNA Expression auf das 3-fache des Ausgangswertes an Tag 0. Im weiteren Zeitverlauf blieb die GFP mRNA Expression konstant. Im Gegensatz dazu hatte die Hochsalzdiät keine starke Auswirkung auf die GFP mRNA Expression, da es hier zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten

Unterschied im Vergleich zu dem Ausgangswert an Tag 0 gab. Es gab aber eine Tendenz



zur Abnahme der mRNA Werte (s. Abbildung 24A). Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante GFP mRNA Abundanz (nicht gezeigt).

Die Bestimmung der Fläche der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder unter Niedrigsalzdiät ergab eine signifikante Flächenzunahme von $2086 \mu\text{m}^2$ auf $2867 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus an Tag 2 der Diät. Dies entspricht einer Flächenzunahme um 37%. Maximal kam es unter Niedrigsalzdiät zu einer Flächenvergrößerung um 46%. Unter Hochsalzdiät konnte eine stetige Verringerung der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder über den gesamten untersuchten Zeitraum beobachtet werden. Maximal kam es unter Hochsalzdiät zu einer Verkleinerung der Fläche der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder von $2086 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus auf $735 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (s. Abbildung 24B). Dies entspricht einem Rückgang um 65%. Die Kontrolltiere auf Normalsalzdiät zeigten stets eine konstante Fläche der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder von durchschnittlich $2044 \mu\text{m}^2$ pro Glomerulus (nicht gezeigt).

Die Kolokalisation des GFP-Proteins mit Renin bei unterschiedlichen Aktivitätszuständen des RAAS ist in Abbildung 25 dargestellt. In Abbildung 25C+D ist jeweils der Nierengewebsschnitt eines Tieres zu sehen, das Normalsalzdiät erhalten hatte, um die normale Lokalisation GFP-produzierender Zellen in Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG Mäusen darzustellen. Die GFP-positiven Zellen ordneten sich im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum an. Außerdem waren sie entlang der afferenten Arteriole zu finden. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 25A+B ein Gewebeschnitt eines 6 Wochen lang mit Niedrigsalz behandelten Tieres zu sehen. Die präglomerulären GFP-positiven Felder waren stets erheblich größer als die GFP-positiven Felder unter Normalsalzdiät. Außerdem waren die Zellen an sich größer und dicker (vgl. Abbildung 25C+D). Die immunhistochemische Färbung eines 6 Wochen lang mit Hochsalz behandelten Tieres (s. Abbildung 25E) zeigte hingegen nur noch wenige GFP-positive Bereiche im präglomerulären Raum. Die Zellen waren kleiner und schmaler, als die Zellen der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder unter Niedrig- bzw. Normalsalzdiät. Obwohl die GFP-Immunoreaktivität unter Hochsalzdiät zurückging, konnte an vielen Glomeruli Bereiche gefunden werden, die positiv für GFP färbten, nicht aber für Renin (s. Abbildung 26). Durch die DAPI-Färbung ist eindeutig zu erkennen, dass in diesem GFP-positiven Bereich sehr viele, dicht aneinander liegende Zellkerne vorhanden sind.

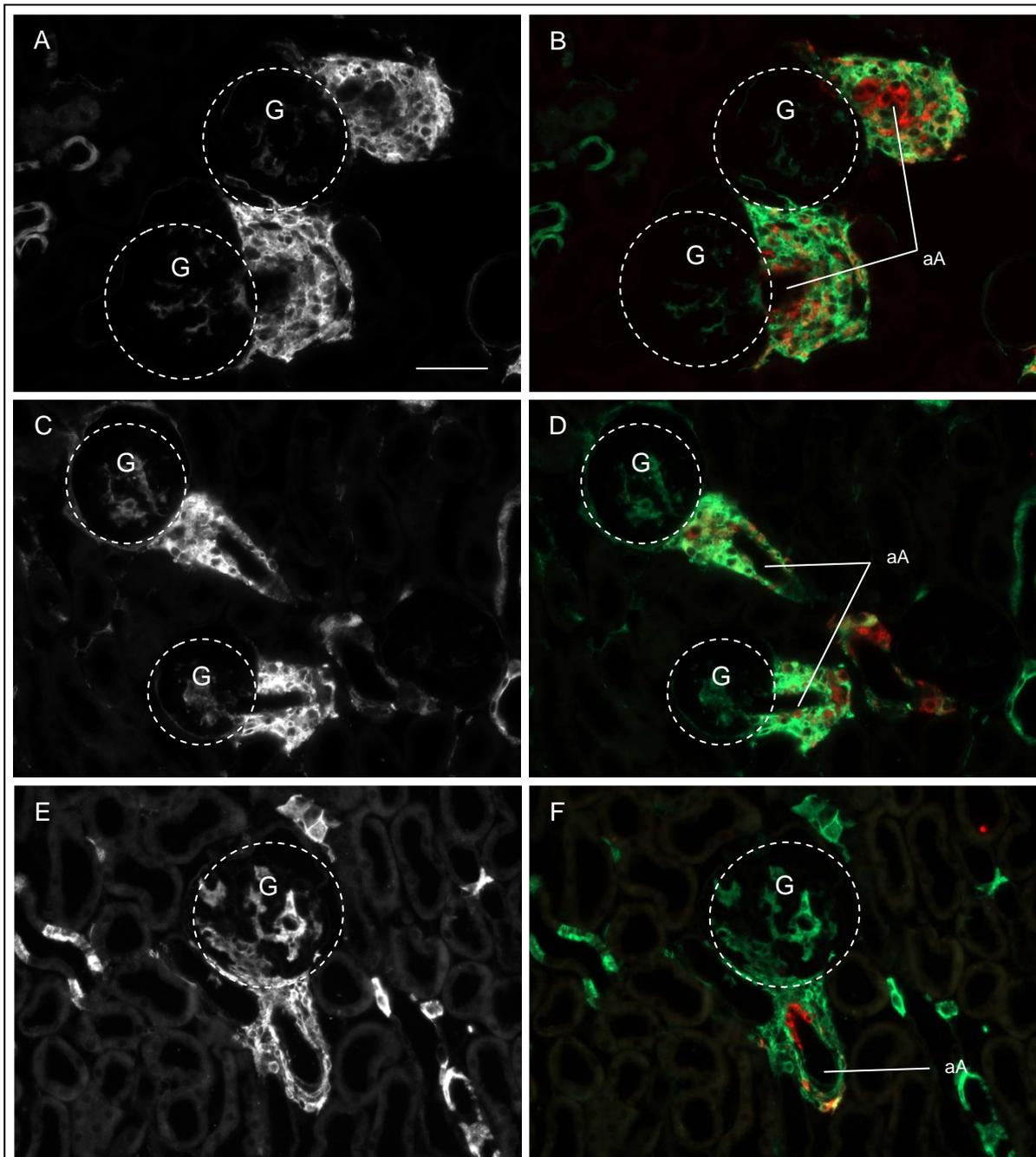


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung für **GFP** und **Renin** unter **A+B** Nidrigsalzdiät (**6 Wochen**), **C+D** Normalsalzdiät und **E+F** Hochsalzdiät (**6 Wochen**). **A, C, E:** GFP-Färbung alleine. Die GFP-positiven Zellen ordneten sich, ähnlich wie Renin, im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum an. Außerdem waren sie entlang der afferenten Arteriole selbst zu finden (**C+D**). Die präglomerulären GFP-Felder waren unter Nidrigsalzdiät stets erheblich größer als die GFP-Felder unter Normalsalzdiät. Außerdem schienen die einzelnen Zellen an sich größer und dicker zu sein (**A+B**). Unter Hochsalzdiät waren nur noch wenige GFP-positive Bereiche im präglomerulären Raum. Die Zellen schienen zudem auch kleiner und schmäler zu sein als die Zellen der präglomerulären Zellfelder unter Nidrig- bzw. Normalsalzdiät (**E+F**). **aA:** afferente Arteriole, **G:** Glomerulus, Maßstabsbalken: 20 μm

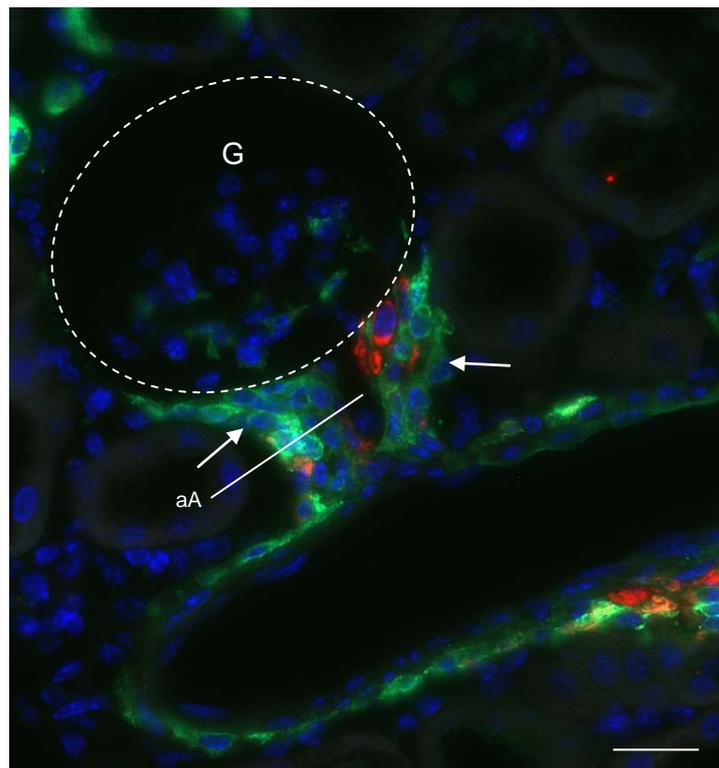
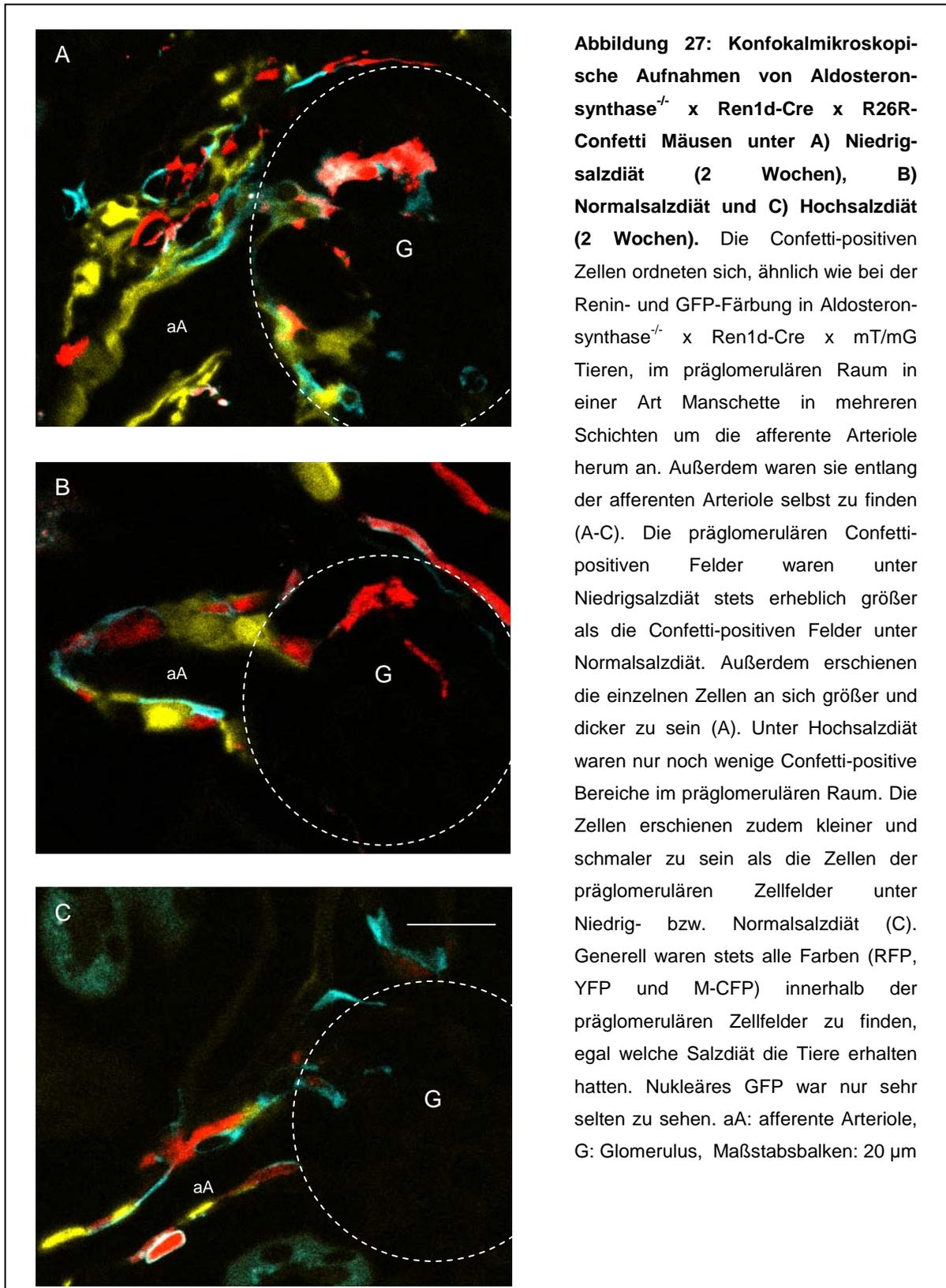


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung für GFP, Renin und DAPI nach 6 Wochen Hochsalzdiät. Die GFP-positiven Zellen ordneten sich, ähnlich wie Renin, im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum an. Außerdem waren sie entlang der afferenten Arteriole selbst zu finden. Nach 6-wöchiger Gabe von Hochsalzfutter waren GFP-positive Bereiche im präglomerulären Raum zu finden, die nicht positiv für Renin färbten. Pfeile weisen auf GFP-positive Felder hin, die nicht positiv für Renin sind. G: Glomerulus, aA: afferente Arteriole, Maßstabsbalken: 20 μm

3.4.1.2 R26R-Confetti

Bei der zweiten verwendete Mauslinie (Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x R26R-Confetti) exprimierten alle Zellen, die der Reninzelllinie angehörten, die Markerproteine GFP (nukleär), CFP (membranständig), YFP (zytosolisch) oder RFP (zytosolisch). R26R-Confetti ist ein stochastischer mehrfarbiger Reporter, wodurch eines von vier fluoreszierenden Proteinen ausschließlich bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase exprimiert wird. Da die Cre-Rekombinase in dieser Mauslinie unter der Kontrolle des endogenen Ren1d-Promotors stand, wurde demnach immer dann zufällig ein fluoreszierendes Protein gebildet, wenn der Reninpromotor während der Entwicklung aktiv war (vgl. Abbildung 9, Kapitel 2.2.1). Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x R26R-Confetti Mäusen zeigte, dass sich die Confetti-positiven Zellen, ähnlich wie bei der Renin- und GFP-



Färbung in Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG Tieren, im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum anordneten. Außerdem waren sie entlang der afferenten Arteriole selbst zu finden (s. Abbildung 27A-C). Die präglomerulären Confetti-positiven Felder waren unter Niedrigsalzdiät stets erheblich

größer als die Confetti-positiven Felder unter Normalsalzdiät. Außerdem schienen die einzelnen Zellen an sich größer und dicker zu sein (s. Abbildung 27A). Unter Hochsalzdiät waren nur noch wenige Confetti-positive Bereiche im präglomerulären Raum. Die Zellen schienen zudem kleiner und schmaler zu sein als die Zellen der präglomerulären Zellfelder unter Niedrig- bzw. Normalsalzdiät (s. Abbildung 27C). Generell waren stets alle Farben (RFP, YFP und M-CFP) innerhalb der präglomerulären Zellfelder zu finden, egal welche Salzdiät die Tiere erhalten hatten. Nukleäres GFP war hingegen nur sehr selten zu sehen.

3.4.2 Zellproliferations- und Apoptoseassays

Um einen spezifischen Anhaltspunkt darüber zu erhalten, ob innerhalb der GFP-positiven präglomerulären Zellfelder Proliferation bzw. Apoptose stattfindet, wurde jeweils ein

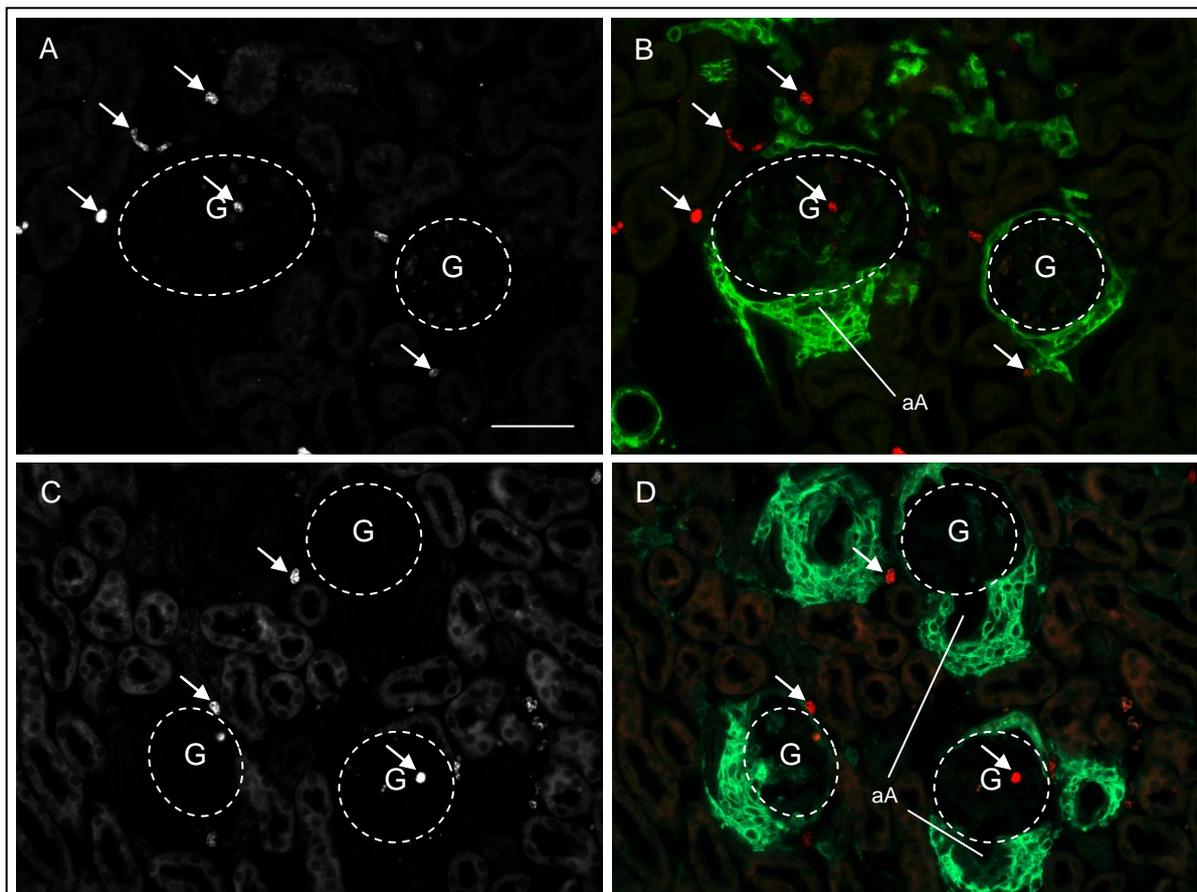


Abbildung 28: Zellproliferationsassay: Immunfluoreszenzfärbung für GFP und Ki-67 nach A+B 3.5 Tagen Normalsalzdiät, C+D 42 Tagen Normalsalzdiät. A, C: Ki-67-Färbung alleine. Innerhalb der präglomerulären GFP-Zellfelder konnten keine Ki-67-positiven, proliferierenden Zellen gefunden werden. Lediglich innerhalb des Glomerulus und in der Bowman-Kapsel waren teilweise Ki-67 gefärbte Kerne zu sehen. Pfeile kennzeichnen Ki-67-positiv gefärbte Zellen. aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Maßstabsbalken: 50 μ m

entsprechender Assay angewendet. Zur Bestimmung von proliferativen Prozessen auf Gewebestrukturen eignet sich besonders der Proliferationsmarker Ki-67. Das Ki-67 Protein kann während aller aktiven Phasen des Zellzyklus, also der G₁-, S-, G₂- und der Mitose-Phase, detektiert werden, und eignet sich daher als Marker für proliferierende Zellen²¹⁸. Es sollte untersucht werden, ob unter Nidrigsalzdiät eine Zunahme der Anzahl GFP-positiver Zellen durch Proliferation stattfindet. In Abbildung 28A-D sind exemplarisch zwei Färbungen nach 3.5 (A + B) bzw. 42 Tagen (C + D) der Nidrigsalzdiät dargestellt, wobei GFP in grün und Ki-67 in rot zu sehen ist. In beiden Darstellungen konnten innerhalb der präglomerulären GFP- Zellfelder, keine Ki-67-positiven, proliferierenden Zellen gefunden werden. Lediglich innerhalb des Glomerulus und in der Bowman-Kapsel waren teilweise Ki-67 gefärbte Kerne zu sehen (s. Pfeile). Zur Bestimmung von apoptotischen Prozessen auf Gewebestrukturen eignet sich besonders die sogenannte TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Methode. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass während der Apoptose der

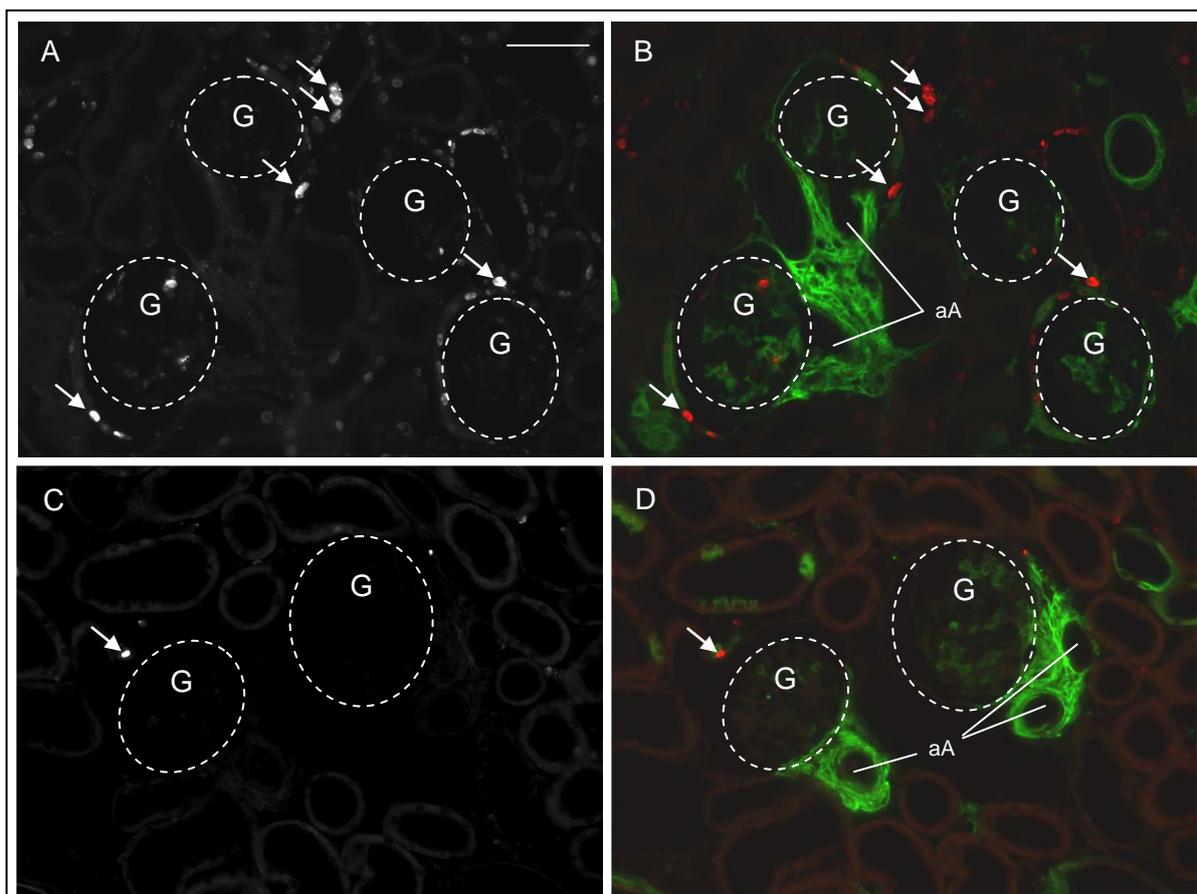
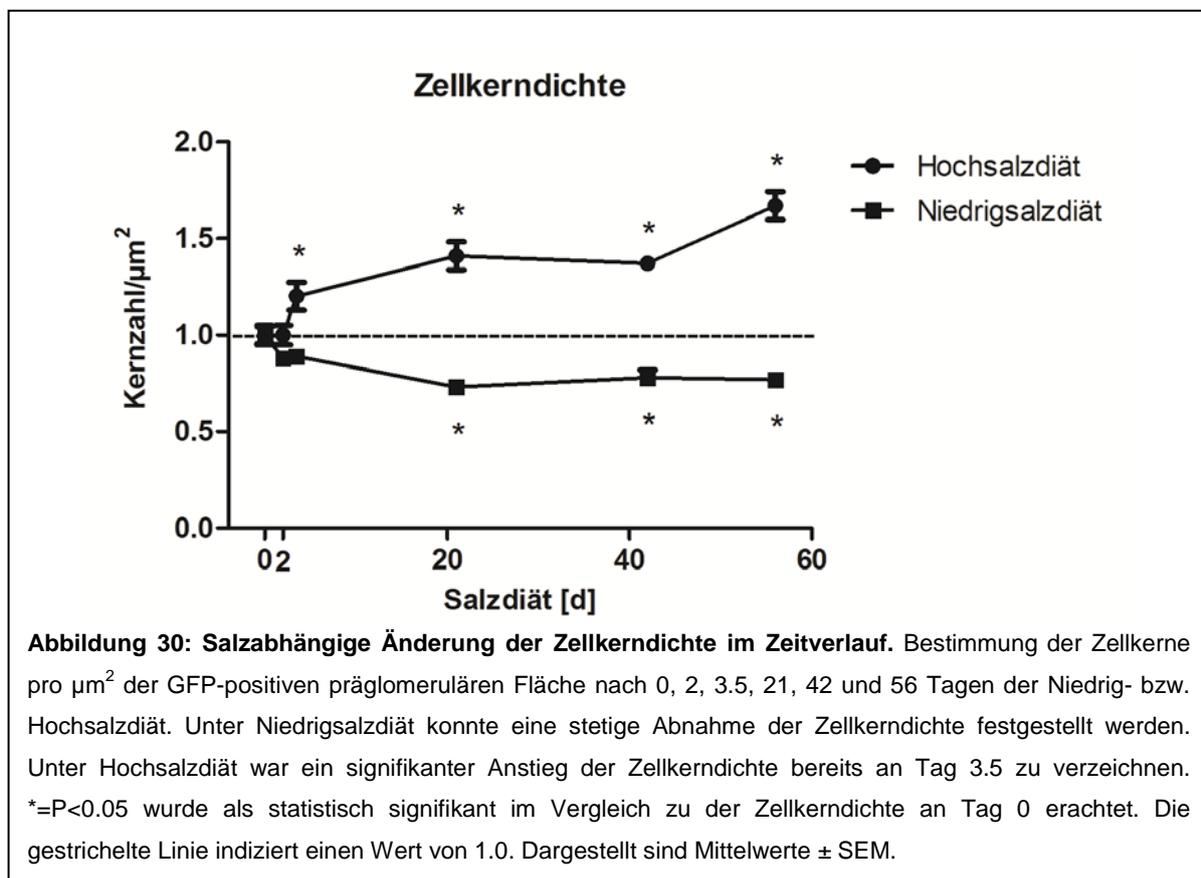


Abbildung 29: Apoptoseassay (TUNEL): Immunfluoreszenzfärbung für GFP und TUNEL nach A+B 3.5 Tagen Hochsalzdiät, C+D 42 Tagen Hochsalzdiät. A, C: TUNEL-Färbung alleine. Innerhalb der präglomerulären GFP-Zellfelder waren keine TUNEL-gefärbten, apoptotischen Zellen. Lediglich in anderen renalen Strukturen konnten vereinzelt TUNEL-positive Zellen beobachtet werden (s. Pfeile). Pfeile kennzeichnen TUNEL-positive, apoptotische Zellen. aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Maßstabsbalken: 50 µm

DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert wird. Dabei werden an den Bruchenden Hydroxylgruppen frei, welche anschließend durch das Enzym TdT (terminale deoxynucleotidyl Transferase) wie hier zum Beispiel mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen werden ²¹⁹. Es sollte untersucht werden, ob unter Hochsalzdiät eine Abnahme der Anzahl GFP-positiver Zellen durch Apoptose stattfindet oder nicht. In Abbildung 29A-D sind exemplarisch zwei Färbungen nach 3.5 (A + B) bzw. 42 Tagen (C + D) der Hochsalzdiät dargestellt, wobei GFP in grün und die TUNEL-Färbung in rot zu sehen ist. In beiden Darstellungen konnten innerhalb der präglomerulären GFP-Zellfelder keine TUNEL-gefärbten, apoptotischen Zellen gefunden werden.

3.4.3 Bestimmung der Zellkerndichte

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Methoden wurde die Zellkerndichte, also die Anzahl der Zellkerne pro präglomerulärem GFP-positiven Feld, ermittelt. Dies sollte ebenfalls Aufschluss darüber geben, ob innerhalb der GFP-positiven präglomerulären Felder Zellproliferation bzw. Apoptose stattfindet. Wie bereits festgestellt wurde, nimmt die Fläche der präglomerulären GFP-Zellfelder unter Nidrigsalzdiät zu, bzw. unter Hochsalzdiät ab. Durch die Bestimmung der Zellkernanzahl innerhalb dieser GFP-positiven Flächen und dem daraus resultierenden Verhältnis (Anzahl Zellkerne innerhalb dieser Fläche/ Fläche) wurde



dadurch eine mögliche Zu- bzw. Abnahme der Zellzahl bestimmt. In Abbildung 30 ist die salzabhängige Änderung der Zellkerndichte im Zeitverlauf dargestellt. Unter Niedrigsalzdiät konnte eine stetige Abnahme der Zellkerndichte festgestellt werden. An Tag 21 der Niedrigsalzdiät konnte ein signifikanter Rückgang der Dichte um 27% beobachtet werden. Im weiteren Zeitverlauf blieb die Zellkerndichte daraufhin konstant. Unter Hochsalzdiät war ein signifikanter Anstieg der Zellkerndichte um 20% bereits an Tag 3.5 zu verzeichnen. Maximal stieg das Verhältnis Zellkerne/ μm^2 unter Hochsalzdiät um 67% an.

4. Diskussion

Die Aspartylprotease Renin, welche von dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt wird, ist als Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems maßgeblich an der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes und damit auch an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Unter normalen, nicht-pathologischen Bedingungen, sind nur wenige Renin-bildende Zellen innerhalb der Media-Schicht der afferenten Arteriole an juxtaglomerulärer Position zu finden. Durch eine starke Stimulation des RAAS oder genetisch bedingte Defekte innerhalb der RAAS-Kaskade kann es hingegen zu einer Rekrutierung von Renin-bildenden Zellen kommen. Dies kann in Form einer retrograden Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole^{60,90} oder aber auch in Form einer Reninzellhyperplasie im extraglomerulären Mesangium stattfinden. Letzteres bedeutet, dass die Lokalisation der Reninzellen nicht mehr nur auf den juxtaglomerulären Bereich beschränkt ist, sondern, dass sowohl entlang der Gefäßwand afferenter Arteriolen, als auch in mehrschichtigen Zelllagen um die präglomerulären Gefäße, Renin-produzierende Zellen zu finden sind. Solch eine Reninzellhyperplasie tritt beispielsweise in Aldosteronsynthese Knockout Mäusen auf (s. Abbildung 7B). Wie in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen üblich, sind Renin-produzierende Zellen in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole, zum Teil aber auch um die Interlobulararterien angeordnet. Diese Reninzellhyperplasie kommt wahrscheinlich dadurch zustande, weil die letzten Schritte der Bildung von Aldosteron nicht mehr enzymatisch katalysiert werden können. So konnte im Blutplasma von Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen auch kein Aldosteron mehr nachgewiesen werden¹⁹⁶. Die fehlende Wirkung von Aldosteron führt zu einem erniedrigten Blutdruck, der wiederum die Reninsynthese und -sekretion anregt^{87,196}. Eine detailliertere Betrachtung der perivaskulären Renin-positiven Zellen von Aldosteronsynthese Knockout Mäusen mittels Konfokal- und Elektronenmikroskopie zeigte deutlich, dass diese die gleiche kuboide Form aufweisen wie die vaskulären Reninzellen und dass sie ebenfalls Renin-positive Vesikel enthalten¹. Dies zeigt, dass die perivaskulären Renin-bildenden Zellen fähig sind, Renin in Vesikel zu verpacken, was die Voraussetzung für eine regulierte Reninfreisetzung darstellt. Die kontrollierte Exozytose Renin-haltiger Vesikel^{13,207,208} scheint innerhalb der juxtaglomerulären Zellen durch Aktivierung des cAMP-Signalweges zu verlaufen^{13,209}.

Untersuchungen zur Funktionalität der hyperplastischen renalen Reninzellen in Aldosteronsynthese Knockout Tieren wurden bereits am Modell der isoliert perfundierten Mausniere durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Reninsekretion durch Katecholamine und der Hemmbarkeit durch

Angiotensin II und den Perfusionsdruck sowie der „paradoxen“ Wirkung von Kalzium keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Nieren gab. Die Funktionalität der perivaskulären Reninzellen unterscheidet sich demnach nicht von der der klassischen juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen¹.

Auf diese Erkenntnisse aufbauend sollte in dieser Arbeit eine weiterführende Charakterisierung der perivaskulären Reninzellen erfolgen. Da bisher noch wenig über die Herkunft der perivaskulären Renin-bildenden Zellen bekannt ist, sollten diese auf ihre Salzabhängigkeit hin untersucht werden. Dadurch sollte ein Anhaltspunkt darüber erhalten werden, ob sie bei erhöhtem Bedarf an Renin, hervorgerufen durch das Füttern einer Niedrigsalzdiät, durch Proliferation bereits bestehender Renin-produzierender Zellen neu entstehen oder ob sie durch Transformation aus anderen renalen Zelltypen hervorgehen können. Außerdem sollte geklärt werden, ob bei vermindertem Bedarf an Renin durch Hochsalzdiät die perivaskulären Renin-bildenden Zellen durch Apoptose verschwinden, oder lediglich die Produktion von Renin einstellen. Daher wurde zunächst untersucht, wie schnell eine Änderung der Salzzufuhr auf die Reninexpression und -sekretion in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen wirkt. Auch mit Renin koregulierte Gene wie Cx40, Akr1b7 und COX-2 wurden auf ihre Salzabhängigkeit hin untersucht. Zudem wurde die Reinduzierbarkeit der Reninexpression nach deren längerer salzbedingter Suppression in dieser Arbeit bestimmt. Die Untersuchung auf Zellproliferation und Apoptose mit Hilfe entsprechender Assays war hinsichtlich der salzinduzierten Änderung der Reninexpression von besonderer Bedeutung.

4.1 Änderung der Reninexpression und -sekretion in Abhängigkeit von der Salzdiät

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen fand sich an allen untersuchten Glomeruli eine Hyperplasie Renin-bildender Zellen im Bereich der afferenten Arteriole in adulten Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen, was auf eine starke Aktivierung des RAAS in diesen Tieren hinweist (s. Abbildung 12B)⁸⁷. Unter Salzdepletion durch Niedrigsalzdiät kam es in Aldosteronsynthase Knockout Mäusen zu einer Zunahme der Reninimmunoreaktivität verglichen mit der Reninimmunoreaktivität unter Normalsalzdiät (s. Abbildung 12A). Bei erhöhter Salzzufuhr durch Hochsalzdiät konnte hingegen eine starke Abnahme der Reninimmunoreaktivität festgestellt werden (s. Abbildung 12C). Diese Befunde stimmen mit vergleichbaren Experimenten an Wildtyp-Mäusen überein¹²⁴. Um zu ermitteln, wie schnell sich die Reninexpression und -sekretion unter erhöhter bzw. verminderter Salzzufuhr ändert, wurden Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse über unterschiedliche Zeiträume entweder mit

einer Niedrig- bzw. Hochsalzdiät gefüttert. Die Verfolgung der Renin mRNA Abundanz im Zeitverlauf zeigte, dass bereits nach 2 Tagen der Nidrigsalzdiät und 3.5 Tagen der Hochsalzdiät eine signifikante Zu- bzw. Abnahme der Renin mRNA Werte im Vergleich zu der Renin mRNA Abundanz an Tag 0 der Diäten stattgefunden hat. Daraus lässt sich schließen, dass die salzinduzierte Änderung der Reningenexpression in sehr kurzer Zeit nach Änderung der Salzzufuhr erfolgen muss. Bei der Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration im Zeitverlauf ergab sich ein ähnliches Bild. Hier zeigte sich nach 3.5 Tagen der Nidrigsalzdiät bzw. 2 Tagen der Hochsalzdiät eine signifikante Zu- bzw. Abnahme der Plasma-Renin-Konzentration im Vergleich zu der Plasma-Renin-Konzentration an Tag 0 der Diäten (s. Abbildung 11). Die salzinduzierte Änderung der Reninsekretion erfolgt demnach, entsprechend der Reningenexpression, in sehr kurzer Zeit nach Änderung der Salzzufuhr. Sowohl bei der Renin mRNA Expression als auch bei der Plasma-Renin-Konzentration konnte also festgestellt werden, dass jeweils zwischen 2 und 3.5 Tagen der jeweiligen Salzdiät eine signifikante Erhöhung bzw. Erniedrigung der Renin mRNA Expression und der Plasma-Renin-Konzentration stattfand. Dies deutet darauf hin, dass die salzinduzierte Änderung der Reninsekretion zeitgleich mit der Änderung der Reningenexpression erfolgt.

Um zu untersuchen, wie schnell die Anpassung der Menge an Renin an eine erniedrigte bzw. erhöhte Salzzufuhr auf Proteinebene stattfindet, wurde sowohl die Fläche der präglomerulären Reninzellfelder in Aldosteronsynthase Knockout Tieren unter Normal-, Niedrig- und Hochsalzdiät, als auch die gesamte Renin-Protein-Menge durch Western Blot bestimmt. Bei Betrachtung der durchschnittlichen Fläche präglomerulärer Reninzellfelder pro Glomerulus konnte festgestellt werden, dass sich die Fläche bereits nach 2 Tagen der Nidrigsalzdiät um 57% gegenüber der Fläche unter Normalsalzdiät vergrößerte und sich im weiteren Zeitverlauf auch nicht weiter vergrößerte. Unter Hochsalzdiät konnte eine Verringerung der Fläche um 37% an Tag 3.5 der Diät im Vergleich zu der Fläche an Tag 0 beobachtet werden. Im weiteren Zeitverlauf verringerte sich die Fläche stetig weiter, aber maximal um 84%. Die salzabhängige Bestimmung der Quantität des Reninproteins ergab ein ähnliches Bild. Bereits an Tag 3.5 der Nidrigsalzdiät kam es zu einer signifikanten Zunahme des Reninproteins um 30% gegenüber dem Ausgangswert an Tag 0 der Diät. Im weiteren Zeitverlauf stieg die Quantität des Reninproteins noch weiter an, aber maximal um 63%. Unter Hochsalzdiät kam es an Tag 3.5 zu einer signifikanten Abnahme des Reninproteins um 42%. Im weiteren Zeitverlauf nahm die Quantität des Reninproteins noch weiter ab, aber maximal um 82%. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass auch auf Proteinebene bei starker Stimulation des RAAS durch niedrige Natrium-Konzentrationen im Futter die Neubildung von Renin sehr schnell, also innerhalb von wenigen Tagen anlaufen muss. Die Produktion von Renin muss demnach zeitlich direkt auf die Reningenexpression erfolgen. Der Abbau des Reninproteins scheint hingegen mehr Zeit in Anspruch zu nehmen, da hier

über den gesamten untersuchten Zeitraum eine stetige Abnahme zu erkennen war. Auch die Zu- bzw. Abnahme der durchschnittlichen Fläche der Renin-positiven präglomerulären Zellfelder findet zeitgleich mit der Reningenexpression und -synthese statt, wobei auch hier eine stetige Abnahme der präglomerulären Reninzellfelder über den gesamten untersuchten Zeitraum unter Hochsalzdiät beobachtet werden konnte. Verglichen mit der Plasma-Renin-Konzentration, bei der zu sehen war, dass bereits nach 2 Tagen der Hochsalzdiät die Reninsekretion nahezu zum Erliegen kam, weist der eher langsame Rückgang des intrarenal gespeicherten Reninproteins darauf hin, dass die Reninsekretion nicht durch das verfügbare Renin bestimmt ist. Vielmehr muss hier ein intrazellulärer Mechanismus dafür sorgen, dass bei erhöhter Salzaufnahme weniger Renin in den Blutkreislauf sezerniert wird.

Die Tatsache, dass unter Niedrigsalzdiät die Genexpression und Synthese von Renin innerhalb von sehr kurzer Zeit erhöht wurde, liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die erhöhte Reninexpression und -synthese auf entsprechende bereits vorhandene Zellanlagen zurückzuführen sein könnte. Es wäre denkbar, dass der akute Bedarf an Renin durch eine vergleichsweise wenig Zeit in Anspruch nehmende Transformation dieser Zellanlagen zu Renin-bildenden Zellen gedeckt werden kann. Um diese Theorie zu bestärken, wurden auch Gene, von denen bekannt ist, dass sie mit Renin koreguliert werden vergleichend auf eine mögliche Salzabhängigkeit hin untersucht.

4.2 Änderung der Expression von mit Renin koregulierten Genen in der Niere

Anhand von Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen konnte bereits festgestellt werden, dass das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40 für Renin-bildende Zellen insofern wichtig ist, als dass es für eine normale Lokalisation innerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriolen sorgt. So findet in Cx40 Knockout Mäusen eine Dislokation Renin-bildender Zellen in den Bereichen des extraglomerulären Mesangiums und des periglomerulären Interstitiums statt^{1,137}. Außerdem spielt Cx40 nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Reninsekretion, vermutlich dadurch, dass es die Weiterleitung des inhibierenden Kalzium-Signals und anderer Signalmoleküle (z.B. ATP) ermöglicht^{1,136,137,139,145-148}. Zudem wird diskutiert, ob Cx40-Halbkanäle als Mechanorezeptoren fungieren könnten, die zug- oder druckabhängig den Einstrom von Kalziumionen in Renin-bildende Zellen ermöglichen bzw. die Freisetzung von ATP vermitteln¹⁴². Die Expression von Cx40 ist demnach eng an die Expression und Synthese von Renin gekoppelt, weshalb vergleichend mit Renin eine salzabhängige Untersuchung der Cx40 mRNA Abundanz sowie der Fläche präglomerulärer Cx40-positiver Zellfelder im Zeitverlauf durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich eine signifikante Zu- bzw. Abnahme der Cx40 mRNA Abundanz bereits an Tag 2 der

Niedrigsalzdiät bzw. an Tag 3.5 der Hochsalzdiät im Vergleich zu der mRNA Expression an Tag 0. Auch die Renin mRNA Abundanz zeigte eine signifikante Zu- bzw. Abnahme an Tag 2 der Niedrigsalzdiät bzw. an Tag 3.5 der Hochsalzdiät. Daraus lässt sich schließen, dass die Cx40-Genexpression zeitgleich mit der Renin-Genexpression abläuft und dass die salzabhängige Änderung der Cx40 mRNA-Expression ebenfalls gleich schnell ablaufen muss. Unter Niedrigsalzdiät kam es auch bei der Flächenmessung der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder wie auch bei der Flächenmessung der präglomerulären Reninzellfelder zu einer Flächenvergrößerung um maximal 58%. Niedrigsalzdiät führte demnach sowohl bei Renin als auch bei Cx40 in gleichem Maße zu einer Flächenvergrößerung. Unter Hochsalzdiät ergab sich über den gesamten untersuchten Zeitraum ein Rückgang der Cx40-positiven präglomerulären Zellfelder um maximal 55%. Dies stellt einen entscheidenden Unterschied zu der Flächenbestimmung der präglomerulären Reninzellfelder dar, da hier die durchschnittlichen Flächen pro Glomerulus über den gesamten untersuchten Zeitraum stetig abnahmen. Dabei kam es zu einer Flächenverringerng um bis zu 85%. Man kann also sagen, dass unter lang anhaltender Hochsalzdiät die Cx40-Immunoreaktivität und die Fläche der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder nicht in gleichem Maße abnahm, wie die Reninimmunoreaktivität und damit die Fläche der präglomerulären Renin-bildenden Zellen. Dies wird vor allem in Abbildung 16 deutlich. Während die Reninimmunoreaktivität nach 6-wöchiger Hochsalzdiät hier ausschließlich auf den Gefäßbereich beschränkt war, konnte im präglomerulären Bereich außerhalb der Gefäße an vielen Glomeruli starke Cx40-Immunoreaktivität nachgewiesen werden. Diese Cx40-positiven Zellfelder entsprechen denjenigen Feldern, die unter Normalsalzdiät sowohl positiv für Cx40 als auch für Renin färben. Dies legt die Vermutung nahe, dass es im extraglomerulären Mesangium Zellen gibt, die in der Lage sind, Renin zu exprimieren, aber unter länger andauernder Hochsalzdiät wahrscheinlich die Reninproduktion einstellen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass unter vermindertem Bedarf an Renin perivaskuläre Renin-bildende Zellen eine Transformation zu einem anderen Cx40 exprimierenden Zelltyp durchlaufen. Es wurde bereits beschrieben, dass Reninzellen aus glatten Muskelzellen der Arteriolen oder extraglomerulären Mesangialzellen hervorgehen können ^{7,67}. So ist es auch denkbar, dass sich Renin-bildende Zellen wieder in extraglomeruläre Mesangialzellen, welche ebenfalls Cx40 exprimieren, umwandeln könnten. Bei Krankheiten, die eine chronische Stimulation des RAAS bewirken, konnte bereits die Synthese von Renin in extraglomerulären Mesangialzellen nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise beim Bartter-Syndrom ²²⁰ bzw. beim Pseudo-Bartter-Syndrom ⁶⁴, Morbus Addison ²²¹, sowie bei Krankheiten, die mit einem Volumen- und Elektrolytverlust einhergehen ¹⁸⁷ der Fall. Auch durch lang andauernde RAAS-Stimulierung, wie beispielsweise durch 6- bzw. 4-monatige Mineralocorticoid-Defizienz ⁶³ oder 4-wöchige

unilaterale Nierenstenose²²², konnte Renin-Produktion im extraglomerulären Mesangium gefunden werden. Wie bereits mehrfach beschrieben exprimieren die extraglomerulären Mesangialzellen von Wildtyp-Mäusen das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40. Über dieses stehen sie mit den benachbarten juxtaglomerulären Zellen und intraglomerulären Mesangialzellen in Kontakt^{1,135,223,224}. Dasselbe konnte auch für Aldosteronsynthese Knockout Mäuse gezeigt werden¹.

Obwohl also gezeigt werden konnte, dass die Fläche präglomerulärer Cx40-positiver Felder unter Hochsalzdiät nicht in gleichem Maße abnahm wie die Fläche präglomerulärer Renin-positiver Felder, konnte dennoch immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass die präglomeruläre Cx40-Immunoreaktivität durch Nidrigsalzdiät stark zunimmt bzw. durch Hochsalzdiät abnimmt (s. Abbildung 15 A, C, E). Diese Beobachtung deckt sich tendenziell mit derjenigen der Flächenzu- bzw. -abnahme, die bereits für die Reninimmunoreaktivität unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen gemacht wurde. Somit folgt auch für Cx40 die salzinduzierte Änderung der präglomerulären Cx40-Fläche und somit wahrscheinlich auch des Cx40-Proteins zeitgleich der Änderung der Cx40-mRNA-Expression.

Ein weiteres Gen, welches mit Renin koreguliert wird, ist das der Aldose-Ketose Reduktase 1b7 (Akr1b7). Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen isolierter Reninzellen konnte bereits gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu anderen Nierenzellen verstärkt Akr1b7 exprimieren⁷. Auch immunhistochemisch ließ sich Akr1b7 hauptsächlich in Renin-bildenden Zellen und Intermediärzellen der afferenten Arteriole nachweisen. Auch glatte Muskelzellen, die sich nach Stimulation des RAAS in Renin-produzierende Zellen umgewandelt hatten, zeigten sich in Folge der Umwandlung Akr1b7-positiv¹⁵². Daher gilt die Expression von Akr1b7 als charakteristisch für den endokrinen Reninzell-Phänotyp und als ein unabhängiger Marker Renin-produzierender Zellen¹⁵³. Deshalb wurde auch Akr1b7 auf eine mögliche Salzabhängigkeit hin untersucht. Aus der Bestimmung der Akr1b7 mRNA Abundanz ergab sich eine Verdoppelung der mRNA Werte bereits an Tag 2 der Nidrigsalzdiät. Dies entspricht lediglich der Hälfte des Anstiegs, der bei der Renin mRNA Messung unter Nidrigsalz im selben Zeitraum zu verzeichnen war. Grund dafür könnte sein, dass in den einzelnen Renin-produzierenden Zellen nicht genauso viel Akr1b7 gebildet wird, wie Renin gebildet wird. Es könnte auch sein, dass es Zellen gibt, die noch kein Akr1b7 exprimieren, da dieses evtl. zeitlich verzögert erst nach Renin gebildet wird. Tatsächlich zeigten immunhistochemische Kofärbungen von Renin und Akr1b7 nach 6-wöchiger Nidrigsalzdiät, dass die perivaskulären Zellpopulationen sehr heterogen gefärbt waren (s. Abbildung 18A+B). So zeigten sich Bereiche mit starker Kolo-kalisation von Renin und Akr1b7, aber auch Bereiche bzw. einzelne Zellen, die nur Renin aber kein Akr1b7 bzw. nur sehr schwach Akr1b7 aufwiesen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Machura et al., 2012

überein. Sie konnten ebenfalls feststellen, dass Akr1b7-Immunoreaktivität in diesen perivaskulären Reninzellfeldern der Aldosteronsynthese Knockout Mäuse nur zu einem gewissen Grad eindeutig mit Renin kolokalisierten. Anders verhält es sich hingegen mit der Kolokalisation mit vaskulären Renin-bildenden Zellen. Diese weisen eindeutig auch Akr1b7-Färbung auf. Dies deutet darauf hin, dass die Markierung durch Akr1b7 lediglich einen Teil der Renin-exprimierenden Zellen erfasst und Akr1b7 somit als Marker für Modelle mit ektopischen Renin-produzierenden Zellen eher weniger geeignet ist. Dennoch konnte unter Hochsalzdiät ein starker Rückgang der Akr1b7 mRNA Abundanz festgestellt werden. Bereits an Tag 2 war eine Verringerung der Akr1b7 mRNA Werte um 69% erfolgt, im weiteren Zeitverlauf konnte sogar eine Verringerung um 84% festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte die Renin mRNA Expression an Tag 2 der Hochsalzdiät einen Rückgang um 52%, im weiteren Zeitverlauf sogar einen Rückgang um 92%. Unter Hochsalzdiät scheinen sich die Renin- und Akr1b7-Expressionen also ähnlich zu verhalten. Auch in der immunhistochemischen Färbung zeigte sich für die Akr1b7-Färbung ein sehr ähnlicher Rückgang der Immunoreaktivität wie für Renin (s. Abbildung 18F). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass unter Hochsalzdiät zunächst die perivaskulären und danach auch noch die vaskulären Renin-bildenden Zellen die Reninexpression und zugleich die Akr1b7-Expression einstellen. Wie bereits erwähnt findet zwischen vaskulären Renin-produzierenden Zellen und Akr1b7 eine starke Kolokalisation statt. Dies wiederum bestärkt die Annahme, dass die perivaskulären Reninzellen möglicherweise nicht von den vaskulären Reninzellen abstammen.

Auch die Cyclooxygenase-2 wurde auf ihre Salzabhängigkeit hin untersucht, da man annimmt, dass auch sie an der Regulation der Reninexpression und -synthese beteiligt ist. In der Niere findet COX-2 Expression vor allem in den Zellen der Macula Densa statt, zum Teil aber auch in interstitiellen Zellen der Medulla und in Macula Densa-nahen Bereichen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschleife (TALH). Nach 3-wöchiger Nidrigsalzdiät konnte eine 8,5-fache Zunahme der COX-2 mRNA Abundanz im Vergleich zu der COX-2 mRNA Expression unter Normalsalzdiät festgestellt werden (s. Abbildung 19A). Dieser Befund wird durch vergleichbare Versuche von Yang et al. (1998) an Wildtyp-Ratten bestätigt, bei denen gezeigt werden konnte, dass unter Nidrigsalzdiät die kortikale wie auch die medulläre COX-2 mRNA Expression signifikant ansteigt¹⁷².

Unter Hochsalzdiät konnte lediglich eine leichte Tendenz zur Abnahme der COX-2 mRNA-Spiegel festgestellt werden (s. Abbildung 19A). Grund dafür könnte sein, dass für die Bestimmung der COX-2 mRNA Expression die gesamte Niere und nicht ausschließlich der Kortex verwendet wurde. Da aber COX-2 Expression vor allem auch für die innere Medulla nachgewiesen werden konnte, könnte ein vielleicht eindeutiger Effekt innerhalb der

kortikalen COX-2 produzierenden Zellen der Macula Densa durch die COX-2 mRNA Expression der inneren Medulla überdeckt worden sein. Salzabhängige Untersuchungen an Wildtyp-Ratten konnten bereits zeigen, dass unter Hochsalzdiät die kortikale COX-2 mRNA Expression um das 2,9-fache im Vergleich zur Normalsalzdiät zurückging, während in der inneren Medulla die mRNA Expression sogar um das 4,5-fache anstieg¹⁷².

Immunhistochemisch war jedoch ein eindeutiger Rückgang der COX-2 Expression unter Hochsalzdiät festzustellen (s. Abbildung 20). Während unter Normalsalzdiät durchschnittlich 60% aller Glomeruli eine COX-2-positive Färbung im Bereich der Macula Densa aufwiesen, waren es nach 6-wöchiger Hochsalzdiät nur noch halb so viele. Zudem ergab die Flächenausmessung im Zeitverlauf der Hochsalzdiät, dass bereits nach 2 Tagen ein signifikanter Rückgang der COX-2-positiven Fläche pro Glomerulus um 57% stattfand. Im Gegensatz dazu führte eine Niedrigsalzdiät bereits an Tag 3.5 zu einer Zunahme der COX-2-positiven Flächen pro Glomerulus um 23%. Erstaunlicherweise wiesen auch unter Niedrigsalzdiät durchschnittlich genauso viele Glomeruli eine COX-2-positive Färbung im Bereich der Macula Densa auf, wie unter Normalsalzdiät. Dafür fanden sich vermehrt COX-2-positive Zellen im Bereich der dicken aufsteigenden Henleschleife (s. Abbildung 20A+B). Demnach erfolgt also auch die Zunahme der COX-2-positiven Fläche unter Niedrigsalzdiät bzw. deren Flächenabnahme unter Hochsalzdiät in sehr kurzer Zeit nach Änderung der Salzzufuhr. Auch die Flächenzu- bzw. -abnahme der Reninzellen erfolgte bereits 2-3.5 Tage nach Änderung der Salzzufuhr. Diese Befunde deuten daher auf eine starke Verbindung der COX-2-Expression und -Synthese der Macula Densa und der Reninexpression und -synthese der perivaskulären Renin-bildenden Zellen hin.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch die Gene von Cx40, Akr1b7 und COX-2 in vergleichbarem Maße mit dem Reningen koreguliert werden. Die Tatsache, dass die Fläche der präglomerulären Cx40-positiven Zellfelder unter Hochsalzdiät erheblich größer war als die Fläche der Renin-positiven Zellfelder unter Hochsalzdiät deutet darauf hin, dass diese Cx40-positiven Zellen die Zellanlagen sein könnten, aus denen bei Bedarf Renin-produzierende Zellen durch Transformation hervorgehen. Da das Vorhandensein von Cx40 unter anderem die Zellen des extraglomerulären Mesangiums kennzeichnet, liegt die Vermutung nahe, dass es genau diese Zellen sind, die sich in Renin-bildende Zellen umwandeln könnten. Die Tatsache, dass die Synthese der COX-2 entsprechend wie die Expression und Synthese von Renin salzabhängig reguliert wird, könnte darauf hindeuten, dass die COX-2 bzw. von ihr abgeleitete Prostaglandine als wesentliche Hauptmediatoren auf die Reninexpression und -synthese wirken könnten.

4.3 Stimulierbarkeit von Renin und mit Renin koregulierten Genen nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression

Um zu überprüfen, ob nach einer längeren Periode der salzbedingten Suppression die mRNA Expression von Renin und mit Renin koregulierten Genen (Cx40 und Akr1b7) wieder induziert werden kann, wurde Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen eine Diät bestehend aus einer 3-wöchigen Hochsalzdiät gefolgt von einer 3-wöchigen Niedrigsalzdiät verabreicht. Bei Betrachtung der Renin mRNA Expression konnte festgestellt werden, dass selbst nach einer 3-wöchigen Suppression der Reningenexpression durch hohe Salzzufuhr, die Reninzellen genauso stimulierbar waren wie ausgehend von einer Normalsalzdiät. Dies ist daran zu erkennen, dass die Diät von 3 Wochen Hochsalzdiät und anschließend 3 Wochen Niedrigsalzdiät genauso hohe Renin mRNA Spiegel induzierte, wie eine 3-wöchige Stimulation durch Niedrigsalzdiät alleine (s. Abbildung 21A). Herauszuheben ist auch, dass eine 3-wöchige Suppression durch Hochsalzdiät die Renin mRNA Werte fast auf WT-Niveau senkte. Die nachfolgende Reinduktion durch Niedrigsalzdiät bewirkte demnach einen 40-fachen Anstieg der Reninexpression, während ausgehend von der mRNA Expression unter Normalsalzdiät ein 4-facher Anstieg der Renin mRNA Expression unter Niedrigsalzdiät stattfand. Die Reningenexpression ist demnach sehr adaptiv, selbst wenn es zu einer starken Störung des Salzhaushaltes kommt.

Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für die mRNA Expression von Connexin 40 (s. Abbildung 21B) und Akr1b7 (s. Abbildung 21C). Auch hier konnte jeweils nach der Diät von 3 Wochen Hochsalzdiät gefolgt von 3 Wochen Niedrigsalzdiät annähernd das gleiche Niveau erreicht werden, wie unter Niedrigsalzdiät alleine. Somit lassen sich auch die Cx40 und Akr1b7 mRNA Expression auch nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression vollständig reinduzieren. Dieser Befund stärkt die Hypothese, dass die Renin mRNA Expression stark mit der Cx40 mRNA Expression korreliert und auch, dass die Akr1b7 mRNA Expression entsprechend wie die Renin mRNA Expression bei Störung des Salzhaushaltes reguliert wird.

Entsprechend wie die Renin mRNA Expression, konnte auch die Plasma-Renin-Konzentration nach einer 3-wöchigen salzbedingten Suppression wieder vollständig reinduziert werden (s. Abbildung 22A). Am Modell der isoliert-perfundierten Niere wurde die Reninsekretionsrate untersucht (s. Abbildung 22B). Dabei wurden Aldosteronsynthese Knockout Tiere verwendet, die entweder Normalsalzdiät oder 14 bzw. 28 Tage Hochsalzdiät erhalten hatten. Nach einer stufenweisen Inhibierung der Reninsekretion durch aufsteigende Konzentrationen von Angiotensin II (ANGII) im Perfusat (30, 300, 1000 pM) erfolgte eine starke Stimulierung der Reninsekretion durch die Gabe von 3.1 mM EGTA. Zunächst war

auffallend, dass, egal ob das Tier 14 oder 28 Tage vor der Messung mit Hochsalzdiät behandelt wurde, sowohl die basalen Ausgangswerte, wie auch die Werte nach der stufenweisen Inhibierung durch ANGII kaum zu unterscheiden waren. Dies bestätigt die Ergebnisse des Zeitgangs (vgl. Abbildung 11B), wo bereits nach 2 Tagen der Hochsalzdiät ein sehr starker Abfall der Plasma-Renin-Konzentration zu sehen war und auch im weiteren Zeitverlauf keine weitere Verringerung mehr stattfand. Erstaunlich ist daher, dass es durch die Zugabe von ANGII überhaupt noch zu einer Verringerung der Reninsekretionsrate kam. Dies liegt wahrscheinlich an der unnatürlich hohen Konzentration von eingesetztem ANGII bei dieser Methode. In vivo würde eine solch hohe ANGII Konzentration nicht vorkommen.

Nach der stufenweisen Inhibierung durch ANGII erreichte die Reninsekretionsrate des mit Normalsalzdiät gefütterten Tieres durch die Stimulation mit dem Kalzium-Chelator EGTA innerhalb weniger Minuten die gleiche Sekretionsrate wie unter basalen Bedingungen am Anfang der Messung. Die Reninsekretionsrate des 14 Tage lang mit Hochsalzdiät gefütterten Tieres stieg sogar über seinen Basalwert hinaus und erreichte annähernd die gleiche Reninsekretionsrate wie das mit Normalsalzdiät gefütterte Tier unter Einfluss von EGTA. Das gleiche konnte für das 28 Tage lang mit Hochsalzdiät gefütterte Tier beobachtet werden. Auch hier wurde unter Einfluss von EGTA eine höhere Reninsekretionsrate als bei der Ausgangssituation erreicht. Auch dieser Befund zeigt deutlich, dass die Reninsekretion selbst nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression durch einen starken Stimulus wieder reinduziert werden kann. Die Tatsache, dass die Reinduktion so schnell stattfand und dabei sogar eine höhere Reninsekretion als bei der Ausgangssituation erreicht wurde, könnte darauf hindeuten, dass die Kapazität der einzelnen Renin-bildenden Zellen zur Renin-Synthese und -Sekretion noch nicht ausgeschöpft war. Dies würde bedeuten, dass diese bereits Renin-bildenden Zellen in der Lage sind, durch eine starke Stimulation, sowohl die Produktion, als auch die Sekretion von Renin stark zu erhöhen. Es wäre aber auch denkbar, dass an bereits Renin-bildende Zellen angrenzende Zellen (z.B. extraglomeruläre Mesangialzellen) die Fähigkeit erlangen, Renin zu synthetisieren. Es wäre auch denkbar, dass eine Kombination aus beiden Möglichkeiten zutrifft. Eine andere Möglichkeit wäre, dass weitere Renin-produzierende Zellen durch Proliferation aus bereits bestehenden Reninzellen hervorgehen könnten, und es dadurch zu einem Anstieg der Reningenexpression, -synthese und -sekretion kommt. Im Umkehrschluss könnte es demnach auch sein, dass die durch Hochsalzdiät verursachte Abnahme der Renin mRNA Expression, Plasma-Renin-Konzentration oder der präglomerulären Reninzellfelder durch apoptotische Prozesse erfolgt.

4.4 Rolle von Zellproliferation und Apoptose bei der salzbedingten Änderung der Reninexpression

Wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert findet auf Proteinebene bei starker Stimulation des RAAS durch niedrige Natrium-Konzentrationen im Futter die Neubildung von Renin sehr schnell, also innerhalb von wenigen Tagen statt. Die Produktion von Renin muss also zeitlich direkt auf die Reninexpression erfolgen, da auch sie nach 2 Tagen signifikant ansteigt. Auch die Zunahme der Fläche der Renin-positiven präglomerulären Zellfelder findet zeitgleich mit der Reninexpression und -synthese statt. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Steigerung der Reninproduktion unter Nidrigsalzdiät dadurch zustande kommt, dass mehr Zellen durch Proliferation entstehen, oder dadurch, dass bereits vorhandene Zellen mehr Renin produzieren und sich dadurch vergrößern. Möglich wäre auch, dass angrenzende Zellen, wie etwa extraglomeruläre Mesangialzellen, zu Renin-bildenden Zellen umgewandelt werden. Umgekehrt scheint der Abbau von bereits vorhandenem Reninprotein unter Hochsalzdiät in den Reninzellen langsamer abzulaufen. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, nahm sowohl die Reninfläche (A) als auch das Reninprotein (B) kontinuierlich mit der Dauer der Hochsalzdiät ab. Ein Minimalwert wurde bei Betrachtung des Reninproteins ca. an Tag 21 erreicht. Erst an Tag 42 etwa erreichte die Reninfläche einen Minimalwert. Die Verkleinerung der Reninfläche folgt also zeitlich dem Rückgang an Reninprotein in den perivaskulären Reninzellen. Es stellt sich die Frage, ob der Rückgang der Fläche präglomerulärer Reninzellfelder und der Menge des Reninproteins auf apoptotische Vorgänge zurückzuführen ist, oder ob die Zellen per se bestehen bleiben und lediglich durch die Abwesenheit der Reninvesikel schrumpfen.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Aldosteronsynthese-defiziente Mäuse verwendet, in denen alle Zellen, deren Vorläufer im Laufe der Entwicklung Renin exprimiert hatten, mit dem Fluoreszenzmarker GFP markiert waren. Somit kennzeichnet GFP in diesem Mausmodell die Reninzelllinie. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit früheren Befunden⁶⁷, dass neben juxtaglomerulären Zellen und glatten Muskelzellen, zum Teil auch tubuläre Strukturen, wie das Sammelrohrsystem oder Teile der dicken aufsteigenden Henleschleife aber auch Mesangialzellen sowie interstitielle Zellen GFP exprimierten. Dies deutet auf eine mögliche Verwandtschaftsbeziehung von Renin-bildenden Zellen mit arteriellen, mesangialen und interstitiellen sowie tubulären Zellen hin. Es wäre somit denkbar, dass diese Zellen alle von einer gemeinsamen Vorläuferzelle bzw. -zellpopulation abstammen^{67,117}.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Renin-positiven Zellen auch zugleich positiv für GFP waren (s. Abbildung 23). Vergleichbar mit der Renin, Cx40 sowie Akr1b7 mRNA Expression, stieg auch die mRNA Expression von GFP unter Nidrigsalzdiät bereits an Tag 2 signifikant

an (s. Abbildung 24A). Dies könnte entweder daran liegen, dass bei erhöhtem Bedarf an Renin weitere Zellen zur Produktion von Renin angeregt werden, oder dass bereits Renin-bildende Zellen proliferieren und es dadurch zu einer vermehrten GFP mRNA Expression kommt. Es könnte auch sein, dass beide Möglichkeiten zutreffen. Unter Hochsalzdiät konnte keine signifikante Verringerung der GFP mRNA Expression festgestellt werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass diejenigen Zellen, die einmal Renin exprimiert haben, auch weiterhin konstitutiv GFP bilden, selbst wenn dort kein Renin mehr gebildet wird. Das Ausbleiben des Rückgangs der GFP mRNA Expression unter Hochsalzdiät könnte daher als Indiz dafür gewertet werden, dass die präglomerulären GFP exprimierenden Zellen bestehen bleiben und nicht etwa durch Apoptose verschwinden, obgleich die Reninexpression und -synthese zurückgeht. Die Bestimmung der GFP mRNA Abundanz ist jedoch eher kritisch zu bewerten, da, wie bereits erwähnt, auch andere renale Strukturen wie Arterien und Arteriolen, das Sammelrohrsystem sowie mesangiale und interstitielle Zellen GFP exprimieren. Nachdem die Bestimmung der GFP mRNA Expression die ganze Niere erfasst, könnte ein Anstieg der mRNA Expression unter Niedrigsalzdiät auch auf eine erhöhte mRNA Expression in anderen renalen Strukturen zurückzuführen sein.

Die Fläche der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder änderte sich, wie auch die Renin- und Cx40-positiven präglomerulären Zellfelder, mit der Salzzufuhr. So kam es an Tag 2 der Niedrigsalzdiät zu einer signifikanten Zunahme der GFP-positiven präglomerulären Zellfelder um 37%. Im weiteren Zeitverlauf kam es zu einer maximalen Flächenzunahme um 46%. Diese Flächenänderung entspricht in etwa auch derjenigen, die bereits für Renin und Cx40 beobachtet wurde. Unter Hochsalzdiät kam es zu einer stetigen Abnahme der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder. Maximal konnte eine Flächenverkleinerung um 65% beobachtet werden. Diese Flächenänderung korreliert stark mit der Verringerung der Cx40-positiven präglomerulären Zellfelder im Zeitverlauf der Hochsalzdiät, unterscheidet sich aber von der Flächenänderung der Renin-positiven präglomerulären Zellfelder. Während es bei der Reninzellfläche unter Hochsalzdiät zu einer Verringerung um bis zu 84% kam, konnte für Cx40 und GFP maximal ein Rückgang um 55% bzw. 65% verzeichnet werden. Das bedeutet, dass die Zellflächen, die positiv für Cx40 und GFP sind, unter langandauernder Hochsalzdiät größer sind als die Reninzellfelder nach der Hochsalzdiät. Das gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass vor allem die perivaskulären Renin-bildenden Zellen die Expression und Synthese von Renin einstellen können, aber trotzdem bestehen bleiben. Dies wird vor allem in den immunhistochemischen Bildern in Abbildung 25 deutlich. Während sich die Fläche der GFP-positiven präglomerulären Zellfelder unter Niedrigsalzdiät (A) im Vergleich zur Normalsalzdiät (B) entsprechend wie die Reninzellfelder deutlich vergrößerte, wurden die GFP Felder unter Hochsalzdiät (C) zwar deutlich kleiner, gingen allerdings nicht so stark zurück wie die Reninzellfelder (F). Dies ist noch deutlicher in Abbildung 26 zu

erkennen. Nach 6-wöchiger Hochsalzdiät waren nur noch vereinzelt Renin-positive Zellen zu sehen, während die GFP-positiven Zellen immer noch wie eine Art Manschette um die afferente Arteriole herum angeordnet waren. Durch die DAPI-Färbung war die sehr hohe Dichte der Zellkerne in diesem GFP-positiven präglomerulären Bereich gut zu erkennen. Es scheint, als hätten die GFP-positiven präglomerulären Zellen die Produktion von Renin aufgrund der Hochsalzdiät und des damit einhergehenden negativen Stimulus für die Reninexpression und -synthese eingestellt.

Eine weitere Methode zur Markierung der Reninzelllinie erfolgte durch die Verwendung des mehrfarbigen stochastischen Reporters R26R-Confetti. Im Gegensatz zum mT/mG-Reporter, wo die Zellen der Reninzelllinie GFP exprimierten, konnten die Zellen dabei einen von vier Fluoreszenzmarkern exprimieren: nukleäres grün fluoreszierendes Protein (nGFP), zytosolisches rot fluoreszierendes Protein (RFP), zytosolisches gelb fluoreszierendes Protein (YFP) oder membranständiges cyan fluoreszierendes Protein (M-CFP) (s. Abbildung 9). Die Wahrscheinlichkeit für die Expression der einzelnen Fluoreszenzmarker ist dabei theoretisch gleich, wobei sich herausgestellt hat, dass nGFP sehr viel seltener auftritt^{4,212}. Dieses Modell eignet sich vor allem dafür, um Verwandtschaftsbeziehungen von Zellen und Zelltypen zu verfolgen. So wurde dieses Modell herangezogen, um auch die Verwandtschaftsbeziehung der perivaskulären Reninzellfelder in Aldosteronsynthase Knockout Mäusen zu untersuchen. Es konnte zunächst festgestellt werden, dass sich die Confetti-positiven Zellen, ähnlich wie bei der Renin- und GFP-Färbung in den Aldosteronsynthase^{-/-} x Ren1d-Cre x mT/mG Tieren, im präglomerulären Raum in einer Art Manschette in mehreren Schichten um die afferente Arteriole herum anordneten. Außerdem waren sie entlang der afferenten Arteriole selbst zu finden (s. Abbildung 27A-C). Die präglomerulären Confetti-positiven Felder waren unter Nidrigsalzdiät stets erheblich größer als die Confetti-positiven Felder unter Normalsalzdiät. Außerdem schienen die einzelnen Zellen an sich größer und dicker zu sein (A). Unter Hochsalzdiät waren nur noch wenige Confetti-positive Bereiche im präglomerulären Raum. Die Zellen schienen zudem kleiner und schmaler zu sein als die Zellen der präglomerulären Zellfelder unter Niedrig- bzw. Normalsalzdiät (C). Es waren stets alle Farben (RFP, YFP und M-CFP) innerhalb der präglomerulären Zellfelder zu finden, egal welche Salzdiät die Tiere erhalten hatten. Nukleäres GFP war hingegen nur sehr selten zu sehen. Die Tatsache, dass in den perivaskulären Confetti-positiven Feldern stets alle fluoreszierenden Proteine zu finden waren, deutet darauf hin, dass die Zellen nicht von einer einzigen gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen, sondern dass die Zellen eventuell aus verschiedenen Zellpopulationen hervorgegangen sind. Dies könnte wiederum bedeuten, dass sich unterschiedliche Zelltypen wie etwa extraglomeruläre Mesangialzellen oder interstitielle Zellen in perivaskuläre Renin-bildende Zellen umwandeln könnten. Erschwert wird die Interpretation durch den Umstand, dass in den Renin-bildenden Zellen die Cre-

Rekombinase ständig aktiv ist. Dadurch kann es in diesen Zellen immer zu einer Invertierung an den entsprechenden loxP Stellen kommen. So kann die Farbe häufig zwischen nGFP und YFP oder zwischen M-CFP und RFP wechseln. Außerdem kommt erschwerend hinzu, dass keine weitere Kofärbung, wie etwa für Renin, gemacht werden kann, da bereits 4 Fluorochrome benutzt werden. Dennoch konnte in diesem Modell eindeutig eine Vergrößerung unter Nidrigsalzdiät bzw. eine Verringerung unter Hochsalzdiät bezüglich der präglomerulären Confetti-positiven Felder beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass die Zunahme der Fläche der präglomerulären Renin-bildenden Zellen durch eine Vermehrung der Zellen durch Proliferation zustande kommt, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurden Immunfluoreszenzfärbungen für GFP und den Proliferationsmarker Ki-67 verwendet (s. Abbildung 28). Sowohl in frühen Stadien des Zeitganges der Nidrigsalzdiät, als auch zu späteren Zeitpunkten, konnten keine Ki-67 positiven Zellen innerhalb der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder beobachtet werden. Dies bestätigt den Verdacht, dass die Zunahme der GFP-Felder unter Nidrigsalzdiät nicht durch Zellteilung und eine damit einhergehende erhöhte Anzahl Renin-bildender, GFP-positiver Zellen zustande kommt. Auch die Abnahme der Zellkerndichte im Zeitverlauf der Nidrigsalzdiät deutet daraufhin, dass lediglich einzelne Zellen mehr Renin bilden und sich dadurch vergrößern (s. Abbildung 30). Es zeigte sich, dass die Kernzahl pro μm^2 GFP-positiver präglomerulärer Zellfläche unter Nidrigsalzdiät abnahm. Das deutet darauf hin, dass mit steigender Fläche GFP-positiver präglomerulärer Zellfelder die Anzahl der Zellkerne innerhalb dieses Feldes gleich bleibt. Würden durch Proliferation mehr Zellen entstehen, würde die Zellkerndichte entweder gleich bleiben oder sogar ansteigen. So weisen diese beiden Befunde eindeutig darauf hin, dass keine Zellteilung und somit kein Anstieg der Zellzahl unter Nidrigsalzdiät bzw. einer Stimulation des RAAS stattfindet.

Trotzdem wäre es denkbar, dass unter Hochsalzdiät und somit einem verminderten Bedarf an Renin die Renin-bildenden Zellen durch apoptotische Vorgänge verschwinden könnten, weshalb ein Apoptoseassay durchgeführt wurde. Dabei wurde die TUNEL-Methode verwendet. Wie auch für den Proliferationstest konnten hier, sowohl in frühen Stadien des Zeitganges der Hochsalzdiät, als auch zu späteren Zeitpunkten, keine TUNEL positiven und somit apoptotischen Zellen innerhalb der präglomerulären GFP-positiven Zellfelder beobachtet werden (s. Abbildung 29). Daher kann der durch erhöhte Salzkonzentration hervorgerufene Rückgang der GFP-positiven präglomerulären Zellfelder durch Apoptose ausgeschlossen werden. Dieser Befund wird dadurch bekräftigt, dass die Zellkerndichte innerhalb dieser präglomerulären GFP-positiven Zellfelder unter Hochsalzdiät zunahm (s. Abbildung 30). Würden Zellen durch Apoptose verschwinden, wäre die Zellkerndichte entweder gleich geblieben oder hätte abgenommen. So spricht eine Zunahme der

Zellkerndichte unter Hochsalzdiät im Vergleich zu der Zellkerndichte unter normalen Salzbedingungen dafür, dass nur die GFP-Fläche abnimmt, die Anzahl der Zellkerne innerhalb dieser Fläche allerdings gleich bleibt.

Zusammenfassend konnte also in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Aldosteronsynthese Knockout Mäusen, potenziell zur Reninproduktion befähigte Zellen, als Zellanlagen bereits vorhanden sein müssen, und dass diese Zellen wahrscheinlich zumindest teilweise dem extraglomerulären Mesangium angehören. Die Tatsache, dass in den perivaskulären Confetti-positiven Feldern stets alle fluoreszierenden Proteine zu finden waren, deutet darauf hin, dass die Zellen wahrscheinlich nicht von einer einzigen gemeinsamen Vorläuferzelle bzw. Zellpopulation abstammen, sondern dass die Zellen eventuell aus verschiedenen Zellpopulationen hervorgegangen sind. Dies könnte wiederum bedeuten, dass sich unterschiedliche Zelltypen der Niere wie extraglomeruläre Mesangialzellen oder interstitielle Zellen in perivaskuläre Renin-bildende Zellen umwandeln könnten. Eine Beteiligung von Zellproliferation oder Apoptose bei der salzbedingten Änderung der Reninexpression und -synthese konnte hingegen ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Die Aspartylprotease Renin, welche von dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt wird, ist als Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems maßgeblich an der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes und damit auch an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Unter normalen nicht-pathologischen Bedingungen sind nur wenige Renin-bildende Zellen typischerweise innerhalb der Media-Schicht der afferenten Arteriole an juxtaglomerulärer Position zu finden. Durch eine starke Stimulation des RAAS oder genetisch bedingte Defekte innerhalb der RAAS-Kaskade (z.B. bei einem Aldosteronsynthese Knockout), kann es hingegen zu einer Rekrutierung von Renin-bildenden Zellen kommen. Dies kann in Form einer Reninzellhyperplasie stattfinden. Dabei ordnen sich Renin-produzierende Zellen in mehrschichtigen Zelllagen um die präglomerulären Gefäße an. Es ist noch wenig über die Herkunft dieser zusätzlichen Renin-bildenden Zellen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Salzabhängigkeit dieser perivaskulären Renin-bildenden Zellen zu untersuchen, um einen Anhaltspunkt darüber zu erhalten, ob sie bei erhöhtem Bedarf an Renin (Niedrigsalzdiät) durch Proliferation bereits bestehender Renin-bildender Zellen neu entstehen oder ob sie durch Transformation aus anderen renalen Zelltypen hervorgehen können. Außerdem sollte geklärt werden, ob, bei vermindertem Bedarf an Renin (Hochsalzdiät), die perivaskulären Renin-bildenden Zellen durch Apoptose verschwinden, oder lediglich die Produktion von Renin einstellen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass potenziell zur Reninproduktion befähigte Zellen in Aldosteronsynthese Knockout Mäusen als Zellanlagen bereits vorhanden sein müssen. Dies zeigte sich zum einen an der Tatsache, dass die Änderung der Renin mRNA Abundanz, der Plasma-Renin-Konzentration sowie der Fläche präglomerulärer Renin-bildender Zellen und der Quantität des Reninproteins, in sehr kurzer Zeit nach Änderung der Salzzufuhr stattfand. Zum anderen wurden auch mit Renin koregulierte Gene, wie Connexin 40, Aldose-Ketose-Reduktase 1b7 oder Cyclooxygenase-2 in vergleichbarem Maße mit dem Renin in Abhängigkeit von der Salzdiät koreguliert. Auch die Tatsache, dass die Renin mRNA Abundanz und die Reninsekretion auch nach längerer Zeit der salzbedingten Suppression wieder auf gleiche Weise reinduziert werden konnten, trägt zu der Annahme bei, dass die erhöhte Reninexpression und –synthese auf entsprechende bereits vorhandene Zellanlagen zurückzuführen ist. Dies wurde vor allem an der Methode der isoliert-perfundierten Niere deutlich, bei der die Reninsekretionsrate eines 14 und 28 Tage lang mit Hochsalzdiät supprimierten Tieres nach darauffolgender starker Stimulation des RAAS innerhalb von wenigen Minuten die gleiche Reninsekretionsrate erreichte, wie bei einem Tier, das eine Normalsalzdiät erhalten hatte. Dies deutet stark auf ein Vorhandensein

entsprechender Zellen hin, die zur Expression und Synthese von Renin fähig sind, und weniger auf Zellproliferation, da proliferierende Prozesse mehr Zeit in Anspruch nehmen würden. Außerdem konnte mit Hilfe eines Proliferationsassays gezeigt werden, dass innerhalb der Zellen, die der Reninzelllinie angehörten, unter Nidrigsalzdiät keine Proliferation stattfand. Dass diese Zellen unter Hochsalzdiät auch weiterhin erhalten blieben, konnte durch einen Apoptoseassay gezeigt werden. Dabei konnten in den Feldern der Reninzelllinie unter Hochsalzdiät keine apoptotischen Zellen gefunden werden. Auch die Tatsache, dass die Zellkerndichte unter Nidrigsalzdiät im Zeitverlauf abnahm und unter Hochsalzdiät zunahm, deutet darauf hin, dass sich die Anzahl der Kerne pro präglomerulärem Feld nicht veränderte, sondern, dass lediglich dessen Fläche zu- bzw. abnahm. Dieses Ergebnis wird bestärkt durch die immunhistochemische Färbung eines 6 Wochen lang mit Hochsalzdiät gefütterten Tieres, bei dem die GFP-positiven Felder der Reninzelllinie dicht gepackt waren mit DAPI-positiven Zellkernen. Aus dieser Abbildung ging außerdem deutlich hervor, dass nur noch vereinzelt Renin-positive Zellen im präglomerulären Bereich vorhanden waren, aber noch sehr viele Zellen, die GFP-positiv waren. Das bedeutet, dass diese GFP-positiven Zellen wahrscheinlich einmal Renin produziert haben, durch den verminderten Bedarf an Renin (Hochsalzdiät) die Reninproduktion allerdings eingestellt haben, und anschließend als eine Art „Reservezellen“ bestehen blieben. Interessanterweise ergab sich ein sehr ähnliches Bild für die immunhistochemische Färbung von Connexin 40, bei der ebenfalls nach 6-wöchiger Hochsalzdiät kaum noch Renin-positive Zellen aber noch viele Cx40-positive Zellen im präglomerulären Raum zu finden waren. Dies konnte auch durch die Bestimmung der Flächen der Renin- bzw. Cx40-positiven präglomerulären Zellfelder gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass nach lang andauernder Hochsalzdiät noch deutlich größere Cx40-positive Zellfelder im präglomerulären Raum vorhanden waren, verglichen mit den Renin-positiven Feldern. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Zellen, die in der Aldosteronsynthese-defizienten Maus dazu fähig sind, bei Bedarf Renin zu produzieren, Zellen des extraglomerulären Mesangiums sein könnten. Die Tatsache, dass in den perivaskulären Confetti-positiven Feldern stets alle fluoreszierenden Proteine zu finden waren, deutet darauf hin, dass die Zellen wahrscheinlich nicht von einer einzigen gemeinsamen Vorläuferzelle bzw. Zellpopulation abstammen, sondern dass die Zellen eventuell aus verschiedenen Zellpopulationen hervorgegangen sind. Dies könnte wiederum bedeuten, dass sich unterschiedliche Zelltypen der Niere wie etwa extraglomeruläre Mesangialzellen oder interstitielle Zellen in perivaskuläre Renin-bildende Zellen umwandeln könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Karger, C. (2014).
2. Lopez, M.L.S.S. & Gomez, R.A. Development of the renal arterioles. *Journal of the American Society of Nephrology* **22**, 2156-2165 (2011).
3. Montminy, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annual review of biochemistry* **66**, 807-822 (1997).
4. Livet, J., *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**, 56-62 (2007).
5. Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O. & Kurtz, A. Renin release. *Physiology* **22**, 310-319 (2007).
6. Desch, M. (2010).
7. Brunskill, E.W., *et al.* Genes that confer the identity of the renin cell. *Journal of the American Society of Nephrology* **22**, 2213-2225 (2011).
8. Paul, M., Mehr, A.P. & Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews* **86**, 747-803 (2006).
9. Hall, J.E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Molecular biotechnology* **24**, 27-39 (2003).
10. Persson, P., Skalweit, A. & Thiele, B. Controlling the release and production of renin. *Acta physiologica scandinavica* **181**, 375-381 (2004).
11. Sealey, J., White, R., Laragh, J. & Rubin, A. Plasma prorenin and renin in anephric patients. *Circulation research* **41**, 17-21 (1977).
12. Deschepper, C.F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney international* **46**, 1561-1563 (1994).
13. Kurtz, A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annual Review of Physiology* **73**, 377-399 (2011).
14. Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol rev* **70**, 1067-1116 (1990).
15. Corvol, P., Michaud, A., Soubrier, F. & Williams, T.A. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *Journal of Hypertension* **13**, S3-S10 (1995).
16. VANE, K.N.J. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature* **216**, 762-766 (1967).
17. Soubrier, F., *et al.* Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme. in *Molecular Reviews in Cardiovascular Medicine* 117-127 (Springer, 1996).

18. Soubrier, F., *et al.* Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *Journal of hypertension* **11**, 599-604 (1993).
19. Hollenberg, N. & Williams, G. Angiotensin as a renal, adrenal, and cardiovascular hormone: responses to saralasin in normal man and in essential and secondary hypertension. *Kidney international. Supplement*, S29-35 (1979).
20. Quinn, S.J. & Williams, G.H. Regulation of aldosterone secretion. *Annual Review of Physiology* **50**, 409-426 (1988).
21. Kurtz, A. & Penner, R. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 3423-3427 (1989).
22. Persson, P.B. Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of physiology* **552**, 667-671 (2003).
23. Mercure, C., *et al.* Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS letters* **422**, 395-399 (1998).
24. Kurtz, A. *Cellular control of renin secretion*, (Springer, 1989).
25. Peters, J. & Clausmeyer, S. Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34**, 1561-1568 (2002).
26. Dzau, V. & Re, R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* **89**, 493-498 (1994).
27. Lindpaintner, K. & Ganten, D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* **68**, 905-921 (1991).
28. Paul, M., Bachmann, J. & Ganten, D. The tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* **2**, 94-99 (1992).
29. Castrop, H., *et al.* Physiology of kidney renin. *Physiological Reviews* **90**, 607-673 (2010).
30. Abel, K.J. & Gross, K.W. Close physical linkage of the murine Ren-1 and Ren-2 loci. *Nucleic acids research* **16**, 2111-2126 (1988).
31. Field, L.J. & Gross, K.W. Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6196-6200 (1985).
32. Dickinson, D.P., Gross, K.W., Piccini, N. & Wilson, C.M. Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* **108**, 651-667 (1984).
33. Holm, I., Ollo, R., Panthier, J.J. & Rougeon, F. Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *The EMBO journal* **3**, 557-562 (1984).

34. Morris, B.J. Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* **10**, 209-214 (1992).
35. Mullins, L.J., *et al.* Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *The Journal of biological chemistry* **275**, 40378-40384 (2000).
36. Xu, D., *et al.* Preservation of intracellular renin expression is insufficient to compensate for genetic loss of secreted renin. *Hypertension* **54**, 1240-1247 (2009).
37. Bing, J. & Poulsen, K. Differences in renal and submaxillary renin release after stimulation with isoprenaline and noradrenaline. *Acta physiologica Scandinavica* **105**, 58-63 (1979).
38. Meneton, P., Ichikawa, I., Inagami, T. & Schnermann, J. Renal physiology of the mouse. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **278**, F339-F351 (2000).
39. Hansen, P., *et al.* Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta physiologica scandinavica* **181**, 431-437 (2004).
40. Pratt, R.E., Carleton, J.E., Richie, J.P., Heusser, C. & Dzau, V.J. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 7837-7840 (1987).
41. Neves, F.A., Duncan, K.G. & Baxter, J.D. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* **27**, 514-517 (1996).
42. Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N.G. & Reudelhuber, T.L. Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* **28**, 840-846 (1996).
43. Alund, M. Juxtaglomerular cell activity during hemorrhage and ischemia as revealed by quinacrine histofluorescence. *Acta Physiol Scand* **110**, 113-121 (1980).
44. Kim, S.M., *et al.* Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* **50**, 103-109 (2007).
45. Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* **86**, 747-803 (2006).
46. Ganong, W.F. The brain renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* **46**, 17-31 (1984).
47. Latta, H. Ultrastructure of the glomerulus and juxtaglomerular apparatus. *Handbook of Physiology* **1**, 1-29 (1973).
48. Taugner, C., Poulsen, K., Hackenthal, E. & Taugner, R. Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry* **62**, 19-27 (1979).
49. Taugner, R. & Hackenthal, E. Morphology of the Juxtaglomerular Apparatus. *The Juxtaglomerular Apparatus: Structure and Function*, 5-41 (1989).

50. Friis, U.G., Jensen, B.L., Aas, J.K. & Skott, O. Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res* **84**, 929-936 (1999).
51. Hunt, M.K., *et al.* Colocalization and release of angiotensin and renin in renal cortical cells. *The American journal of physiology* **263**, F363-373 (1992).
52. Barajas, L. & Muller, J. The innervation of the juxtaglomerular apparatus and surrounding tubules: a quantitative analysis by serial section electron microscopy. *Journal of ultrastructure research* **43**, 107-132 (1973).
53. Barajas, L. The ultrastructure of the juxtaglomerular apparatus as disclosed by three-dimensional reconstructions from serial sections. The anatomical relationship between the tubular and vascular components. *Journal of ultrastructure research* **33**, 116-147 (1970).
54. Mink, D., Schiller, A., Kriz, W. & Taugner, R. Interendothelial junctions in kidney vessels. *Cell Tissue Res* **236**, 567-576 (1984).
55. Taugner, R., Kirchheim, H. & Forssmann, W.G. Myoendothelial contacts in glomerular arterioles and in renal interlobular arteries of rat, mouse and *Tupaia belangeri*. *Cell Tissue Res* **235**, 319-325 (1984).
56. Taugner, R., Schiller, A., Kaissling, B. & Kriz, W. Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft. *Cell Tissue Res* **186**, 279-285 (1978).
57. Haefliger, J.A., Nicod, P. & Meda, P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovascular research* **62**, 345-356 (2004).
58. Arensbak, B., Mikkelsen, H.B., Gustafsson, F., Christensen, T. & Holstein-Rathlou, N.H. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochemistry and cell biology* **115**, 479-487 (2001).
59. Gomez, R.A., *et al.* Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *The American journal of physiology* **259**, F660-665 (1990).
60. Cantin, M., Araujo-Nascimento, M.D., Benchimol, S. & Desormeaux, Y. Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *The American journal of pathology* **87**, 581-602 (1977).
61. Taugner, R., Hackenthal, E., Nobiling, R., Harlacher, M. & Reb, G. The distribution of renin in the different segments of the renal arterial tree: immunocytochemical investigation in the mouse kidney. *Histochemistry* **73**, 75-88 (1981).
62. Barajas, L. & Latta, H. A three-dimensional study of the juxtaglomerular apparatus in the rat. Light and electron microscopic observations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **12**, 257-269 (1963).

63. Dunihue, F.W. & Boldosser, W.G. OBSERVATIONS ON THE SIMILARITY OF MESANGIAL TO JUXTAGLOMERULAR CELLS. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **12**, 1228-1240 (1963).
64. Christensen, J.A., Bohle, A., Mikeler, E. & Taugner, R. Renin-positive granulated Goormaghtigh cells. Immunohistochemical and electron-microscopic studies on biopsies from patients with pseudo-Bartter syndrome. *Cell Tissue Res* **255**, 149-153 (1989).
65. Berg, A.C., Chernavsky-Sequeira, C., Lindsey, J., Gomez, R.A. & Sequeira-Lopez, M.L. Pericytes synthesize renin. *World journal of nephrology* **2**, 11-16 (2013).
66. Prieto-Carrasquero, M.C., Botros, F.T., Kobori, H. & Navar, L.G. Collecting Duct Renin: A major player in Angiotensin II-dependent Hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* **3**, 96-104 (2009).
67. Sequeira Lopez, M.L., Pentz, E.S., Nomasa, T., Smithies, O. & Gomez, R.A. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Developmental cell* **6**, 719-728 (2004).
68. Boivin, V., et al. Immunofluorescent imaging of α -1- and α -2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney international* **59**, 515-531 (2001).
69. Holmer, S.R., et al. Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *Journal of hypertension* **15**, 1471-1479 (1997).
70. Kurtz, A. Membrane and secretory properties of renal juxtaglomerular granular cells. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* **24**, 536-540 (1997).
71. Castrop, H., et al. Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *American journal of physiology. Renal physiology* **286**, F848-857 (2004).
72. Keeton, T.K. & Campbell, W.B. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacological Reviews* **32**, 81-227 (1980).
73. Golin, R., Pieruzzi, F., Munforti, C., Di Blasio, A. & Zanchetti, A. Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *Journal of hypertension* **19**, 1271-1277 (2001).
74. Holmer, S., et al. Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **266**, F738-F745 (1994).
75. Hesse, I. & Johns, E.J. The role of α -adrenoceptors in the regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion in the rabbit. *British journal of pharmacology* **84**, 715-724 (1985).
76. Kim, S.M., et al. Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in β 1- and β 2-adrenergic receptors. *Hypertension* **50**, 103-109 (2007).

77. Harrison-Bernard, L.M., Navar, L.G., Ho, M.M., Vinson, G.P. & el-Dahr, S.S. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *The American journal of physiology* **273**, F170-177 (1997).
78. Kimura, K., *et al.* Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int Suppl* **63**, S201-204 (1997).
79. Crowley, S.D., *et al.* Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1092-1099 (2005).
80. Odermatt, A., Arnold, P. & Frey, F.J. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28484-28492 (2001).
81. Rogerson, F.M. & Fuller, P.J. Mineralocorticoid action. *Steroids* **65**, 61-73 (2000).
82. Bhargava, A., *et al.* The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* **142**, 1587-1594 (2001).
83. Stockand, J.D. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *American journal of physiology. Renal physiology* **282**, F559-576 (2002).
84. Naray-Fejes-Toth, A., Helms, M.N., Stokes, J.B. & Fejes-Toth, G. Regulation of sodium transport in mammalian collecting duct cells by aldosterone-induced kinase, SGK1: structure/function studies. *Molecular and cellular endocrinology* **217**, 197-202 (2004).
85. Snyder, P.M., Olson, D.R. & Thomas, B.C. Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *The Journal of biological chemistry* **277**, 5-8 (2002).
86. Berger, S., Bleich, M., Schmid, W., Greger, R. & Schutz, G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na⁺ metabolism. *Kidney Int* **57**, 1295-1298 (2000).
87. Makhanova, N., *et al.* Kidney function in mice lacking aldosterone. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **290**, F61-F69 (2006).
88. Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A. & Schweda, F. The Calcium Paradoxon of Renin Release Calcium Suppresses Renin Exocytosis by Inhibition of Calcium-Dependent Adenylate Cyclases AC5 and AC6. *Circulation research* **99**, 1197-1206 (2006).
89. Ortiz-Capisano, M.C., Ortiz, P.A., Harding, P., Garvin, J.L. & Beierwaltes, W.H. Adenyl cyclase isoform v mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension* **49**, 618-624 (2007).

90. Chen, L., *et al.* Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein G α in juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**, F27-37 (2007).
91. Kurtz, A., Della Bruna, R., Pratz, J. & Caverio, I. Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *Journal of cardiovascular pharmacology* **12**, 658-663 (1988).
92. Kurtz, A., *et al.* Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *Journal of Clinical Investigation* **82**, 538 (1988).
93. Hautmann, M., *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 1150-1156 (2007).
94. Jensen, B.L., Kramer, B.K. & Kurtz, A. Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* **29**, 1148-1155 (1997).
95. Jensen, B.L., Schmid, C. & Kurtz, A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *The American journal of physiology* **271**, F659-669 (1996).
96. Friis, U.G., *et al.* Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res* **90**, 996-1003 (2002).
97. Klar, J., Sandner, P., Muller, M.W. & Kurtz, A. Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **444**, 335-344 (2002).
98. Ortiz-Capisano, M.C., Liao, T.D., Ortiz, P.A. & Beierwaltes, W.H. Calcium-dependent phosphodiesterase 1C inhibits renin release from isolated juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **297**, R1469-1476 (2009).
99. Beavo, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725-748 (1995).
100. Kurtz, A., Gotz, K.H., Hamann, M. & Wagner, C. Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4743-4747 (1998).
101. Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Taugner, R. & Bauer, C. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4769-4773 (1986).
102. Kageyama, S. & Brown, J. Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 37-42 (1990).

103. Obana, K., *et al.* Synthetic rat atrial natriuretic factor inhibits in vitro and in vivo renin secretion in rats. *Endocrinology* **117**, 1282-1284 (1985).
104. Kurtz, A. & Wagner, C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *The American journal of physiology* **275**, F849-862 (1998).
105. Eshima, K., *et al.* Angiotensin in the nucleus tractus solitarii contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* **36**, 259-263 (2000).
106. Schelling, P., Fischer, H. & Ganten, D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* **9**, 3-15 (1991).
107. Cohen, Y., Rahamimov, R., Naveh-Many, T., Silver, J. & Rahamimoff, R. Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells? *The American journal of physiology* **273**, E631-637 (1997).
108. Ichihara, A., *et al.* Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *European Journal of Endocrinology* **133**, 569-577 (1995).
109. Takagi, M., Matsuoka, H., Atarashi, K. & Yagi, S. Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochemical and biophysical research communications* **157**, 1164-1168 (1988).
110. DONGEN, R. & Peart, W. Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *British journal of pharmacology* **50**, 125-129 (1974).
111. Scholz, H., Hamann, M., Götz, K.-H. & Kurtz, A. Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Archiv* **428**, 173-178 (1994).
112. Baumbach, L., Leyssac, P. & Skinner, S. Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid. *The Journal of physiology* **258**, 243-256 (1976).
113. Schricker, K. & Kurtz, A. Role of membrane-permeable ions in renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **38**, F64 (1995).
114. Madsen, K., *et al.* Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney international* **77**, 110-117 (2009).
115. Hano, T., *et al.* Contribution of calmodulin and protein kinase C to renin release in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* **3**, 206S-209S (1990).
116. Taugner, R., *et al.* Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell and tissue research* **252**, 687-690 (1988).

117. Sequeira Lopez, M.L., Pentz, E.S., Robert, B., Abrahamson, D.R. & Gomez, R.A. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**, F345-356 (2001).
118. Sauter, A., Machura, K., Neubauer, B., Kurtz, A. & Wagner, C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney international* **73**, 43-51 (2007).
119. Gomez, R.A. Role of angiotensin in renal vascular development. *Kidney international* **54**, S12-S16 (1998).
120. Guron, G. & Friberg, P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* **18**, 123-137 (2000).
121. Gómez, R.A., Lopez, M.L.S.S., Jin, X., Cordaillat, M. & Pentz, E.S. Renin Cell Identity and Homeostasis. in *The Local Cardiac Renin-Angiotensin Aldosterone System* 101-106 (Springer, 2009).
122. Humphreys, B.D., *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* **176**, 85-97 (2010).
123. Pentz, E.S., Lopez, M.L.S.S., Cordaillat, M. & Gomez, R.A. Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **294**, H699-H707 (2008).
124. Wagner, C. & Kurtz, A. Regulation of renal renin release. *Current opinion in nephrology and hypertension* **7**, 437-441 (1998).
125. Davis, J. & Freeman, R. Mechanisms regulating renin release. *Physiological Reviews* **56**, 1-56 (1976).
126. Ryan, M.J., Gross, K.W. & Hajduczuk, G. Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **279**, E823-829 (2000).
127. Ichihara, A., Imig, J.D. & Navar, L.G. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension* **34**, 843-847 (1999).
128. Bührle, C.P., *et al.* The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *Journal of cardiovascular pharmacology* **6**, S383-S393 (1984).
129. Taugner, R., Kirchheim, H. & Forssmann, W. Myoendothelial contacts in glomerular arterioles and in renal interlobular arteries of rat, mouse and *Tupaia belangeri*. *Cell and tissue research* **235**, 319-325 (1984).
130. Taugner, R., Bührle, C.P. & Nobiling, R. Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell and tissue research* **237**, 459-472 (1984).

131. Söhl, G. & Willecke, K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* **62**, 228-232 (2004).
132. Seul, K.H. & Beyer, E.C. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvascular research* **59**, 140-148 (2000).
133. Arensbak, B., Mikkelsen, H.B., Gustafsson, F., Christensen, T. & Holstein-Rathlou, N.-H. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochemistry and cell biology* **115**, 479-487 (2001).
134. Zhang, J. & Hill, C.E. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney international* **68**, 1171-1185 (2005).
135. Kurtz, L., Janssen-Bienhold, U., Kurtz, A. & Wagner, C. Connexin expression in renin-producing cells. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 506-512 (2009).
136. Wagner, C., *et al.* Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circulation research* **100**, 556-563 (2007).
137. Kurtz, L., *et al.* Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *Journal of the American Society of Nephrology* **18**, 1103-1111 (2007).
138. de Wit, C., Roos, F., Bolz, S.-S. & Pohl, U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiological genomics* **13**, 169-177 (2003).
139. Krattinger, N., *et al.* Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney international* **72**, 814-822 (2007).
140. Scholz, H., Hamann, M., Gotz, K.H. & Kurtz, A. Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **428**, 173-178 (1994).
141. Schweda, F., Riegger, G.A., Kurtz, A. & Krämer, B.K. Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **279**, F170-F176 (2000).
142. Li, A., *et al.* Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry* **28**, 1135-1144 (2011).
143. Yao, J., *et al.* ATP-dependent mechanism for coordination of intercellular Ca²⁺ signaling and renin secretion in rat juxtaglomerular cells. *Circulation research* **93**, 338-345 (2003).
144. Fray, J. & Park, C. Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. *The Journal of physiology* **375**, 361-375 (1986).

145. Wagner, C. & Kurtz, A. Distribution and functional relevance of connexins in renin-producing cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **465**, 71-77 (2013).
146. Peti-Peterdi, J. Calcium wave of tubuloglomerular feedback. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **291**, F473-F480 (2006).
147. Toma, I., *et al.* Connexin 40 and ATP-dependent intercellular calcium wave in renal glomerular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**, R1769-R1776 (2008).
148. Sorensen, C.M. & HOLSTEIN-RATHLOU, N.H. Cell-cell communication in the kidney microcirculation. *Microcirculation* **19**, 451-460 (2012).
149. Liu, F., Arce, F.T., Ramachandran, S. & Lal, R. Nanomechanics of Hemichannel Conformations CONNEXIN FLEXIBILITY UNDERLYING CHANNEL OPENING AND CLOSING. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 23207-23217 (2006).
150. De Vriese, A.S., Van De Voorde, J. & Lameire, N.H. Effects of connexin-mimetic peptides on nitric oxide synthase-and cyclooxygenase-independent renal vasodilation. *Kidney international* **61**, 177-185 (2002).
151. Takenaka, T., *et al.* Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney international* **73**, 415-422 (2008).
152. Machura, K., Iankilevitch, E., Neubauer, B., Theuring, F. & Kurtz, A. The aldo-keto reductase AKR1B7 coexpresses with renin without influencing renin production and secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **304**, F578-F584 (2013).
153. Gomez, R.A., Belyea, B., Medrano, S., Pentz, E.S. & Sequeira-Lopez, M.L.S. Fate and plasticity of renin precursors in development and disease. *Pediatric Nephrology* **29**, 721-726 (2014).
154. Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A., Veysiere, G. & Jean, C. Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *Journal of endocrinology* **160**, 147-154 (1999).
155. Chen, L., *et al.* Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is Gs α -dependent. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 986-992 (2010).
156. Neubauer, B., *et al.* Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **296**, F1006-F1012 (2009).
157. Barski, O.A., Tipparaju, S.M. & Bhatnagar, A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews* **40**, 553-624 (2008).
158. Lambert-Langlais, S., *et al.* Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F $_{2\alpha}$ are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS one* **4**, e7309 (2009).

159. Traynor, T.R., Smart, A., Briggs, J.P. & Schnermann, J. Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F706-F710 (1999).
160. Duggan, K., Mendelsohn, F. & Levens, N. Angiotensin receptors and angiotensin I-converting enzyme in rat intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **257**, G504-G510 (1989).
161. Skinner, S., Lumbers, E.R. & Symonds, E. Renin concentration in human fetal and maternal tissues. *Am J Obstet Gynecol* **101**, 529-533 (1968).
162. Gross, V., Milia, A.F., Plehm, R., Inagami, T. & Luft, F.C. Long-term blood pressure telemetry in AT2 receptor-disrupted mice. *Journal of hypertension* **18**, 955-961 (2000).
163. Levens, N.R., Peach, M.J. & Carey, R.M. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. *Circulation Research* **48**, 157-167 (1981).
164. Hackenthal, E., Hackenthal, R. & Hilgenfeldt, U. Isorenin, pseudorenin, cathepsin D and renin. A comparative enzymatic study of angiotensin-forming enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **522**, 574-588 (1978).
165. Winnicka, M., Braszko, J. & Wiśniewski, K. Dopaminergic projection to the septum mediates facilitatory effect of angiotensins on recognition memory in rats. *Pharmacological research* **36**, 387-394 (1997).
166. Vio, C.P., An, S.-J., Cespedes, C., McGiff, J.C. & Ferreri, N.R. Induction of cyclooxygenase-2 in thick ascending limb cells by adrenalectomy. *Journal of the American Society of Nephrology* **12**, 649-658 (2001).
167. Harding, P., Carretero, O.A. & Beierwaltes, W.H. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition blunts low sodium-stimulated renin without changing renal haemodynamics. *Journal of hypertension* **18**, 1107-1113 (2000).
168. Wang, J.-L., Cheng, H.-F. & Harris, R.C. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension* **34**, 96-101 (1999).
169. Stichtenoth, D.O., Wagner, B. & Frölich, J. Effect of selective inhibition of the inducible cyclooxygenase on renin release in healthy volunteers. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* **46**, 290-296 (1998).
170. Kammerl, M.C., *et al.* Low sodium and furosemide-induced stimulation of the renin system in man is mediated by cyclooxygenase 2. *Clinical pharmacology and therapeutics* **70**, 468-474 (2001).
171. Schnermann, J. Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrology Dialysis Transplantation* **16**, 1735-1738 (2001).

172. Yang, T., *et al.* Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **279**, F819-F825 (2000).
173. Fernandez, L., *et al.* Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertility and sterility* **44**, 219-223 (1985).
174. Parmentier, M., Inagami, T., Pochet, R. & Desclin, J. Pituitary-Dependent Renin-Like Immunoreactivity in the Rat Testis*. *Endocrinology* **112**, 1318-1323 (1983).
175. Andersen, J.L., Andersen, L.J., Sandgaard, N.C. & Bie, P. Volume expansion natriuresis during servo control of systemic blood pressure in conscious dogs. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **278**, R19-27 (2000).
176. Andersen, L.J., Andersen, J.L., Pump, B. & Bie, P. Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **282**, R1754-1761 (2002).
177. Andersen, L.J., Jensen, T.U., Bestle, M.H. & Bie, P. Isotonic and hypertonic sodium loading in supine humans. *Acta Physiol Scand* **166**, 23-30 (1999).
178. Andersen, L.J., *et al.* Osmoregulatory control of renal sodium excretion after sodium loading in humans. *The American journal of physiology* **275**, R1833-1842 (1998).
179. Holmer, S., *et al.* Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **425**, 62-67 (1993).
180. Sandgaard, N.C., Andersen, J.L. & Bie, P. Hormonal regulation of renal sodium and water excretion during normotensive sodium loading in conscious dogs. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **278**, R11-18 (2000).
181. Bie, P., Molstrom, S. & Wamberg, S. Normotensive sodium loading in conscious dogs: regulation of renin secretion during beta-receptor blockade. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**, R428-435 (2009).
182. Kompanowska-Jezierska, E., *et al.* Renal nerves and nNOS: roles in natriuresis of acute isovolumetric sodium loading in conscious rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**, R1130-1139 (2008).
183. Molstrom, S., Larsen, N.H., Simonsen, J.A., Washington, R. & Bie, P. Normotensive sodium loading in normal man: regulation of renin secretion during beta-receptor blockade. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**, R436-445 (2009).

184. Rasmussen, M.S., Simonsen, J.A., Sandgaard, N.C., Hoilund-Carlsen, P.F. & Bie, P. Mechanisms of acute natriuresis in normal humans on low sodium diet. *The Journal of physiology* **546**, 591-603 (2003).
185. Gill, J.R., Jr. & Bartter, F.C. Evidence for a prostaglandin-independent defect in chloride reabsorption in the loop of Henle as a proximal cause of Bartter's syndrome. *The American journal of medicine* **65**, 766-772 (1978).
186. Bartter, F.C., Pronove, P., Gill, J.R., Jr. & MacCardle, R.C. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. 1962. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **9**, 516-528 (1998).
187. Riemenschneider, T. & Bohle, A. Morphologic aspects of low-potassium and low-sodium nephropathy. *Clinical nephrology* **19**, 271-279 (1983).
188. Kim, H.-S., *et al.* Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 2735-2739 (1995).
189. Niimura, F., *et al.* Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 2947 (1995).
190. Nagata, M., *et al.* Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **75**, 745-753 (1996).
191. Kihara, M., *et al.* Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice. *Kidney Int* **53**, 548-555 (1998).
192. Kregel, J.H., *et al.* Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* **375**, 146-148 (1995).
193. Esther, C.R., Jr., *et al.* Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **74**, 953-965 (1996).
194. Hilgers, K.F., Reddi, V., Kregel, J.H., Smithies, O. & Gomez, R.A. Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* **29**, 216-221 (1997).
195. Inokuchi, S., *et al.* Hyperplastic vascular smooth muscle cells of the intrarenal arteries in angiotensin II type 1a receptor null mutant mice. *Kidney Int* **60**, 722-731 (2001).
196. Lee, G., *et al.* Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology* **146**, 2650-2656 (2005).
197. White, P.C., Curnow, K.M. & Pascoe, L. Disorders of Steroid 11 β -Hydroxylase Isozymes*. *Endocrine reviews* **15**, 421-438 (1994).

198. Wasniewska, M., De Luca, F., Valenzise, M. & Lombardo, F. Aldosterone synthase deficiency type I with no documented homozygous mutations in the CYP11B2 gene. *European journal of endocrinology* **144**, 59-62 (2001).
199. White, P.C. Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Molecular and cellular endocrinology* **217**, 81-87 (2004).
200. Peter, M., Dubuis, J. & Sippell, W. Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11beta-hydroxylase deficiencies. *Hormone research* **51**, 211-222 (1998).
201. Castellanos Rivera, R.M., *et al.* Transcriptional regulator RBP-J regulates the number and plasticity of renin cells. *Physiological genomics* **43**, 1021-1028 (2011).
202. Medrano, S., Monteagudo, M.C., Sequeira-Lopez, M.L., Pentz, E.S. & Gomez, R.A. Two microRNAs, miR-330 and miR-125b-5p, mark the juxtaglomerular cell and balance its smooth muscle phenotype. *American journal of physiology. Renal physiology* **302**, F29-37 (2012).
203. Desch, M., *et al.* Increased renin production in mice with deletion of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in juxtaglomerular cells. *Hypertension* **55**, 660-666 (2010).
204. Glenn, S.T., Jones, C.A., Pan, L. & Gross, K.W. In vivo analysis of key elements within the renin regulatory region. *Physiological genomics* **35**, 243-253 (2008).
205. Itani, H., *et al.* Regulation of renin gene expression by oxidative stress. *Hypertension* **53**, 1070-1076 (2009).
206. Lopez, M.L. & Gomez, R.A. The renin phenotype: roles and regulation in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **19**, 366-371 (2010).
207. Peti-Peterdi, J., Fintha, A., Fuson, A.L., Tousson, A. & Chow, R.H. Real-time imaging of renin release in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **287**, F329-F335 (2004).
208. Steppan, D., Zügner, A., Rachel, R. & Kurtz, A. Structural analysis suggests that renin is released by compound exocytosis. *Kidney international* **83**, 233-241 (2013).
209. Friis, U.G., *et al.* Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **465**, 25-37 (2013).
210. Makhanova, N., Sequeira-Lopez, M.L., Gomez, R.A., Kim, H.-S. & Smithies, O. Disturbed homeostasis in sodium-restricted mice heterozygous and homozygous for aldosterone synthase gene disruption. *Hypertension* **48**, 1151-1159 (2006).
211. Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **45**, 593-605 (2007).
212. Snippert, H.J., *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143**, 134-144 (2010).

213. Tao, J., Polumbo, C., Reidy, K., Sweetwyne, M. & Susztak, K. A multicolor podocyte reporter highlights heterogeneous podocyte changes in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney international* (2013).
214. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159 (1987).
215. Harris, R.C. Cyclooxygenase-2 in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 2387-2394 (2000).
216. Campbell, D.J. Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonists. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **23 Suppl 3**, S125-131 (1996).
217. Schweda, F. & Kurtz, A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* **181**, 383-390 (2004).
218. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* **182**, 311-322 (2000).
219. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* **119**, 493-501 (1992).
220. Bartter, F.C., Pronove, P., Gill, J.R. & MacCardle, R.C. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. *The American journal of medicine* **33**, 811-828 (1962).
221. Bohle, A. *Die Niere: Struktur und Funktion*, (Schattauer, 1984).
222. Barajas, L., Wang, P., Bennett, C. & Wilburn, R. The renal sympathetic system and juxtaglomerular cells in experimental renovascular hypertension. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **35**, 574-587 (1976).
223. Hanner, F., Sorensen, C.M., Holstein-Rathlou, N.-H. & Peti-Peterdi, J. Connexins and the kidney. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **298**, R1143-R1155 (2010).
224. Bosco, D., Haefliger, J.-A. & Meda, P. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiological reviews* **91**, 1393-1445 (2011).

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Glattmuskelaktin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin I-Converting-Enzyme
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AKR	Mitglieder der Aldose-Ketose-Reduktase Familie
AKR1B7	Aldose-Ketose-Reduktase 1B7
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT ₁ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
ATF	activating transcription factor
BCA	Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
M-CFP	membranständiges zyan fluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
Cx40	Connexin 40
cyp11b2	Aldosteronsynthasegen
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCV	dense core vesicle
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	endothelialer Natrium-Kanal

EP ₂ , EP ₄	Prostanoidrezeptoren
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HCl	Salzsäure
HS	Pferdeserum
IP	Prostanoidrezeptor
IPN	isoliert-perfundierte Niere
JG	juxtaglomerulär
K ⁺	Kalium
kDA	kilo-Dalton
Ki-67	Marker für proliferierende Zellen (vorhanden in G ₁ -, G ₂ -, S- und M-Phase des Zellzyklus)
MD	Macula Densa
MHC	myosin heavy chain
mM	millimolar (mmol/l)
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NCC	Natrium-Chlorid-Kotransporter
ng	Nanogramm
NKCC2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NP	natriuretische Peptide
NS-398	pharmakologischer Hemmstoff der Cyclooxygenase-2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pCREB	phosphorylated cAMP response element-binding protein
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd

pGC	particulate guanylyl cyclase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PRC	Plasma-Renin-Konzentration
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFP	rot-fluoreszierendes Protein
RIA	Radioimmunoassay
ROMK	renal outer medullary potassium channel
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
SC-58236	pharmakologischer Hemmstoff der Cyclooxygenase-2
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
sGC	soluble guanylyl cyclase
SGK1	serum and glucocorticoid inducible kinase 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TALH	dicker aufsteigender Ast der Henleschleife
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiozyanat
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UTR	untranslated region
ÜN	über Nacht
V	Volt
Verd.	Verdünnung
VSMC	vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp

7.2 Kongressbeiträge

91st Annual Meeting of the German Physiological Society, 22. - 25.03.2012, Dresden, Deutschland – Poster

„Enhanced renin cell recruitment in mice deficient for the cGMP-dependent protein kinase II“

92nd Annual Meeting of the German Physiological Society, 02. - 05.03.2013, Heidelberg, Deutschland – Poster

„Renin cell lineage in the mouse kidney“

5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 05 - 08.10. 2013, Berlin – Poster

„Renin cell lineage in the mouse kidney“

93rd Annual Meeting of the German Physiological Society, 13. - 15.03.2014, Mainz, Deutschland – Poster

„Distribution of phosphorylated CREB in the mouse kidney“

7.3 Publikationen

7.3.1 Veröffentlichte Publikationen

Kurt B, Paliege A, Willam C, **Schwarzensteiner I**, Schucht K, Neymeyer K, Sequeira-Lopez MLS, Bachmann S, Gomez RA, Eckardt KU, Kurtz A: *Deletion of von Hippel–Lindau Protein Converts Renin-Producing Cells into Erythropoietin-Producing Cells.*

J Am Soc Nephrol 24: 433-444, 2013

Karger C, Kurtz F, Steppan D, **Schwarzensteiner I**, Machura K, Angel P, Banas B, Risteli J, Kurtz A: *Procollagen I-expressing renin cell precursors.*

Am J Physiol Renal Physiol 305: 355-361, 2013

Kurt B, Gerl K, Karger C, **Schwarzensteiner I**, Kurtz A: *Chronic Hypoxia-Inducible Transcription Factor-2 Activation Stably Transforms Juxtaglomerular Renin Cells into Fibroblast-Like Cells In Vivo.*

J Am Soc Nephrol 26: 587-596, 2014

7.3.2 Eingereichte Publikationen

Christina Oxlund, Birgül Kurt, **Ilona Schwarzensteiner**, Mie Rytz Hansen, Mette Stæhr, Per Svenningsen, Ib Abildgaard, Anja Toft, Gitte R. Hinrichs, Claus Bistrup, Boye L Jensen: *The Aldosterone Mineralocorticoid Receptor Pathway Promotes Urine Prostatic Excretion Through Glomerular Barrier Injury.*

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmitteln. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Regensburg, den 31.03.2015

Ilona Schwarzensteiner

8. Danksagung

Diese Arbeit entstand durch die Mithilfe vieler Menschen, bei denen ich mich an dieser Stelle gerne bedanken möchte:

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Armin Kurtz für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit. Durch seine unkomplizierte und freundliche Art schaffte er es stets mich zu motivieren. Ich danke ihm sehr für das Vertrauen in meine selbstständige Arbeit und dafür, dass bei ihm jederzeit die Tür zum Büro offen stand, was nicht selbstverständlich ist. Vielen Dank dafür!

Vielen herzlichen Dank auch an Birgül, Katha und Rosi, mit denen ich im Lauf der letzten Jahre zusammenarbeiten und eine schöne Zeit verbringen durfte. Danke für die tolle Stimmung und Hilfsbereitschaft im Labor und im Büro.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Robert Götz für die Durchführung der Methode der isoliert perfundierten Niere. Mein besonderer Dank geht auch an Ramona Mogge, die so schöne Western Blots angefertigt hat.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Philipp und meinen Eltern Anne und Erwin:

Philipp, du hast in guten und in schlechten Zeiten immer zu mir gehalten. Deine aufheiternden Worte und deine bedingungslose Zuneigung haben mir nicht nur beim Erstellen dieser Arbeit, sondern auch in allen anderen Lebenslagen Halt und Sicherheit gegeben. Dafür, dass du immer für mich da bist, danke ich dir von ganzem Herzen.

Meine lieben Eltern, ohne eure Unterstützung und Bestärkung wäre ein Studium und die daraus resultierende Arbeit nicht möglich gewesen. Ich schulde euch großen Dank für euer Verständnis und eure Rücksichtnahme während der langen Studienzeit und dem darauffolgenden Anfertigen der Dissertation.