

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE II  
PROF. DR. MED. FRANK SCHWEDA  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Etablierung von Zellkulturmodellen zur Untersuchung der Reninbildung  
im renalen Sammelrohr und der Nebenniere**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Martin Karl-Heinz Albert Fuchs

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Frank Schweda

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Christoph M. Birner

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Juli 2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	5
1.	Histologie und Physiologie der Niere	6
1.1	Mikroskopischer Aufbau	6
1.2	Physiologie	7
2.	Histologie und Physiologie der Nebenniere	9
3.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	9
3.1	Wirkungen des Aldosterons	13
3.2	Die Regulation des zirkulierenden RAAS	13
3.2.1	Lokale Regulationsmechanismen des RAAS	13
3.2.2	Systemische Regulationsmechanismen der Reninsynthese und –sekretion	14
3.3	Zelluläre Mechanismen der Renin-Sekretion	16
4.	Die Rolle des RA(A)S in der Pathophysiologie	19
5.	Das lokale Renin-Angiotensin-System (RAS)	21
6.	Das gewebständige RAS der Nebenniere	22
6.1	Die physiologische Bedeutung des adrenal synthetisierten Renins	24
7.	Zielsetzung der Arbeit	25
<b>II.</b>	<b>Methoden und Material</b>	26
1.	Mikrodissektion von Sammelrohren und Anlage einer Primärkultur	26
2.	Mikrodissektion von Sammelrohren und Isolation des inneren Marks	32
3.	Primärkultur aus Zellen des inneren Nierenmarks (IMCD-Primärkultur)	33
4.	M1-Sammelrohrzelllinie	35
5.	mpkCCD-14-Zelllinie	38
6.	mRNA-Isolierung	39
7.	Photometrische Messung der mRNA-Konzentration und reverse Transkription	40
8.	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTqPCR)	42
9.	Nebennierenprimärkultur	44
10.	Reninaktivitätsmessung (Angiotensin-I-ELISA)	47
11.	Geräte	50
12.	Verbrauchsmaterial	51
13.	Zellkulturmedien und Medienzusätze, Puffer und Lösungen	53
14.	Chemikalien und Reagenzien	54

## Inhaltsverzeichnis

15.	Enzyme und Kit-Systeme	55
16.	Primer	56
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	57
1.	Untersuchungen an isolierten Sammelrohren aus Nierenrinde und äußerem Nierenmark, sowie an frisch isoliertem inneren Nierenmark	57
2.	Primärzellkultur aus isolierten Sammelrohren und isoliertem inneren Nierenmark	60
3.	Reninexpression in den Sammelrohrzelllinien M1 und mpkCCD-14	63
4.	Reninexpression in Nebennierenzellen	65
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	69
1.	Vorwort	69
2.	Nachweis einer lokalen Reninsynthese in Sammelrohren	70
3.	Aus in vivo nach in vitro - Etablierung eines Zellkulturmodells mittels Mikrodissektion nicht wegweisend	71
4.	IMCD-Primärkultur - Verlust der Eigenschaften eines lokalen RAS in vitro?	71
5.	Immortalisierte M1- und mpkCCD-14-Zelllinien zeigen keine Reninsynthese	72
6.	Nebennierenprimärkultur Nachweis einer Reninsynthese und Darstellung der regulativen Effekte von Angiotensin II auf Renin in Nebennierenzellen in vitro	74
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	77
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	78
<b>VII.</b>	<b>Anhang</b>	86
1.	Abkürzungsverzeichnis	86
2.	Abbildungsverzeichnis	90
	<b>Erklärung</b>	
	<b>Danksagung</b>	

### I. Einleitung

„In der Niere wird eine blutdrucksteigernde Substanz gebildet und dem Blute übergeben“ [91]. Diese Schlussfolgerung zogen Tigerstedt und Bergman aus Versuchen in denen sie einem gesunden Kaninchen einen Gewebeextrakt aus Kaninchennieren injizierten, worauf bei diesem der arterielle Blutdruck deutlich anstieg.

Nach diesem ersten Nachweis des Renins aufgrund dessen systemischer, blutdrucksteigernder Wirkung, folgte in den nächsten Jahrzehnten die Identifizierung der einzelnen Komponenten des plasmatischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und dessen renaler wie auch extrarenaler Bildungs- und Wirkungsorte, sowie dessen Regulationsmechanismen, sogar auf molekularer Ebene [87].

Die eminente Bedeutung dieses plasmatischen und damit systemisch wirkenden, endokrinen Systems für die Elektrolyt- und Wasserhomöostase sowie für den Gefäßtonus und somit für die Regulation des arteriellen Blutdrucks führte auch zur Einführung von Pharmaka, die in das RAAS eingreifen. Heute sind die ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten Erstlinien-Medikamente zur Therapie des arteriellen Hypertonus. Zudem sind Hemmstoffe des RAAS auch zu einer unverzichtbaren Komponente einer modernen Herzinsuffizienztherapie geworden [45].

Neben dem systemisch wirkenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das phänomenologisch mittlerweile gut verstanden ist und das seinen Ursprung in der Freisetzung von Renin aus reninbildenden Zellen, die in den afferenten Arteriolen der Nierenkörperchen lokalisiert sind, hat, existieren auch lokale, also gewebsständige Renin-Angiotensin-Systeme. Im Besonderen zeigte sich eine Aktivierung eines lokalen intrarenalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als Folge eines unphysiologischen bzw. pathologischen Zustandes wie etwa eines Diabetes mellitus oder eines renin-abhängigen Hypertonus. Als Quelle des Renins zeigte sich hier der Tubulusapparat der Niere, insbesondere das Sammelrohr [42].

## **Einleitung**

Obwohl gesichert ist, dass Renin auch im Tubulussystem der Niere und in extrarenalen Geweben, wie der Nebenniere, exprimiert wird, sind wesentliche Fragen zur Bildung und Freisetzung von Renin aus diesen Quellen völlig unklar. Um die Regulation der Reninsynthese in Tubuluszellen und Nebenniere auf zellulärer Ebene besser verstehen zu können, war das Ziel dieser Arbeit, geeignete Zellkulturmodelle zu etablieren.

### **1. Histologie und Physiologie der Niere**

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit vor allem im Bereich des Sammelrohres, der Nebennieren und des RAAS liegt, wird in diesem Abschnitt ein, zum Verständnis wichtiger, Überblick über anatomische und physiologische Zusammenhänge gegeben.

In ihrer Funktion als Ausscheidungsorgane bilden die beiden Nieren den Harn. Neben der Regulation des Wasser-, Säure-, Basen- und Elektrolythaushaltes ist die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte einer der Schlüsselaufgaben der renalen Funktion. Zudem nimmt die Niere endokrin Einfluss auf die Erythropoese und auf den systemischen Blutdruck.

#### **1.1 Mikroskopischer Aufbau**

In einem Längsschnitt durch eine Niere, welche paarig und in retroperitonealer Lage bei Säugern vorkommt, lässt sich rein makroskopisch schon eine Zonierung erkennen. Ein dunkler gefärbter Randbereich, die Nierenrinde (Cortex renalis) grenzt sich von einem nach innen, zum Nierenbecken (Pyelon) hin, heller werdenden Nierenmark (Medulla renalis) ab. Nierenrinde und Nierenmark umgeben den Sinus renalis. In diesem befinden sich das Kelchsystem, das Nierenbecken, Fettgewebe sowie die großen Blutgefäße.

Die funktionelle Baueinheit der Niere ist das Nephron. Dieses besteht aus dem kortikal gelegenen Nierenkörperchen (Corpusculum renale), einem Kapillarknäuel mit Epithelüberzug, und den unverzweigten Nierentubuli, die sich schließlich in das Sammelrohr entleeren. In einer menschlichen Niere variiert die Anzahl der Nephronen zwischen 600.000 und 1,2 Millionen.

## **Einleitung**

Jedes Nierenkörperchen wird über eine Arteriola afferens mit Blut gespeist. Dieses Vas afferens verzweigt sich im Glomerulus in ein Knäuel speziell gestalteter Kapillaren. Ein Vas efferens leitet das Blut nach der „Glomeruluspassage“ wieder ab. An das Nierenkörperchen schließt sich das Tubulussystem an, das mit der Bowman-Kapsel, welche als zweiblättrige Struktur gewachsen ist, beginnt. Im Raum zwischen den beiden Blättern, Kapselraum genannt, wird der Primärharn als Ultrafiltrat des Plasmas, welches im Glomerulus erzeugt wird, abgegeben. Auf der dem Glomerulus gegenüber liegenden Fläche der Bowman-Kapsel kann der Primärharn den Kapselraum in Richtung des Tubulus-Systems verlassen. Der proximale Tubulus, welcher sich an die Bowman-Kapsel anschließt, geht in eine haarnadelförmige Schleife, die Henle-Schleife, über. Diese Struktur wird aus den intermediären und distalen Tubuli gebildet und mündet über einen Verbindungstubulus in das Sammelrohr. Diese Tubuli renales colligentes konvergieren im Bereich des inneren Marks mehrfach und erreichen als Ductus papillares die Papillenspitze, aus welcher der endgültig konzentrierte Harn nach Filtration, Sekretion und Reabsorption im Nephron und Sammelrohr in das Nierenbecken fließt [98, 100]. Ein morphologisches Charakteristikum der Sammelrohre sind die mehrfachen Verzweigungen, bedingt durch die Einmündungen der distalen Tubuli.

### **1.2 Physiologie**

In den Glomerula werden ca. 100 ml/min, d.h. 150 l/Tag Primärharn filtriert, worauf im nachgeschalteten Tubulussystem ein Großteil des filtrierten Wassers und der darin gelösten Substanzen wieder reabsorbiert wird. Zudem kommt es auch zu einer Sekretion von Stoffen aus dem Blut in die Tubulusflüssigkeit. Im Prinzip werden im Bereich des proximalen Tubulus und der Henle-Schleife große Flüssigkeitsmengen transportiert, während in den distalen Abschnitten des Nephrons sowie dem Sammelrohr die Feineinstellung der Harnbildung vorgenommen wird. Eine entscheidende Voraussetzung für den genannten Prozess der Filtration in den Glomerula ist die Nierendurchblutung, welche durch verschiedene Autoregulationsmechanismen konstant gehalten wird. Neben der myogenen Vasokonstriktion ist der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus zu nennen. Die funktionstragenden Strukturen dieses Mechanismus sind zum einen die Macula densa, ein kleiner Epithelbereich im distalen Tubulus, dort lokalisiert wo dieser mit dem Vas afferens seines Nierenkörperchens in Kontakt tritt, zum anderen sind es die extraglomerulären Mesangiumzellen. Es wird der NaCl-Gehalt perzipiert,

## Einleitung

wobei es bei einer zu hohen NaCl-Konzentration zu einer Vasokonstriktion der Arteriola afferens kommt. Damit sinkt der Filtrationsdruck im Glomerulum und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nimmt ab.

Gelangt der Primärharn vom Corpusculum renale in den proximalen Tubulus so findet dort ein „Massentransport“ statt, wobei ein Großteil des filtrierten Wassers und Bikarbonates rückresorbiert wird. Über Natrium-gekoppelte Symport-Transportprozesse werden u.a. Aminosäuren, Laktat und Glukose über die luminale Membran absorbiert und basolateral wieder dem Blutstrom zugeführt.

Eine der Hauptaufgaben der Henle-Schleife ist die Harnkonzentrierung. Dazu wird in der absteigenden und dünnen aufsteigenden Henle-Schleife ein hyperosmolares Nierenmark erzeugt.

Die Nieren können, abhängig vom aktuellen Salz- und Wasserhaushalt, einen im Vergleich zur Plasmaosmolarität (ca. 270 mosmol/l), hypo- (50 mosmol/l), iso- oder auch hyperosmolaren (1.200 mosmol/l) Urin produzieren, um die lebensnotwendige Plasmahomöostase zu gewährleisten. Unter dem endokrinen Einfluss des antidiuretischen Hormons (ADH) kommt es am Sammelrohr cAMP-abhängig zum Einbau von Aquaporin-2 Kanälen in der luminalen Plasmamembran. Wasser kann nun, dem osmotischen Gradienten folgend, aus der Tubulusflüssigkeit ins hyperosmolare Nierenmark gelangen und dadurch rückresorbiert werden. Es kommt durch diesen Anti-Diurese-Mechanismus zu einer Aufkonzentrierung des im Tubulus verbleibenden Harns. Darüber hinaus nimmt die Niere über ihre endokrinen Stoffwechselfunktionen Einfluss auf die Hämatopoiese und die Blutdruckregulation über das RAAS.

Über die Hydroxylierung von 1,25-Hydroxycholekalziferol zu Kalzitriol, was den abschließenden Schritt der Kalzitriolsynthese darstellt, nimmt die Niere Einfluss auf den Kalziumhaushalt und die Mineralisierung der Knochen [82].



### 2. Histologie und Physiologie der Nebenniere

Die Nebennieren setzen sich aus zwei entwicklungsgeschichtlich und funktionell unterschiedlichen Bestandteilen zusammen. Zum einen die außen liegende Nebennierenrinde, zum anderen das innen liegende Nebennierenmark.

Die Nebennierenrinde gliedert sich in drei Zonen. Die außen liegende Zona glomerulosa, zur Mitte geht diese in die Zona fasciculata über, markwärts folgt die Zona reticularis, welcher sich der Übergang ins Nebennierenmark anschließt. Alle drei Zonen verbindet funktionell die physiologische Aufgabe der Steroidhormonsynthese aus dem Grundsubstrat Cholesterol. Die Zona glomerulosa synthetisiert das Mineralokortikoid Aldosteron. Die Zona fasciculata bildet Glukokortikoide, insbesondere das Kortisol. Die Synthese der Glukokortikoide wird durch die hypothalamisch-hypophysäre Achse reguliert. Dies wird insbesondere durch das aus der Adenohypophyse stammende Kortikotropin (ACTH) vermittelt. In der Zona reticularis werden neben Glukokortikoide auch Androgene wie etwa das „Dehydroepiandrosteron“ gebildet, welches in den Gonaden geschlechtsspezifisch, beispielsweise zu Testosteron oder auch Östrogenen enzymatisch umgewandelt wird.

Das Nebennierenmark kann als „endokrine Variante“ eines sympathischen Ganglions angesehen werden. Es besteht aus modifizierten sympathischen Neuronen und bildet die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin [98].

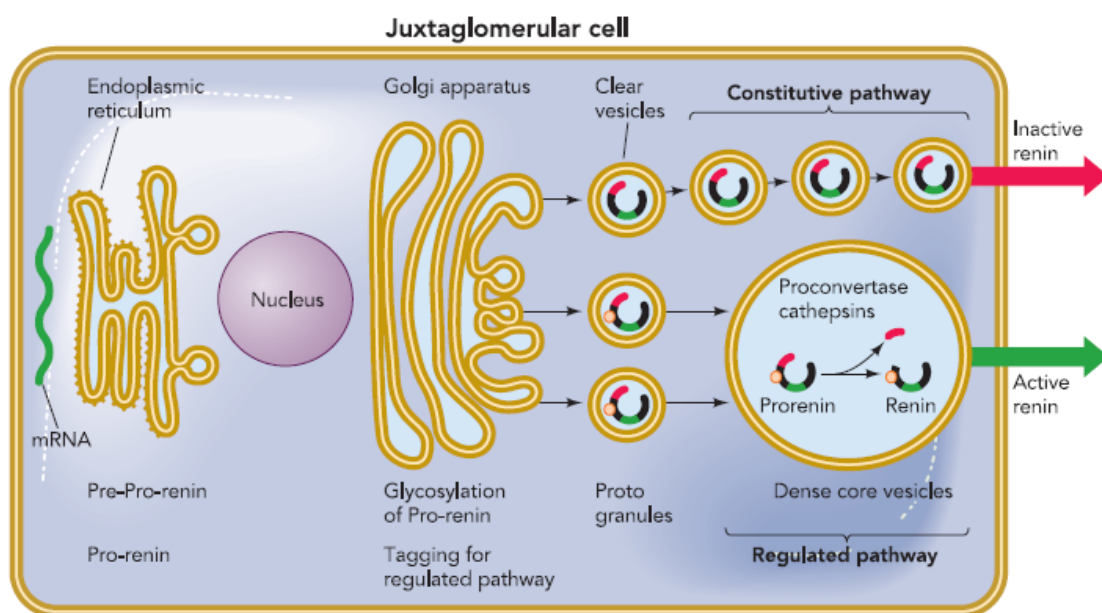
### 3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Durch eine Abfolge proteolytischer Aktivierungen steuert das RAAS die Blutdruckeinstellung und die Salz- bzw. Wasserhomöostase [97].

Renin, eine Aspartat-Protease, wird durch die granulierten juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen), die in der Wand der glomerulären Arteriola afferens gelegen sind und einen Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates darstellen, synthetisiert. Zunächst wird im Rahmen der Synthese das Prä-Prorenin gebildet. Nach dem Erreichen des endoplasmatischen Reticulums und Abspalten des Signal-Peptides, wird es zum Prorenin, einer enzymatisch inaktiven Vorstufe [87]. Die weitere Prozessierung erfolgt über den Golgi-Apparat.

## Einleitung

Hier wird das Prorenin in Sekretionsvesikel verpackt. Über diese wird Prorenin entweder über sog. „Clear vesicles“ konstitutiv sezerniert, d.h. ohne regulierte Exozytose nach extrazellulär transportiert oder Prorenin wird in spezialisierten Vesikeln durch Enzyme wie die Prohormon-Konvertase und Catepsin B [59, 68, 72] zu aktivem Renin gespalten. Dieses biologisch aktive Renin wird reguliert endokrin sezerniert und entfaltet so seine systemische Wirkung.



**Abb. 1: Synthese und Sekretion von Renin und Prorenin**

(aus: Schweda, et al., *Physiology*, 2007, 22, S. 311 [87])

Als weitere Komponente des RAAS ist das Angiotensinogen aufzuführen. Angiotensinogen ist ein hepatisch synthetisiertes Glykoprotein, von dem im Plasma durch Renin ein Dekapeptid, das Angiotensin I, abgespalten wird. Die enzymatische Kaskade des RAAS wird durch das in Niere, Leber und v.a. in der Lungenstrombahn gebildete angiotensin-converting-enzyme (ACE) fortgesetzt. ACE spaltet in seiner Funktion als Protease zwei weitere Aminosäuren ab und wandelt so Angiotensin I zu Angiotensin II um (Ang II, ein Oktapeptid).

## Einleitung

Als „Mediator“ [82] des RAAS nimmt Angiotensin II nun direkt und indirekt Einfluss auf den systemischen Blutdruck sowie die Salz- und Wasserhomöostase. Angiotensin II vermittelt seine Wirkung über membranständige Angiotensin II-Typ-1-Rezeptoren (AT1-Rezeptor) und führt neben einer Natriumresorption im proximalen Tubulus, einer Förderung von Durst und Salzappetit auch zu einer zentralen Freisetzung von ADH. Die Induktion der Aldosteronfreisetzung in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und die Vermittlung einer systemischen Vasokonstriktion in verschiedenen Stromgebieten, sind aufgrund ihrer großen biologischen Bedeutung als „die Haupteffekte“ des Angiotensin II zu sehen.

Die Angiotensin II-Wirkungen, vermittelt über den AT1-Rezeptor, nehmen im Hinblick auf die Regulation von Gefäßtonus sowie die Beeinflussung von Blutdruck und Salz- bzw. Wasserhaushalt die zentrale Rolle ein. Daneben bindet Angiotensin II auch an Typ-2, Typ-3 Rezeptoren und an Angiotensin IV binding sites. [19, 43]. Der AT1-Rezeptor ist in seiner Struktur ein GPCR (G-protein-coupled-receptor) [95], dabei ist die transmembranäre Domäne mit einem G-Protein gekoppelt, das bei Aktivierung durch Ligandenbindung die Inositoltriphosphat-Kaskade in Gang setzt. Dies führt letztendlich zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration [43, 82].

Aldosteron, ein Steroidhormon wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus dem Baustein Cholesterol gebildet. Die Synthese und Freisetzung des Mineralokortikoids wird durch Angiotensin II, eine Hyperkaliämie sowie niedrige plasmatische Natriumkonzentration stimuliert.

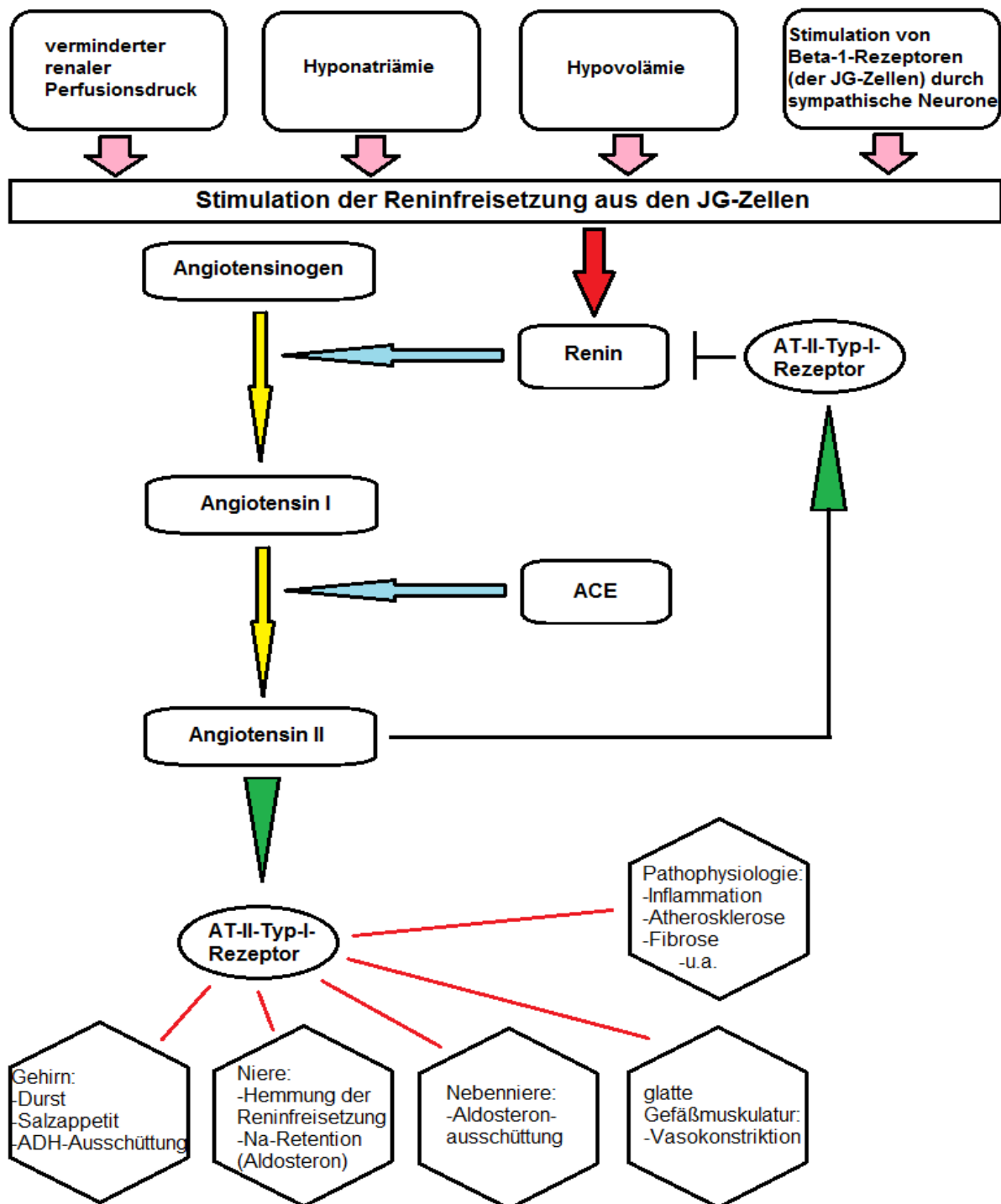


Abb. 2: Schematische Darstellung des RAAS

(erstellt nach Lüllmann, Mohr, Hein, *Pharmakologie und Toxikologie*, 2010, S. 134-138 [55] und Schmidt, Lang, Heckmann, *Physiologie des Menschen*, 2010, S. 674 [82])

### 3.1 Wirkungen des Aldosterons

Der als Steroid-Rezeptor intrazellulär bzw. zytosolisch vorkommende und bei Ligandenbindung intranukleär wirkende Aldosteron-Rezeptor vermittelt bei Aktivierung hauptsächlich die Synthese und den Einbau von epithelialen Na-Kanälen (ENaC) in die luminale Zellmembran von Sammlerohr und distalem Tubulus [25, 56].

### 3.2 Die Regulation des zirkulierenden RAAS

Zum einen nehmen lokal wirkende Mechanismen Einfluss auf die Reninsekretion, zum anderen sind es systemische Faktoren, welche die Reninsynthese und die Exozytose beeinflussen.

#### 3.2.1 Lokale Regulationsmechanismen des RAAS

Bei der lokalen Steuerung der Reninsekretion sind verschiedene renale Strukturen beteiligt. Die Macula densa detektiert die Kochsalz-Konzentration der Tubulusflüssigkeit im distalen Tubulus des Nephrons und hemmt bei einem Anstieg der tubulären NaCl-Konzentration die Reninfreisetzung. Eine Abnahme der NaCl-Konzentration hat entsprechend den gegenteiligen Effekt. Die Kommunikation zwischen Macula densa Zellen und den reninproduzierenden JG-Zellen, die in diesem Bereich benachbart angeordnet sind, erfolgt über Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO) und Adenosin bzw. Adenosintriphosphat (ATP) [10].

Beta-1-Adrenorezeptoren, die von reninproduzierenden JG-Zellen exprimiert werden, bilden die molekulare Grundlage für eine neuronale Regulation der Reninfreisetzung [7]. Nach Aktivierung von Beta-1-Adrenorezeptoren durch Katecholamine kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieser „second messenger“ ist der zytosolisch wirkende Hauptstimulus der Reninfreisetzung [10].

### 3.2.2 Systemische Regulationsmechanismen der Reninsynthese und –sekretion

Neben den bereits skizzierten lokalen Regulationsmechanismen nehmen systemische Mechanismen Einfluss auf die Reninbildung und -freisetzung. Ein grundlegendes Prinzip, das sich bei näherer Betrachtung der systemischen Regelkreise herausbildet, ist ein negativer Feedback-Mechanismus [10]. Die bestimmenden Einflussfaktoren sind dabei der systemische Blutdruck bzw. der renale Perfusionsdruck, die Salzaufnahme und endokrin wirkende Mediatoren.

Im Jahre 1997 wurde gezeigt, dass nicht der renale Blutfluss, sondern der renale Perfusionsdruck die entscheidende Einflussgröße darstellt, über die der systemische Blutdruck die Reninsynthese und –sekretion moduliert [64]. Ein Anstieg des Perfusionsdrucks in den Nieren bewirkt eine Abnahme der Reninbildung und –freisetzung an den JG-Zellen. Dagegen führt eine Verminderung des systemischen Blutdrucks und somit auch des renalen Perfusionsdrucks zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von Renin [94]. Dieser Regelkreis gründet auf zwei entscheidenden, im Nierengewebe ablaufenden Vorgängen. Ein steigender systemischer Blutdruck führt kurzfristig zu einem steigenden glomerulären Perfusionsdruck und dadurch zu einer erhöhten Kochsalzbeladung des Tubulussystems. Kann dies nicht durch gesteigerte Reabsorption ausgeglichen werden, steigt die Kochsalzkonzentration im Bereich der Macula densa Zellen im distalen Tubulus an und die Reninsekretion aus den JG-Zellen wird gehemmt.

Weitgehend unabhängig von dem „Macula densa – Mechanismus“ nimmt der systemische Blutdruck über renale Barorezeptoren Einfluss auf die Reninsynthese und -freisetzung. Auch wenn die genaue Lokalisation der renalen Barorezeptoren bisher noch nicht identifiziert werden konnte, so sind diese Zellen, die den Perfusionsdruck perzipieren, in der Arteriola afferens zu vermuten. Sinkt der renale Perfusionsdruck unter einen bestimmten Grenzwert ab, kommt es zu einer Stimulation der Reninsynthese und deren endokriner Sekretion [46].

Nicht zuletzt übt das sympathische Nervensystem als ein weiterer extrarenaler Faktor einen bedeutenden Einfluss auf die Reninbildung und -freisetzung aus. Das vegetative Nervensystem integriert Informationen beispielsweise über Afferenzen aus dem kardiovaskulären System kommend oder auch aus höheren kortikalen Zentren stammend und

## Einleitung

wird dadurch in seiner Aktivität moduliert. So können diese extrarenal gelegenen Organsysteme über sympathische Efferenzen unmittelbaren Einfluss auf die Reninproduktion und –sekretion in den JG-Zellen nehmen [92].

Eine sympathikotone Reaktion führt in der Niere zu einer erhöhten Reninsekretion, zu einer Vasokonstriktion der glomerulären Arteriolen und folglich zu einer niedrigeren glomerulären Filtrationsrate (GFR), welche eine Abnahme der Natriuresis bedingt [18, 52, 58, 10]. Als Konsequenz einer erhöhten Reninsekretion, dem regulativen Element der RAAS-Kaskade, kommt es außerdem zu Angiotensin II abhängigen biologischen Effekten [51]. Eine zentrale Rolle in diesem neuronalen Regelkreis zur Regulation des systemischen Blutdrucks nehmen die Afferenzen aus den aortalen Barorezeptoren ein. Werden diese im Versuch deaktiviert, kommt es zu einer Erhöhung des Sympathikotonus, ähnlich wie bei einem Blutdruckabfall [8].

Desweiteren wird die Aktivität des zirkulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch die Salzaufnahme reguliert. Dabei erhöht eine geringe Salzaufnahme die Reninsynthese und -freisetzung, eine vermehrte Salzaufnahme vermindert die Reninbildung und –sekretion in den JG-Zellen [94]. Eine genaue Identifizierung der Mechanismen, welche die Modulation des RAAS, abhängig von der Salzzufuhr vermitteln, gelang bisher noch nicht. Auch wenn bereits bekannte Vorgänge wie etwa der Macula densa-Mechanismus oder der renale Sympathikotonus dafür verantwortlich scheinen. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine hohe Salzzufuhr die sympathische Aktivität in der Niere gesenkt wird [2, 17, 54].

Außerdem erfährt die Aktivität des RAAS eine Regulation durch endokrin wirksame Mediatoren.

In einem Review von Hackenthal et al. (1990) [32] werden die einzelnen Einflussfaktoren beschrieben und ihre regulative Wirkung auf die Reninbildung und -freisetzung diskutiert. Hierbei ist im Besonderen das Angiotensin II zu erwähnen, das Effektorpeptid der RAAS-Kaskade. Die Beschreibung der modulierenden Wirkung von Angiotensin II auf das zirkulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist umso wichtiger, da sich der experimentelle Teil dieser Arbeit u.a. auch mit dem Einfluss von Angiotensin II auf das nicht zirkulierende, d.h. ortsständige bzw. lokale RAAS beschäftigt.

Im Plasma zirkulierendes Angiotensin II hemmt im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die Reninbildung und -freisetzung [32]. Dabei vermittelt Angiotensin II seine regulative Wirkung über den AT1-Rezeptor. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass durch die pharmakologische Absenkung der Konzentration an zirkulierendem Angiotensin II mittels eines ACE-Hemmers, die plasmatische Reninkonzentration deutlich ansteigt [9, 34].

### 3.3 Zelluläre Mechanismen der Renin-Sekretion

Sowohl die durch lokale Mechanismen geprägte Beeinflussung der Reninsynthese und –freisetzung als auch die systemische Regulation des RAAS üben ihre regulative Wirkung auf die JG-Zellen über eine gemeinsame Endstrecke einer intrazellulär ablaufenden Signalkaskade aus. Dabei nehmen drei intrazelluläre second messenger Systeme eine zentrale Rolle ein, die cAMP und die cGMP Signalkaskade sowie durch Calcium-Ionen ausgelöste zelluläre Effekte.

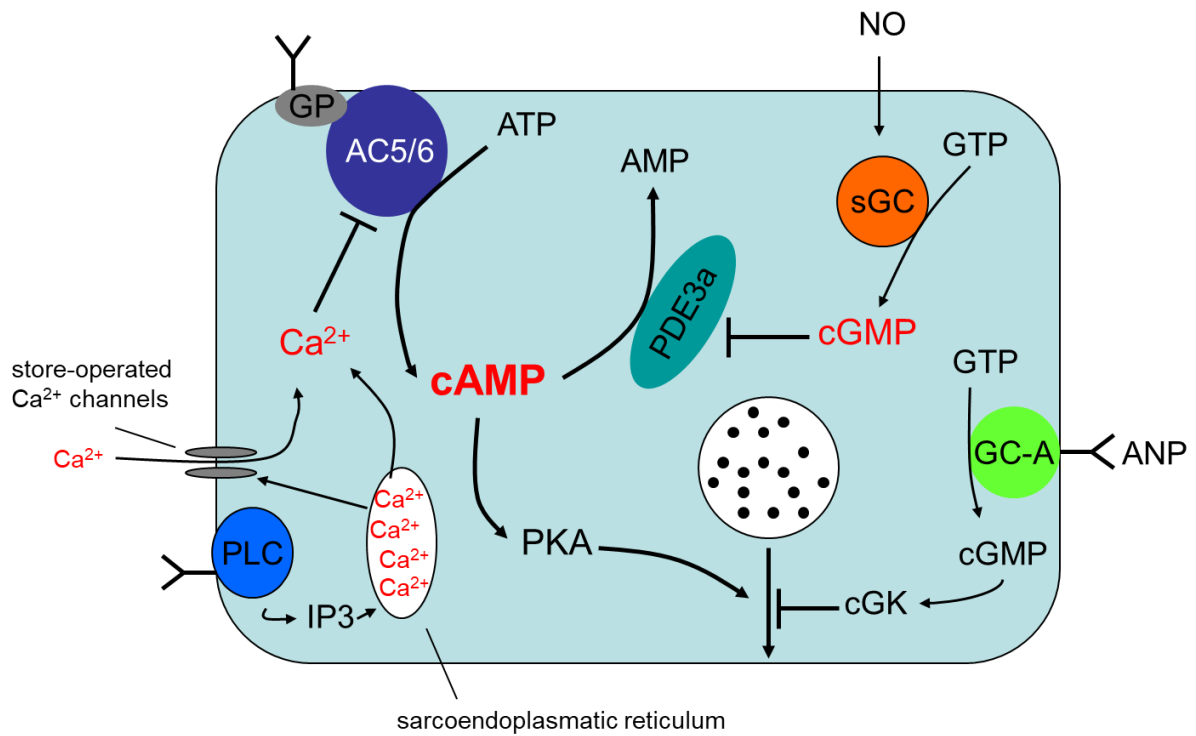
Wie bereits erwähnt, führt die Stimulation von Beta-1-Adrenorezeptoren zu einer Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase, deren enzymatische Funktion darin besteht, die Umwandlung von Adenosintriphosphat in cAMP zu katalysieren. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der zytosolischen cAMP Konzentration in den JG-Zellen eine vermehrte Reninsynthese und -freisetzung bedingt [5, 23, 44, 47, 93, 96]. Cyclisches Adenosinmonophosphat kann somit als der zentrale intrazelluläre Stimulus der Reninsekretion bezeichnet werden [10].

Neben dem sympathischen Teil des vegetativen Nervensystems, üben weitere, das RAAS regulierende endokrine Faktoren über das cAMP-System als intrazellulärer second messenger Einfluss auf die JG-Zellen aus [10]. Diese, für die Reninsynthese und –sekretion, zentrale Funktion des cAMP konnte in weiteren Versuchsreihen, welche die cAMP-Wirkung isoliert von in vivo-Einflüssen oder Rezeptor-Aktivierungen untersuchten, bekräftigt werden [23]. Isolierte JG-Zellen zeigten bei der Behandlung mit Forskolin, welches über eine Aktivierung der intrazellulären Adenylatzyklase die zytosolische cAMP-Konzentration erhöht, eine vermehrte Reninfreisetzung [31, 47]. Auch die Behandlung von JG-Zellen mit 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), einem Phosphodiesterase-Inhibitor, der ebenfalls die cAMP-Konzentration erhöht, zeigt eine Steigerung der Reninfreisetzung [11, 12, 13, 49, 50].



## Einleitung

Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zeigt sich als der bedeutendste Inhibitor der Reninfreisetzung. Außer in Zellen der Nebenschilddrüsen und den JG-Zellen führt eine Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration zu einer Exozytose eines Vesikelinhaltes und ist somit für die Freisetzung von Proteinen verantwortlich. Aus diesem Grund wird die, durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration induzierte Hemmung der Reninfreisetzung als das „Calcium-Paradox der Reninfreisetzung“ beschrieben. Angiotensin II wirkt im Rahmen seines negativen Feedbackmechanismus über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration bezüglich einer Reninfreisetzung aus den JG-Zellen inhibierend [32, 86]. Während cAMP und Calcium-Ionen in ihrer regulativen Wirkung im Hinblick auf die Reninsynthese und –freisetzung eindeutig eingeordnet werden können, gelingt dies bei dem cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) nicht. Dieses als intrazellulärer second messenger in den JG-Zellen vorkommende Molekül kann die Reninfreisetzung sowohl stimulieren als auch hemmen [10]. Werden JG-Zellen mit membrangängigen cGMP-Analoga behandelt, kommt es zu einer Hemmung der Reninfreisetzung [30, 33, 48, 49, 50, 70, 85]. Im Gegensatz dazu ergibt sich bei der direkten Injektion von cGMP in einzelnen JG-Zellen eine Steigerung der Reninfreisetzung [24].



**Abb. 3: intrazelluläre Signalkaskade für die Stimulation und Inhibition der Reninsekretion**

(aus: Schweda, et al., *Physiology*, 2007, 22, S. 314 [87])

### 4. Die Rolle des RA(A)S in der Pathophysiologie

Bei ca. 10-15 % der Patienten mit einer primären oder auch essentiellen Hypertonie lassen sich erhöhte Plasmapreninaktivitäten feststellen. Hierbei kommt es zu einer vermehrten Bildung von Angiotensin II. Dies stellt, aufgrund einer dauerhaften Vasokonstriktion, eine wichtige Komponente zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie dar [90]. Dysregulationen des RAAS sind also ein wesentlicher pathogenetischer Faktor der Volkskrankheit „Bluthochdruck“.

Die Auswirkungen einer erhöhten Angiotensin II-Konzentration im Plasma wurden in verschiedenen Versuchsreihen betrachtet. Hierzu wurden Ratten und Mäuse so behandelt, dass es zu einem Anstieg der plasmatischen Angiotensin II-Konzentration kam. Dies wurde einerseits durch die Infusion von Angiotensin II erreicht, andererseits wurde operativ, mittels eines Clips zur Verengung einer Nierenarterie, eine Nierenarterienstenose (Goldblatteeffekt) erzeugt, welche wiederum zu einem Anstieg des plasmatischen Angiotensin II Spiegels führt. Wie zu erwarten, erhöhte sich bei den Versuchstieren der arterielle Blutdruck. Weiter konnte gezeigt werden, dass zirkulierendes Angiotensin II einen entscheidenden Einfluss auf die Reninsynthese nimmt. Während Angiotensin II die Reninsynthese in den JG-Zellen bekanntermaßen im Sinne eines negativen Feedbacks hemmt, gibt es Hinweise darauf, dass die Reninbildung in den Hauptzellen des Sammelrohrs durch Angiotensin II stimuliert wird [78, 79, 74, 75, 76]. Neben dem systemisch wirkenden RAAS existieren also auch ortsständige Renin-Angiotensin-Systeme, die, wie bei den genannten Versuchen zu sehen, gegebenenfalls auch einer unterschiedlichen oder sogar gegensätzlichen Regulation unterworfen sind.

Der im Jahre 1986 erbrachte Nachweis von Angiotensinogen-mRNA sowohl in kortikalen als auch in medullären Zellen der Niere war einer der ersten Hinweise auf ein ortsständiges, lokal organisiertes und wirkendes RAS [39]. In Folgeversuchen konnte die Steigerung der Renin-Synthese durch den Einfluss von Angiotensin II an einer murinen Sammelrohrzelllinie auch *in vitro* gezeigt werden [42]. Angiotensin II wirkt dabei als Ligand des AT1-Rezeptors und führt in den Sammelrohrzellen des inneren Nierenmarks zu einer Steigerung der Renin-Synthese.

## Einleitung

Nachdem es Hinweise darauf gibt, dass Angiotensin II die Reninsynthese in den Sammelrohrzellen stimuliert, nimmt das lokale RAS eine mögliche Schlüsselrolle in der Pathophysiologie und auch in der Chronifizierung eines arteriellen Hypertonus ein [74, 75, 76].

Eine Steigerung der lokalen (Pro-) Reninbildung in den Sammelrohrzellen kann auch bei einer diabetischen Stoffwechsellaage beobachtet werden. So finden sich in den Hauptzellen der Sammelrohre von Versuchstieren, nachdem bei diesen medikamentös ein Diabetes mellitus induziert wurde, erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an (Pro-) Renin. Die Hauptzellen der Sammelrohre bilden also in dieser hyperglykämischen Stoffwechselsituation physiologisch relevante Mengen an (Pro-) Renin. Durch diese gesteigerte Aktivität des lokalen RAS wird die Reninproduktion in den JG-Zellen gehemmt. Diese Effekte an den Sammelrohrzellen (CD-Zellen) und den JG-Zellen sind Angiotensin II - vermittelt. Erfolgt eine Behandlung mit Olmesartan, einem am AT1-Rezeptor antagonistisch wirksamen Antihypertensivum, zeigt sich eine bis unter die Nachweisgrenze reduzierte (Pro-) Reninbildung in den Sammelrohrzellen. Im Gegensatz dazu erhöht sich wieder die Reninsynthese in den JG-Zellen, da der inhibitorische Einfluss von Angiotensin II wegfällt [42].

Bekanntermaßen führt die anhaltende hyperglykämische Stoffwechselsituation zu hämodynamischen Veränderungen der renalen Mikrozirkulation und zu strukturellen Veränderungen des Glomerulums, wie etwa der Glomerulosklerose [90].

Insbesondere beim Diabetes mellitus kommt bezüglich des RAS auch der Reninvorstufe „Prorenin“ und dessen Rezeptor, dem Prorenin-Rezeptor (PRR), eine nennenswerte Funktion zu. Vor allem in Hinblick auf diabetestypische Organschäden wie der diabetischen Nephropathie [14, 15, 41]. Wie bereits erwähnt, wird das lokale, insbesondere das intrarenale RAS hochreguliert, mit der Folge einer vermehrten Bildung an gewebständigem Angiotensin II [69, 4, 36]. Im Gegenzug wird das systemische RAAS durch das hochregulierte intrarenale RAS in seiner Aktivität gedrosselt. Dies zeigt sich an einer supprimierten Reninaktivität des plasmatischen RAAS in einer diabetischen Stoffwechselsituation [3, 73].

Darüber hinaus wurde in Untersuchungen an Ratten, bei denen durch die Behandlung mit Streptozotocin eine hyperglykämie, diabetische Stoffwechselsituation und daraus folgend eine diabetische Nephropathie hervorgerufen wurde, eine Hochregulation der intrarenalen PRR-Expression festgestellt. Die Albuminurie ist ein Symptom der durch Diabetes mellitus induzierten Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere (Blut-Harn-Schranke). Diese besteht aus dem Endothel des glomerulären Kapillarknäuels, der glomerulären Basallamina und den Podozyten, die sich aus dem inneren Blatt der Bowman-Kapsel differenziert haben [98]. Insbesondere die durch die anhaltende Hyperglykämie induzierte Steigerung der Proreninrezeptor-Expression in den Podozyten scheint bei der Pathogenese des schwerwiegenden Krankheitsbildes der diabetischen Nephropathie eine wichtige Rolle zu spielen [37, 53]. Der Prorenin-Rezeptor besitzt verschiedene Funktionen, die sich in diesem Zusammenhang auf aktuell vier rezeptorvermittelte Effekte zusammenfassen lassen. Sofern die Liganden Renin oder Prorenin an den PRR binden, kommt es zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität des Prorenins bzw. Renins mit einer folglich erhöhten intrarenalen Aktivität des gewebsständigen RAS [38]. Weiter führt die Aktivierung des PRR durch Ligandenbindung zu einer intrazellulären Aktivierung des MAPK(mitogen activated protein kinase)-Signalweges. Darüber hinaus wirkt der Rezeptor mit einer ATPase-Funktion bei der Ansäuerung von Autosomen, Endosomen und Lysosomen mit. Zur Vollständigkeit ist noch die Funktion des PRR als Bindeglied im Wnt-Signalweg zu nennen [71].

### **5. Das lokale Renin-Angiotensin-System (RAS)**

Gerade weil es starke Hinweise dafür gibt, dass das lokale RAS in der Pathogenese von Erkrankungen eine zentrale Rolle einnimmt, ist es notwendig, dieses näher zu betrachten. Wie bereits beschrieben, existieren neben dem systemisch wirkenden RAAS auch ortsständige Renin-Angiotensin-Systeme. So findet sich in den kortikalen und medullären Zellen der Niere ein lokal organisiertes RAS [39]. Genauer wurde die Reninsynthese auch extraglomerulär, in den Hauptzellen des renalen Sammelrohrs und des Verbindungstubulus nachgewiesen [78, 74, 75, 76].

## Einleitung

Die Beschreibung eines lokalen RAS beschränkt sich aber nicht nur auf ein intrarenales RAS. So konnte Angiotensinogen bzw. Renin extrahepatisch u.a. im Gehirn, den glatten Muskelzellen, den Endothelzellen der Gefäße und in weiteren Organen, wie etwa in der Nebenniere nachgewiesen werden [21, 16, 63]. Ein besonderes Charakteristikum der Reninsynthese im lokalen RAS scheint die bereits beschriebene, im Vergleich zum systemischen RAAS unterschiedliche Regulation zu sein [84, 87]. Angiotensin II vermittelt hier seine Wirkung über den AT1-Rezeptor [74, 75, 76].

### 6. Das gewebsständige RAS der Nebenniere

Die vorliegende Arbeit wird sich nicht nur mit dem intrarenalen RAS beschäftigen. Sie wird auch der Frage nachgehen, ob in extrarenalen Organsystemen, hier speziell den murinen Nebennieren bei physiologischen Vorgängen ein lokales RAS mitwirkt. Auch in den kortikalen Strukturen der Nebennieren konnte eine ortsständige Reninaktivität nachgewiesen werden [80]. Hierzu wurde Nebennierengewebe mit Reninsubstrat inkubiert und es konnte Angiotensin I, das enzymatische Produkt, nachgewiesen werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine kochsalzarme Diät die adrenale Reninkonzentration erhöht, eine kochsalzreiche Kost die lokale Reninkonzentration erniedrigt [26, 67, 20].

Untersuchungen an Ratten, bei welchen eine Nephrektomie durchgeführt wurde, ergaben eine Reninaktivität in der äußeren Zone des Nebennierenkortex. Zudem konnte, trotz des Fehlens der Nieren als Reninquelle, Angiotensin II in der Nebennierenrinde und sogar im Plasma nachgewiesen werden. Letzteres bedeutet, dass die lokale Reninproduktion im Nebennierenkortex, nicht nur lokal sondern auch systemisch zur Bildung von Angiotensin II beitragen könnte [1]. Auch in Folgeuntersuchungen konnte nach einer Nephrektomie Angiotensin II in der Nebennierenrinde nachgewiesen werden, während sich, anders als bei den Versuchen von Aguilera, keine relevante Konzentration an Angiotensin II im Plasma zeigte [57].

## Einleitung

Eine weitere wichtige Frage, die es in diesem Zusammenhang zu klären galt, war es, ob Angiotensin II durch ein gewebsständiges, adrenales RAS gebildet wird, oder ob es sich um Angiotensin II aus dem Plasma handelt, das dort konzentriert wird. So zeigten sich mehrere Stunden nach einer Nephrektomie ebenfalls erhöhte adrenale Reninkonzentrationen. Bei einer Renin-Plasmahalbwertszeit von 10-20 Minuten ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass das Plasma-Renin zu den erhöhten adrenalen Konzentrationen beiträgt. Vielmehr ist von einer gesteigerten lokalen Reninsynthese auszugehen [66, 67].

Der Nachweis von adrenalem Renin sowie die Veränderungen der Reninspiegel durch unterschiedliche Salzzufuhr gelangen hauptsächlich in der Nebennierenrinde [67, 20].

Zusammenfassend können 3 Punkte angeführt werden, die für eine lokale, adrenale Reninsynthese sprechen:

- In Nephrektomieversuchen zeigt sich ein schneller Abfall der Plasma-Reninkonzentration innerhalb weniger Stunden, während die lokale adrenale Reninkonzentration ansteigt und nach 24-36 Stunden einen Maximalwert erreicht [66, 20].
- Nachweis von Renin-mRNA in den adrenalen Zellen [22].
- Reninsynthese von Nebennierenzellen in einer Zellkultur [88].

Neben der Regulation der adrenalen Reninproduktion durch den Elektrolythaushalt wird die Stimulation der Reninsekretion in den Nebennierenzellen unter dem Einfluss von Angiotensin II beschrieben [62].

### 6.1 Die physiologische Bedeutung des adrenal synthetisierten Renins

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung des adrenal synthetisierten Renins bestehen verschiedene Konzepte. Es herrscht Einigkeit darüber, dass alle Komponenten eines RAS lokal im Nebennierengewebe, insbesondere in der Zona glomerulosa, vorliegen [63]. Neben der Hypothese, dass das adrenale Renin eine Bedeutung für die lokale Regulation der Aldosteronausschüttung in der äußeren Zone der Nebenniere besitzt, ist es auch denkbar, dass das adrenale RAS einen Einfluss auf die medulläre Freisetzung von Katecholaminen ausübt. Es zeigte sich ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen der Natriumaufnahme, der lokalen Reninproduktion, sowie der Aldosteronfreisetzung. Eine kochsalzarme Diät führte zu erhöhten adrenalen Reninkonzentrationen und einer erhöhten Aldosteronkonzentration. Hieraus ergibt sich ein enges Zusammenspiel aus dem adrenalen Renin und der adrenalen Aldosteronkonzentration [67, 20]. Daraus kann gefolgert werden, dass eine zentrale physiologische Bedeutung des adrenal synthetisierten Renins in der lokalen Regulation der Aldosteronausschüttung liegt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeit von Nakamura et al., 1985 [65], in der gezeigt werden konnte, dass die zu erwartende Aldosteronausschüttung, nach Kaliumgabe unter dem Einfluss des ACE-Hemmers Captopril, supprimiert wird. Ausgehend von diesen Erkenntnissen kann auch der adrenalen Reninsynthese eine wichtige Rolle in zentralen physiologischen Vorgängen zugesprochen werden. Aus diesem Grund wird sich die vorliegende Arbeit nicht nur mit dem intrarenalen RAS, sondern auch dem adrenalen RAS auseinandersetzen.



### 7. Zielsetzung der Arbeit

Die Beschreibung eines lokalen, gewebsständigen Renin-Angiotensin-Systems macht es notwendig, das bisherige Bild des RAS, das bislang v.a. durch seine systemische Wirkung geprägt war, zu erweitern. Obwohl dem lokalen RAS eine große Bedeutung in der Pathophysiologie von Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie zukommen könnte, sind die zellulären Mechanismen, die die Reninsynthese und –sekretion regulieren, und die zum Teil gegensätzlich zum systemischen RAAS zu sein scheinen, größtenteils unbekannt. Die Aufklärung dieser Mechanismen könnte daher Ansatzpunkt für neue Therapien sein, die die lokalen RAS modulieren, ohne das systemische RAAS zu beeinflussen.

Ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge, die die Reninbildung in Tubuluszellen und Nebennierenzellen regulieren, setzt ein geeignetes Zellmodell voraus. Diese Zellmodelle existieren allerdings bisher gar nicht oder sie sind nicht ausreichend charakterisiert, um die Aussagekräftigkeit eventueller Ergebnisse beurteilen zu können. Deshalb war es die Hauptaufgabe meiner Arbeit, Zellkulturmodelle zu etablieren, die ein adäquates Modell darstellen um die Vorgänge im lokalen RAS sowie dessen Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene untersuchen zu können. Wie erwähnt lag dabei das Hauptaugenmerk auf dem renalen Sammelrohr und der Nebenniere.

Um die Reninbildung in Sammelrohrzellen untersuchen zu können wurden Sammelrohre aus murinen Nieren isoliert und molekularbiologisch untersucht, oder als Grundlage für Primärzellkulturen verwendet. Weiter wurden, auch aus Gründen der Schonung von Versuchstieren, mehrere Sammelrohr-Zelllinien auf ihre Versuchstauglichkeit geprüft. Anschließend wurden Primärzellkulturen von Nebennierenzellen hinsichtlich einer dort vermuteten lokalen Reninsynthese untersucht.

### II. Methoden und Material

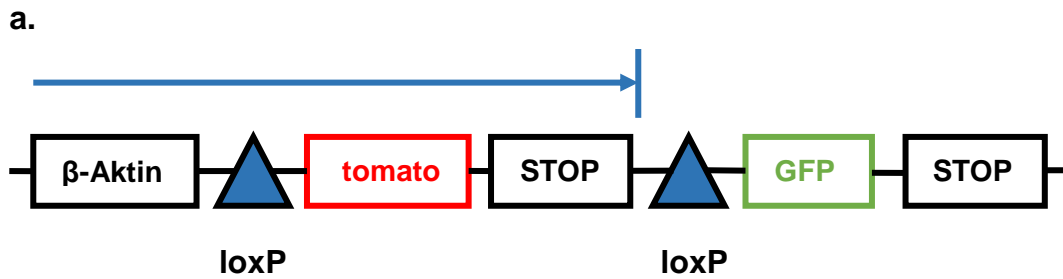
#### 1. Mikrodissektion von Sammelrohren und Anlage einer Primärkultur

Als Grundlage für ein Zellkulturmodell sollte zunächst eine murine Primärkultur aus frisch isolierten Sammelrohrzellen etabliert werden. Hierzu war es notwendig, Sammelrohre in den Nieren zu identifizieren, um diese aus dem Zellverband möglichst ohne andere Nephronbestandteile isolieren zu können. Nach einem enzymatischen Verdauungsprozess zeigten sich im Versuchsansatz unter dem Mikroskop die einzelnen Komponenten eines Nephrons, wie auch interstitielle Nierenzellen. Anhand von morphologischen Merkmalen wie etwa der „Verzweigungen“, die Sammelrohre typischerweise zeigen, ist es möglich diese zu identifizieren und von anderen tubulären Strukturen abzugrenzen. Bei den Versuchen zeigte sich jedoch, auch abhängig von der Gewebemenge und des aktuellen Fortschritts des Verdauungsprozesses, dass die Zuordnung der, in der Mikroskopie erkennbaren Gewebefragmente, zu den einzelnen Nephronabschnitten nicht immer sicher möglich war.

Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche genetisch veränderte Mäuse verwendet, die das Markerprotein GFP ausschließlich in ihren Sammelrohren exprimierten, welche dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sicher erkannt werden konnten. Hierbei handelte es sich um Mäuse mit dem Genotyp Aquaporin-2-Cre<sup>+</sup>/Tomato. Für die DNA-Rekombination waren diese Versuchstiere mit Hilfe des Cre/loxP-Systems gentechnisch verändert worden. Die Cre-Rekombinase stammt aus einem Coliphagen und stellt die „Genschere“ für die Rekombination dar, indem dieses Enzym spezifisch an palindromischen DNA-Sequenzen, den sogenannten lox-sites, schneidet. Diese lox-sites stellen die Zielstrukturen für die Cre-Rekombinase dar, die auch gentechnisch mittels Vektoren in der Säugetier-DNA etabliert werden müssen. Wird nun ein Gen durch diese lox-sites beidseitig flankiert, so wird dieses Gen sobald die Cre-Rekombinase exprimiert wird, aus der Kontinuität des DNA-Strangs herausgeschnitten und damit auch nicht mehr transkribiert [81]. Abhängig von der Expression der Cre-Rekombinase kann somit die Rekombination auch zell- bzw. gewebespezifisch erreicht werden.

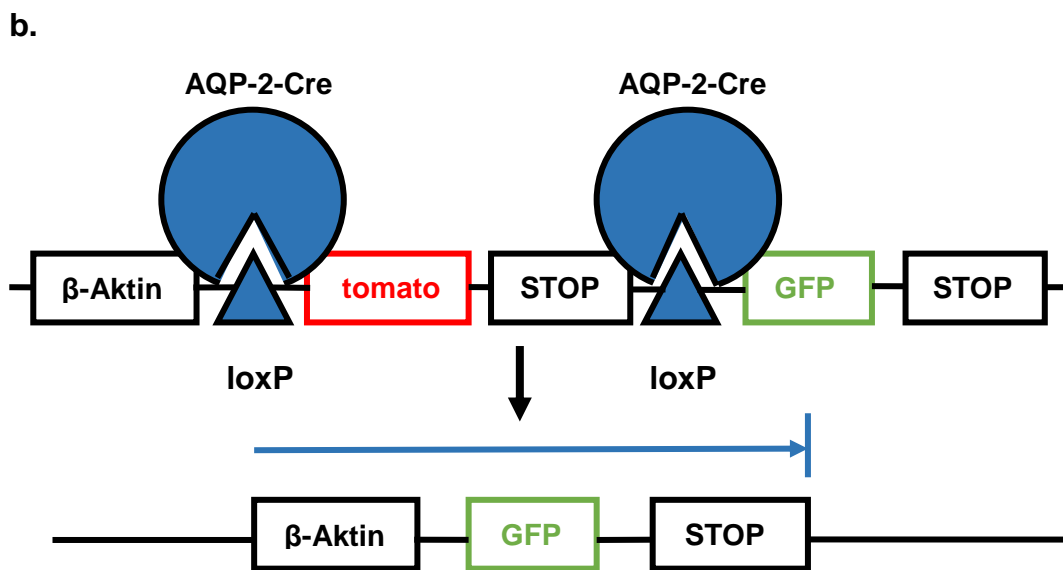
## **Methoden und Material**

Hierfür ist es entscheidend die Cre-Expression mit Promotoren von Genen zu koppeln, welche typischerweise in dem entsprechenden Zielgewebe aktiv sind. Diese zentrale Eigenschaft einer zellspezifischen Rekombination wird bei den Versuchstieren (Aquaporin-2-Cre<sup>+</sup>/Tomato) durch die kombinierte Expression von Aquaporin-2 und Cre erreicht und führt zur spezifischen Rekombination im Sammelrohr. Durch die Insertion der Cre in das Aquaporin-2 Gen steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Aquaporin-2-Promotors, der typischerweise in den Sammelrohrzellen aktiv ist. Zudem wurden zwei Marker-Gene in Tandem-Anordnung (td Tomato und GFP) ins Genom eingebracht, wobei das Tomato-Gen gefloxt wurde. Wird die Cre-Rekombinase in den Sammelrohren exprimiert, wird Tomato entfernt und das downstream liegende GFP exprimiert. Sammelrohre, bzw. deren Fragmente leuchten nun in der Fluoreszenzmikroskopie grün und können so identifiziert werden.



Ohne Rekombination (Zellen die AQP-2 nicht exprimieren):

➔ Expression von Tomato (alle Zellen rot)



Rekombination in AQP-2 exprimierenden Sammelrohrzellen:

Exzision der von loxP flankierten Gene;

➔ Expression von GFP

(Zellen mit AQP-2-Cre fluoreszieren grün, alle anderen Zellen rot)

Abb. 4: Darstellung der Rekombination bei mT/mG-Reportermausen

## Methoden und Material

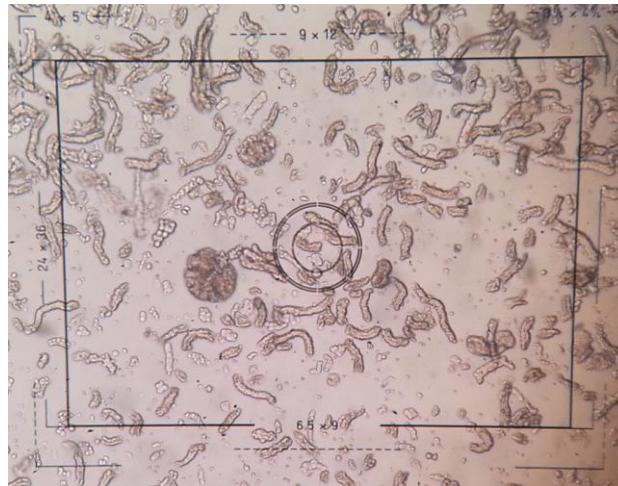
Zur Gewinnung von Sammelrohrzellen und zur Anlage einer Primärkultur wurden, nach zuvor erfolgter CO<sub>2</sub>-Narkose und Genickbruch, beide Nieren von Aquaporin-2-Cre+/Tomato-Reportermausen entnommen. Anschließend wurden die Nierenkapseln entfernt und die Nieren mit einem Skalpell der Länge nach in Scheiben geschnitten. Durch diese radiär verlaufende Schnittführung wird gewährleistet, dass die Nephronkomponenten, insbesondere die Sammelrohre, als zusammenhängende Strukturen erhalten bleiben. Hierbei zeigte sich, beim Längsschnitt am Nierenhilus, das weißlich schimmernde, innere Nierenmark, welches über eine besonders hohe Sammelrohrdichte verfügt.

Die Nierenscheiben wurden hierauf in ein, für den enzymatischen Verdau vorbereitetes, Glasgefäß gegeben und mit 2 ml einer Verdaulösung für 20 min im Wärmebad bei 37 °C inkubiert. Die Verdaulösung setzte sich aus 1,2 mg Trypsin-Inhibitor, 9,4 mg Glycin und 13 mg Collagenase Typ II zusammen. Gelöst wurden diese Bestandteile in 25 ml MEM-Puffer. Anschließend wurde diese Verdaulösung zur Vermeidung einer mikrobiellen Kontamination steril filtriert.

Nach den ersten 20 min des Verdauvorgangs wurde die Verdaulösung mit den darin enthaltenen Nierenfragmenten, die bereits enzymatisch aus dem renalen Gewebeverband herausgelöst waren, abpipettiert und in gekühlte BSA-Lösung (2 ml Bovines-Serum-Albumin) überführt. Hierbei handelte es sich um eine 0,1 prozentige BSA-Lösung in MEM-Puffer. Durch die Kühlung des Reaktionsansatzes konnte die weitere enzymatische Zersetzung des Nierengewebes stark gedrosselt werden.

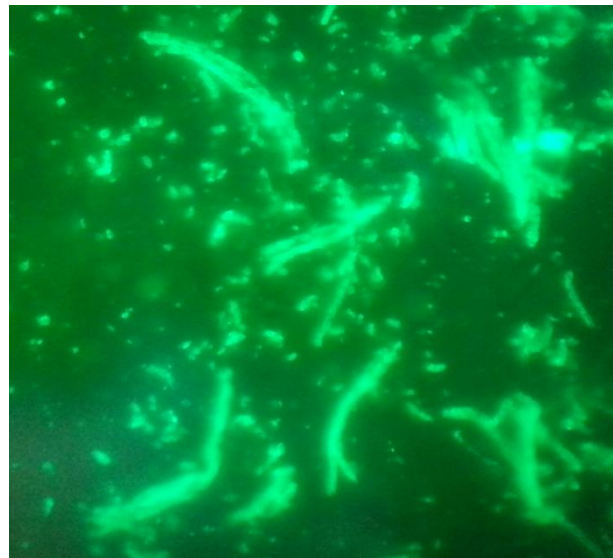
Nachdem die erste Verdaulösung abgenommen war, wurde der Verdauansatz „erneuert“, indem 2 ml einer frischen Enzymlösung zu den bereits „anverdauten“ Nierenscheiben gegeben wurde. Diese Enzymlösung wurde für eine Reaktionszeit von nun 10 Minuten im Verdauläschen belassen, bevor sie, wie bereits geschildert, wieder abgenommen und die herausgelösten Nierenfragmente in eine gekühlte BSA-Lösung überführt wurden. Dieses Vorgehen wurde sieben Mal wiederholt, sodass die Nieren ca 70-90 Minuten einer Verdaulösung ausgesetzt waren, wobei diese zunächst nach 20 Minuten, später alle 10 Minuten erneuert wurde.

Zwischenzeitlich wurde der abgenommene Verdau mikroskopiert.



**Abb. 5: Nierenverdau unter dem Mikroskop**

(zu sehen sind Nierenkörperchen und fragmentierte Tubulussegmente)



**Abb. 6: Nierenverdau mit GFP-markierten Sammelrohrzellen unter dem  
Fluoreszenzmikroskop**

(im Vergleich zu Abb. 5 ist nun eine eindeutige Identifizierung der Sammelrohre möglich)

## Methoden und Material

Unter Sicht wurden, mittels einer Glaspipette an der ein feinstes Draht befestigt war, die grün-fluoreszierenden Sammelrohre identifiziert und der Verdauung entnommen. Anschließend wurden die Sammelrohre zunächst unter mikroskopischer Sicht von den anderen tubulären Bestandteilen des Nephrons getrennt. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, keine Glomerula, die mit ihren juxtaglomerulären Zellen bekanntermaßen große Mengen an Renin produzieren, mit zu entnehmen. Sobald mit den haarfeinen Instrumenten Sammelrohre im Verdau isoliert und auch separiert werden konnten, wurde der „Sammelrohrhaufen“ mittels einer 1 µl-Pipette aus dem Verdau entfernt. Die Sammelrohre wurden dann bis zur Kultivierung in einem Cup mit 500 µl gekühltem PBS-Puffer gesammelt.

Abhängig von der Einwirkdauer der Enzymlösung auf die Nieren, zeigten sich beim Mikroskopieren verschiedene Herausforderungen. Waren bei frühen Durchgängen oftmals noch keine tubulären Strukturen zu sehen, zeigten sich bei späteren Ansätzen oftmals sehr viele, teils hochgradig fragmentierte, tubuläre Strukturen. In dieser Untersuchungsphase wäre ein Erkennen der Sammelrohre, rein anhand morphologischer Kriterien, nur sehr schwer möglich gewesen. Die Markierung der Sammelrohre mit GFP war hier enorm hilfreich.

Nach Abschluss des Sammelvorgangs wurden die Sammelrohrzellen zur Anlage einer Primärzellkultur auf 24er-Well-Platten ausgesät. Als Kulturmedium diente ein DMEM F12 Medium mit 1 % ITS (Insulin-Transferrin-Selen), 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % FCS, Trijodthyronin in einer Konzentration von 10 nM sowie Dexamethason in einer Konzentration von 0,2 µg/ml. Die Sammelrohrzellen wurden in diesem Kulturmedium resuspendiert und auf einer 24er-Well-Platte, verteilt auf 4 Wells ausgebracht. Hierbei wurden die Sammelrohrzellen in 2 Wells mit Angiotensin II stimuliert. Dabei galt es eine Konzentration von 100 nM Angiotensin II im Stimulationsansatz zu erreichen. Um diese Konzentration möglichst konstant zu halten wurde das Stimulationsmedium im Abstand von 12 Stunden erneuert. Zwei Wells blieben als Kontrollgruppe unstimuliert.

Im Rahmen dieser Versuche zeigten sich Unregelmäßigkeiten im Anwachsen der Zellen bzw. bei der Bildung eines Zellrasens in der Kultur. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Kulturbedingungen getestet, wie etwa die Verwendung von Petrischalen oder auch 12er-Well-Platten, wobei die Aussaat der Sammelrohrzellen auf 2 Wells einer 24er-Well-Platte letztendlich bevorzugt wurde.

## **Methoden und Material**

Darüber hinaus wurden die Versuchsreihen dadurch beeinträchtigt, dass es häufig zu Kontaminationen der Kulturen kam und diese durch ein Pilzwachstum unbrauchbar wurden. Zeitweise wurde deshalb auch Fluconazol zur antimykotischen Behandlung zugesetzt.

Nach der Stimulationsphase, die zwischen 10 und 20 Tagen lag, wurden die Zellen mit Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) geerntet. Hierauf schlossen sich die RNA-Isolation sowie deren Vermessung, die reverse Transkription und die real-time-PCR an. Diese Verfahren werden später beschrieben.

### **2. Mikrodissektion von Sammelrohren und Isolation des inneren Marks**

Ein weiterer Versuchsansatz bestand in der Mikrodissektion von Sammelrohren aus dem äußeren Nierenmark und aus der Nierenrinde. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen auf einer für die Zellkultur geeigneten Werkbank gearbeitet. Das Nierenmark, welches sich durch eine sehr hohe Sammelrohrdichte auszeichnet, musste vorher entnommen werden. Dazu erfolgte nach vorausgegangener Nierenentnahme und anschließender Entfernung der Nierenkapsel, mittels einer Skalpellklinge ein Längsschnitt durch den Nierenhilus.

Wird die Niere dann in zwei Hälften aufgeklappt, zeigt sich eine weißlich schimmernde Gewebeformation, die sich zum Pyelon hin verjüngend zuspitzt. Hierbei handelt es sich um das innere Nierenmark, in welchem sich die Sammelrohre auf ihrem Weg zum Pyelon hin bündeln. Dieses innere Mark wurde im Gesamten entfernt und sogleich in 500 µl Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) überführt und zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren.

Das äußere Nierenmark und der Kortex wurden nach dem oben bereits beschriebenen Schema einem Verdau unterzogen und die Mikrodissektion von Sammelrohren durchgeführt.

Dieser Versuchsansatz hatte jedoch nicht das Ziel, eine Primärkultur zu etablieren. Es sollten die Sammelrohre hinsichtlich ihrer Genexpression in vivo untersucht werden. Deshalb wurden auch die aus dem Verdau isolierten Sammelrohre zur weiteren RNA-Isolation in Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) resuspendiert.

Um eine sichere Identifikation von Sammelrohren unter dem Fluoreszenzmikroskop zu gewährleisten, wurden bei dieser Mikrodissektion ebenfalls GFP-Reportermäuse (Aquaporin-2-Cre+/Tomato) verwendet.



## **Methoden und Material**

Nach dem Aufbrechen der Plasmamembran der in Trizol schwimmenden Sammelrohrzellen schloss sich die RNA-Isolation an. Im weiteren Verlauf erfolgte die real-time PCR zur Quantifizierung der Genexpression in den Sammelrohrzellen.

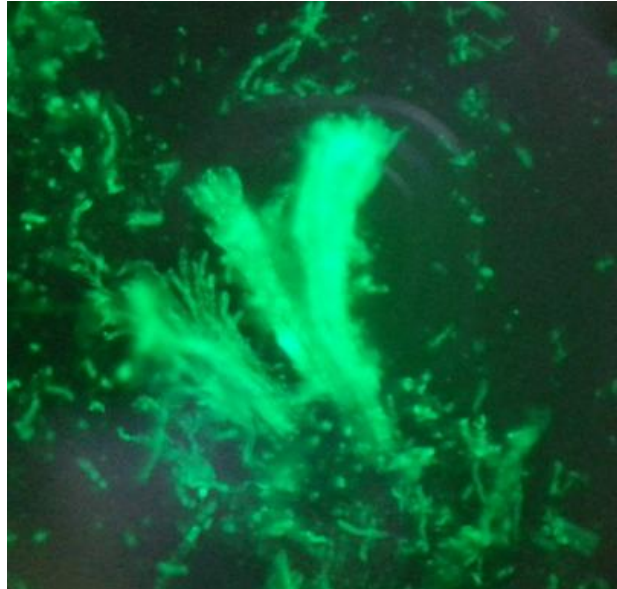
Im Fokus der Untersuchung stand sowohl hier als auch bei den Mikrodissektionsversuchen mit Anlage einer Primärkultur und in vitro-Stimulation der Sammelrohrzellen die Synthese von Renin und dessen Regulation unter dem Einfluss von Angiotensin II als Ausdruck eines lokal wirkenden, gewebeständigen RAS.

### **3. Primärkultur aus Zellen des inneren Nierenmarks (IMCD-Primärkultur)**

Ein weiterer Ansatz war es, die Sammelrohrzellen aus dem inneren Nierenmark, welches sich durch eine sehr hohe Sammelrohrdichte auszeichnet, für die Primärkultur zu gewinnen. Der Vorteil dieses Vorgehens sollte darin liegen, durch die Entnahme einer makroskopischen Gewebeformation eine höhere Sammelrohrzellmenge zu gewinnen, welche die erfolgreiche Anlage einer Primärzellkultur erleichtern würde. Hierzu wurde das innere Nierenmark einer GFP-Reportermaus, wie bereits beschrieben, entnommen.

In der Regel wurde das innere Nierenmark beider Nieren verwendet und in eine Gewebekulturschale mit einer kleinen Menge PBS-Puffer überführt. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem entnommenen Gewebe um das sammelrohreiche innere Nierenmark handelte, wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei zeigten sich die präparierten Medullen grün fluoreszierend mit dicht gepackten Sammelrohren.

Das Gewebe des inneren Nierenmarks wurde anschließend, zur Erleichterung des darauffolgenden enzymatischen Verdauens, mit einer Skalpellklinge fein zerteilt. Die Verdauung setzte sich aus Kollagenase Typ II in einer Konzentration von 2,2 mg/ml sowie Hyaluronidase in einer Konzentration von 2 mg/ml zusammen. Zur Vermeidung einer Kontamination der späteren Primärkultur wurden die Enzyme in PBS-Puffer gelöst und steril filtriert.



**Abb. 7: Darstellung der mit GFP markierten Sammelrohre des inneren Nierenmarks unter dem Fluoreszenzmikroskop**

Nach Zerteilung der Medullen und Bereitstellung der Enzymlösung wurde mittels einer gekürzten Pipettenspitze die PBS-Zellsuspension aufgenommen, in ein Falcon überführt und dort der Enzymlösung ausgesetzt. Der Verdauansatz wurde für ca. 1,5 Std. im Schüttelwasserbad bei 220 U/min belassen. Um eine möglichst homogene Suspension zu erhalten, erfolgte nach ca. 45 min sowie nach Ablauf der Verdauungszeit das Auf- und Abpipettieren der Gewebesuspension. Anschließend wurde der Verdauansatz für 5 min zentrifugiert (2400 U/min, Raumtemperatur). Das hierauf entstandene Zellpellet wurde durch Resuspension mit PBS-Puffer gewaschen und nochmals in gleicher Weise zentrifugiert, um anschließend erneut mit PBS-Puffer gewaschen zu werden. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Puffer abgenommen und die Zellen mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Das Medium setzte sich aus 500 ml DMEM mit 5 % FCS, 1 % Penicillin und Streptomycin zusammen. Zur Erhöhung der Osmolarität des Kulturmediums wurden außerdem 2,92 g NaCl, 3 g Harnstoff und 1,75 g Glukose zugesetzt. Um in vitro eine Selektion der Sammelrohrzellen zu erreichen, lag die Zielosmolarität bei 600 mosmol/l.

## Methoden und Material

Die Sammelrohrzellen sind im inneren Nierenmark physiologisch von einem hyperosmolaren Milieu umgeben und besitzen somit eine hohe osmotische Resistenz. Für Zellen mit einer geringeren Widerstandsfähigkeit wären die Kulturbedingungen ungeeignet.

Um die Bildung eines adhärenenten Zellrasens zu fördern, wurden die Wells zwischenzeitlich auch mit einer Kollagen-B-Schicht benetzt. Auch hier erfolgte die Stimulation der IMCD-Zellen mit einer 100 nM Angiotensin II-Lösung.

Die Ernte der Zellen erfolgte mit 500 µl Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) und es folgten zur Quantifizierung der Reninexpression der IMCD-Zellen in der Zellkultur erneut die Schritte von der RNA-Isolierung bis hin zur real-time-PCR. Neben Renin und den Housekeeping-Genen,  $\beta$ -Aktin und RPL32, wurde auch die Transkription des sammelrohrspezifischen „Markergens“ Aquaporin-2 quantifiziert.

### 4. M1-Sammelrohrzelllinie

Aufgrund des hohen Zeit- und Materialaufwands und dem damit einhergehenden Verbrauch an Versuchstieren für die Kultivierung der Primärzellen wurde auch untersucht, ob auch immortalisierte Zelllinien aus Sammelrohren Renin exprimieren. Die murine Sammelrohrzelllinie M1 wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kunzelmann (Institut für Physiologie der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Um eine möglichst dauerhafte Teilungsbereitschaft der Zellen *in vitro* aufrecht zu erhalten, ist deren Immortalisierung notwendig. Deshalb erhielt das Genom der Mäuse, aus denen die Sammelrohre entnommen wurden, das Genom des „SV40-Virus“ (Simian Virus 40) [89]. Insbesondere die Expression des „SV40 large T antigen“ induziert auf DNA-Ebene die Verlängerung der Lebensspanne (Immortalisierung) [77, 99].

Nach dem Auftauen der in einem DMSO-haltigen Medium kryokonservierten Zellen wurden zunächst 3-4 ml des für die Zellkultur angesetzten Mediums hinzugegeben. Als Kulturmedium diente DMEM/F12, dem für einen fünfprozentigen Anteil FCS und für einen einprozentigen Anteil Penicillin und Streptomycin beigesetzt wurde.

## Methoden und Material

Es folgte die Zentrifugation der Zellsuspension (2400 rpm / 20 °C / 4 min) zum Abscheiden der Zellen als Pellet am Boden des Falcons. Anschließend wurde der DMSO-Medium-Überstand abgenommen und das Pellet mit 20 ml Medium resuspendiert. In einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurde die Zell-Medium-Suspension zur weiteren Kultivierung ausgebracht. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 48 Stunden, wobei das verbrauchte Medium abpipettiert und durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. Bereits nach ein bis zwei Tagen konnte ein Anwachsen der Zellen am Layer der Zellkulturflaschen beobachtet werden. Nach wenigen Tagen war ein konfluentes Wachstum festzustellen. Nun erfolgte das „Splitten“ bzw. Passagieren der Zellen, idealerweise noch im subkonfluenten Stadium. Hierzu wurde der Zellrasen mit 10-20 ml einer auf 37 °C erwärmten PBS-Pufferlösung gewaschen, um Medium- und damit Serumreste zu entfernen, da diese die enzymatische Aktivität der im Anschluss zum Ablösen der Zellen hinzugegebenen Trypsin/EDTA-Lösung herabsetzen würden [40].

Nun wurde der Zellrasen mit ca. 5 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin/ EDTA-Lösung benetzt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Der Ablösevorgang der Zellen von der Zellkulturflasche wurde im inversen Mikroskop verfolgt. Oftmals war ein auf- und abpipettieren notwendig um den Ablösevorgang mechanisch zu unterstützen. Sobald sich die Zellen mikroskopisch frei schwimmend und kugelig darstellten, war der Ablösevorgang abgeschlossen. Die Trypsin-Zellsuspension wurde abpipettiert und in ein 50 ml Falcon mit ca. 10 ml vorgelegtem Kulturmedium gegeben. Durch das im Medium enthaltene FCS wurde die Trypsin-Wirkung bereits abgeschwächt. Weiter erfolgte die Zentrifugation bei 2400 rpm über 4 min bei 20 °C, sodass sich die Zellen von der Trypsinlösung als Sediment abschieden.

Nach der Resuspension des Zellpellets im Kulturmedium konnten die Zellen zum einen kryokonserviert, zum anderen in neuen Zellkulturflaschen als Subkulturen weiter passagiert oder auch für die folgenden Stimulationsversuche auf Well-Platten ausgebracht werden.

Darüber hinaus wurde auch das Kulturmedium im Rahmen der M1-Sammelrohrzell-Versuche modifiziert. So wurde das beschriebene Kulturmedium (5 % FCS, 1 % Penicillin und Streptomycin) um 1 % Insulin-Transferrin-Selen und 20 µl Dexamethason pro 500 ml Medium erweitert.

## Methoden und Material

Nach den Arbeitsschritten der Kultivierung folgte nun auch die Stimulation mit Angiotensin II. So war es, wie auch bei den vorab durchgeführten Versuchen mit primären Sammelrohrzellen, ein Schwerpunkt, die vermuteten, regulativen Effekte des Angiotensin II auf das intrarenale RAS an einem *in vitro*-Zellmodell zu untersuchen. In diesem Zusammenhang diente dieser Versuchsansatz dazu, die mögliche Stimulation der Reninsynthese in den Sammelrohrzellen durch Angiotensin II im Zellkulturmodell nachvollziehen zu können, um anschließend die intrazellulären Signalwege, die in den Tubuluszellen, im Gegensatz zu den JG-Zellen, eine Stimulation der Reninbildung vermitteln, identifizieren zu können.

Hierzu wurden die Zellen in Form einer Zell-Medium-Suspension zu gleichen Teilen auf eine 12er-Well-Platte ausgebracht. Die Well-Platten waren pyrogen- wie auch DNase- und RNase frei, mit einer Fläche von 3,9 cm<sup>2</sup> je Well. Abhängig vom Versuchsprotokoll, in dem die Stimulationsdauer variiert wurde, schloss sich in der Regel 24 Stunden nach dem Aussäen die Stimulation mit Angiotensin II an. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen stets eine Adhärenz. Der Zeitraum, in dem die Stimulation der Zellen durchgeführt wurde, erstreckte sich meist über 2-4 Tage. Dabei wurde die Stimulationslösung jeweils nach 12 Stunden erneuert, um eine möglichst konstante Konzentration des Angiotensin II im Kulturmedium der Stimulationsgruppe zu gewährleisten. Der Versuchsaufbau beinhaltete die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II (10 und 100 nM) sowie die synchrone Kultivierung einer Kontrollgruppe, welche bis auf das Fehlen der Stimulation mit Angiotensin II identischen behandelt wurde.

Nach der entsprechenden Stimulationsdauer erfolgte die „Ernte“ der Zellen, um diese hinsichtlich der Renin-mRNA Expression semiquantitativ untersuchen zu können. Dies lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Veränderung der Genexpression der M1-Sammelrohrzelllinie unter Angiotensin II-Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Hierzu wurde das Kultur- bzw. Stimulationsmedium abgenommen und die Zellen mit 500 µl Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) je Well bedeckt. Dies führte einerseits zu einer Lyse der Plasmamembran, damit zu einer Freisetzung der RNA und nukleären DNA sowie andererseits zu einer Inaktivierung vorhandener RNasen oder DNasen. Aus dem gewonnenen Zelllysat konnte nun in weiteren Extraktionsschritten die mRNA isoliert werden. Das TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>-Zelllysat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

### 5. mpkCCD-14-Zelllinie

Bei der mpkCCD-14-Zelllinie handelt es sich ebenfalls um eine murine Sammelrohrzelllinie. Die Immortalisierung der, im Speziellen kortikal gelegenen Sammelrohrzellen, wurde analog zu den M1-Zellen durch das Einbringen des SV40 Genoms in die murine DNA erreicht [6]. Die Handhabung der mpkCCD-14-Zellen unterscheidet sich von der obigen Beschreibung für M1-Zellen nur in der Verwendung eines anderen Zellkulturmediums. So setzte sich das Medium für die mpkCCD-14-Zellen aus 250 ml DMEM, 250 ml Ham's F12, 1 % Insulin-Transferrin-Selen, 25 µl Dexamethason, 5 µl Trijodthyronin, 50 µl epidermal growth factor, 5 % FCS, 10 % Glukose sowie 1 % Penicillin und Streptomycin zusammen.

Wie auch die M1-Zellen wurden die mpkCCD-14-Zellen als Subkulturen nach dem Passagieren kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen nach dem enzymatischen Ablösen vom Wachstumslayer mittels Trypsin/EDTA zunächst von der Trypsinlösung durch eine Zentrifugation getrennt. Weiter erfolgte die Resuspension des sich nun am Boden eines Falcon-Tubes abscheidenden Zell-Pellets in einer für die Kryokonservierung geeigneten Lösung. Diese bestand aus dem entsprechenden Kulturmedium, welchem DMSO in einer zehnpromzentigen Konzentration zugesetzt war. Anschließend erfolgte dann die Aufbewahrung bei -80 °C oder die langfristige Konservierung in flüssigem Stickstoff.

Wie bei den M1-Zellen, war auch bei den mpkCCD-14-Zellen das Ziel, diese nach dem Kultivieren und Anzüchten auf Well-Platten auszubringen, um die geplanten Stimulationsversuche durchführen zu können. In Analogie zu den immortalisierten M1-Sammelrohrzellen war es auch bei den Stimulationsversuchen mit den mpkCCD-14-Zellen die zentrale Zielsetzung, den Einfluss von Angiotensin II hinsichtlich der Reninsynthese und -regulation auf zellulärer Ebene zu untersuchen. So wurden identische Arbeitsweisen bezüglich des Passagierens der Zellen, wie auch des Kultivierens und der Stimulation mit Angiotensin II angewendet. Auch die Stimulationsfrequenz glich den vorausgegangenen M1-Zellkulturversuchen.

Als wesentliche Variation im Versuchsablauf wurde in einigen Experimenten versucht, die Zellen einer längeren Stimulationsphase auszusetzen, sodass bereits in der Phase des Passagierens eine Stimulation mit Angiotensin II erfolgte.

## Methoden und Material

Hierzu wurde das Zellkulturmedium bereits ab dem Zeitpunkt der Aussaat der Zellen in Kulturflaschen mit Angiotensin II versetzt. Eine Stimulation der Zellen erfolgte nun sowohl in den Zellkulturflaschen bis in den (sub-)konfluenten Zustand als auch wie bisher in den 12er-Well-Platten. Die Konzentrationen der Stimulationsmedien blieben hierbei konstant (0 nM, 10 nM, 100 nM Ang II). Außerhalb dieses Versuchsaufbaus mit verlängerter Stimulationsdauer wurden die Zellen, wie auch zuvor die M1-Zellen nach der Aussaat auf 12er-Well-Platten für ca. 2-3 Tage stimuliert. Dabei wurde das Stimulationsmedium alle 12 Stunden erneuert, um anschließend in gleicher Weise wie die M1-Zellen zur Extraktion der mRNA und deren quantitativer Untersuchung geerntet zu werden.

### 6. mRNA-Isolierung

Der Umgang mit RNA wird durch die mögliche, aber zu vermeidende, Kontamination des Ansatzes mit RNasen geprägt. Anders als die DNA ist die RNA instabiler, sie kann durch ubiquitär vorkommende RNasen enzymatisch abgebaut werden. Eine Kontamination kann durch das Tragen von Einmalhandschuhen und der Verwendung von RNase-freien Arbeitsmaterialien verhindert werden. Außerdem wurde für die Versuchsansätze Wasser verwendet, welches mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde und der Inaktivierung der RNasen dient.

Neben der Vermeidung einer Kontamination war das kontinuierliche Kühlen der Lösungen und Ansätze ein wirksames Mittel um die Enzymaktivität der RNasen zu reduzieren.

Im Rahmen der Ernte der Zellen wurden diese mit Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) behandelt und das Gemisch in Cups überführt. Dabei bewirkt Trizol eine Lyse der Plasmamembran, die Freisetzung der RNA und nukleären DNA sowie auch eine Inaktivierung eventuell vorhandener RNase-Aktivität. Die weitere Isolation der RNA erfolgte unter Kühlung der Cups in Aluminiumblocks, die auf Eis gelegt wurden. In der Fortsetzung wurde die RNA-Isolation nach dem Prinzip der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi [40] durchgeführt. So wurden bei 500 µl Trizol jeweils 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Cups wurden daraufhin manuell für ca. 15 Sekunden geschüttelt und der Inhalt gut durchmischt. Nach einer kurzen Inkubationsphase erfolgte die Zentrifugation (12.000 g, 15 min) in einer auf 2-8 °C gekühlten Zentrifuge mit dem Ziel der Phasenseparation.

## Methoden und Material

Dadurch enthält die oberste wässrige Phase die zu extrahierende DNA, in einer Zwischen- oder Interphase scheidet sich die DNA ab und in der unteren sogenannten Phenol-Phase finden sich Proteine [40].

Ausschließlich die oberste, RNA-haltige, Phase wurde dann in ein separates Cup überführt. Dieser Phase wurde nun wahlweise zur ertragreicheren RNA-Fällung, insbesondere bei zu erwartenden quantitativ niedrigen RNA-Mengen, Glykogen (3 µl einer Glykogenlösung der Konzentration 2 µg/µl) zugegeben. Mit jeweils 250 µl reinem Isopropanol konnte nun die RNA präzipitiert und ausgefällt werden. Auf eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Zentrifugation (12.000g, 20-30 min, 2-8 °C). Das RNA-haltige Präzipitat ist nun am Boden des Cups als Pellet zu erkennen. Vorsichtig war nun der Überstand abzunehmen und das Pellet wurde in 500 µl, 75 %igen Ethanol resuspendiert und gewaschen. Nach einem kurzen Vortex-Vorgang und einer weiteren Zentrifugation (7.500g, 4 °C, 5min) schied sich erneut ein RNA-Pellet am Boden des Cups ab. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde die isolierte RNA 5-10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in einem ThermoMixer® bei 55-60 °C 10 Minuten lang inkubiert. Nun konnten die Cups mit der entsprechenden RNA bei -80 °C aufbewahrt werden.

### 7. Photometrische Messung der mRNA-Konzentration und reverse Transkription

Um eine mögliche Regulation der Renin mRNA feststellen zu können, sollte eine real-time-PCR durchgeführt werden. Dazu musste zunächst die isolierte Gesamt-mRNA durch reverse Transkription in eine complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Um dabei jeweils die gleiche Menge an Ausgangs-mRNA einzusetzen, wurde zunächst die Konzentration der RNA in den Ausgangsproben photometrisch bestimmt. Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Photometers (NanoDrop Spektrophotometer PeqLab) durch die Vermessung von 2 µl DEPC-Wasser zur Bestimmung des Leerwertes. Weiter wurde dann die RNA-Lösung der Cups vermessen. Hierfür wurden jeweils 2 µl der Proben eingesetzt. Photometrisch wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die RNA-Konzentration der Probe bestimmt. Rechnerisch wurde die Konzentration über die optische Dichte sowie über die Extinktion ermittelt. Hieran schloss sich die reverse Transkription an, um die RNA in eine für die real-time-PCR geeignete cDNA umzuschreiben. Ziel war es, 2 µg RNA in eine cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben, wobei sich die Mengenverhältnisse während der reversen Transkription nicht veränderten und



## Methoden und Material

somit ein Rückschluss auf die Transkriptionshäufigkeit eines Gens möglich war. Über den Zusammenhang  $V=m/\beta$  ( $V \rightarrow$  Volumen,  $m \rightarrow$  Masse,  $\beta \rightarrow$  per Photometrie bestimmte Massenkonzentration) konnte nun das Probenvolumen  $V$  bestimmt werden, um identische RNA-Massen in die reverse Transkription einzusetzen, meist 2  $\mu\text{g}$ . In einem gekühlten Cup wurde die RNA-Lösung zusammen mit je 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)15 Primer [0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] zusammengegeben und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Primer legen den Bereich fest, der durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) umgeschrieben wird. Hier wurde ein Primer gewählt, der an den endständigen Poly-A-Bereich eukaryontischer mRNA bindet bzw. hybridisiert und damit ein spezifisches Umschreiben der mRNA ermöglicht [40]. Diese mRNA wird hierbei als Matrize für den Aufbau einer cDNA, durch die reverse Transkriptase, verwendet. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für eine Dauer von 5 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend kommt es beim Abkühlen zu einer Anlagerung der entsprechenden mRNA-spezifischen Primer.

Nach der Hybridisierung der Primer wurde der Reaktionsansatz wieder auf Eis gestellt und ein sogenannter Master-Mix für die weitere reverse Transkription vorbereitet. Diese Mischung bestand aus den noch fehlenden Enzymen und Substraten für die RT-PCR. So bestand der Master-Mix pro Reaktionsansatz aus jeweils 4  $\mu\text{l}$  eines 5x First Strand Buffer als Pufferlösung zur Schaffung eines entsprechenden Reaktionsmilieus, jeweils 4  $\mu\text{l}$  dNTPs (2,5 mM) als Substrat zum komplementären Aufbau der cDNA sowie je 1  $\mu\text{l}$  einer M-MLV-reversen Transkriptase (Moloney murine leukemia virus-RT) und 3  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser. Somit ergibt sich ein Master-Mix mit einem insgesamten Volumen von 12  $\mu\text{l}$  pro Reaktionsansatz, der in die entsprechenden Cups (diese enthalten bereits wie oben beschrieben die RNA mit den daran gebundenen Primer) pipettiert wurde.

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde im Thermocycler (Labcyler SENSOQUEST, Göttingen) inkubiert. Dabei erfolgten die enzymatische Reaktion und die Synthese der cDNA. Die Reaktion wurde hierauf durch das Erhitzen des Ansatzes auf 94 °C gestoppt, da die reverse Transkriptase als Protein bei diesen Temperaturen denaturiert. Die nun synthetisierte cDNA ist wesentlich stabiler als die RNA und kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 8. Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTqPCR)

Ziel war es, die Transkriptionshäufigkeit, d.h. die Expression des Renin-Gens in An- und Abwesenheit eines Angiotensin II-Stimulus quantitativ zu bestimmen. Hierfür bedient man sich einer sog. RTqPCR. Auch einer modernen RT-PCR liegt als Prinzip eine Polymerase-Kettenreaktion zugrunde, wie sie von Kary Mullis im Jahre 1983 entwickelt wurde. Ein gewünschtes DNA-Molekül, mit den entsprechenden Primern als Vorlage „markiert“ (Template), wird enzymatisch durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt. Bei ca. 95 °C erfolgt die Auftrennung (Denaturierung) der DNA-Doppelstränge. Hierauf folgt die Anlagerung der Primer an das entsprechende Template (Annealing). Bei 72 °C, der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase kommt es nun zur Amplifikation des entsprechenden Templates. Als Substrat dienen bereits anfangs zugesetzte Nukleotide [40].

Das Verfahren der RTqPCR, welches verwendet wurde um den ursprünglich in der Zelle vorliegenden Gehalt einer bestimmten mRNA und damit die Genexpression quantifizieren zu können, basiert auf der PCR von Mullis, welche aber um weitere essentielle Bestandteile modifiziert werden musste. Eine, durch Verwendung entsprechender Primer, ausgewählte DNA-Sequenz (Template) wird amplifiziert. Abhängig von der ursprünglichen cDNA- bzw. mRNA- Menge erreicht die DNA-Menge im Reaktionsansatz schneller oder auch langsamer einen bestimmten Gehalt. Je höher die primär im Reaktionsansatz vorhandene cDNA-Menge desto früher wird bei der PCR eine bestimmte Schwellenkonzentration erreicht und desto weniger Amplifikationszyklen werden benötigt. Mittels SYBR® Green kann nun die DNA-Amplifikation verfolgt werden. SYBR® Green lagert sich als Fluoreszenzfarbstoff in die doppelsträngige DNA ein und fluoresziert wenn es mit Licht angeregt wird.

„Die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus ist also direkt proportional zur Zunahme der zu amplifizierenden DNA“ [40].

Nach einer bestimmten Anzahl von Amplifikationszyklen entsteht ein Fluoreszenzsignal, das intensiv genug ist, um vom LightCycler® detektiert zu werden. Diese Zykluszahl stellt den sogenannten Crossing Point (CP) dar. Aus den zu untersuchenden Proben wurden auch kleine Mengen (jeweils 3 µl) entnommen und in einem Cup gesammelt. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:3, 1:6, 1:9) erstellt, wobei sich entsprechend der Verdünnung auch der Crossing Point verschiebt.

## Methoden und Material

Aus dem bekannten, ansteigenden Verlauf der Crossing Points kann nun eine Standardkurve berechnet werden. Anhand dieser Standardkurve und der Crossing Points der Einzelproben kann somit die anfängliche cDNA-Konzentration errechnet werden.

Nach Beendigung der Amplifikationszyklen wurde das Reaktionsgemisch mit den darin enthaltenen doppelsträngigen Templates nochmals erhitzt. Beim sogenannten „Aufschmelzen“ der DNA kann eine Identifikation des amplifizierten DNA-Abschnitts erfolgen, da sich die Doppelstränge, abhängig vom amplifizierten Template, bei charakteristischen Temperaturen in Einzelstränge spalten (Fluoreszenzsignal erlischt). Dies hilft zur Überprüfung, ob die gewünschte DNA-Sequenz, festgelegt durch die verwendeten Primer, amplifiziert wurde.

Zur Durchführung wurde ein Mastermix, der sich jeweils aus 5 µl SYBR® Green, 0,5 µl Sense-Primer, 0,5 µl Antisense-Primer sowie 3 µl Wasser zusammensetzt, mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 9 µl pro Reaktionsansatz, verwendet. Sowohl für die Standardkurve als auch für die Einzelproben wurde 1 µl cDNA mit 9 µl Mastermix in einem Well einer entsprechenden Light-Cycler-Platte zusammengegeben. Stets in Kombination mit einer Negativ-Kontrolle, die keine cDNA enthielt. Außerdem wurde regelmäßig auch ein Reaktionsansatz in einem Well hinzugefügt, welcher die cDNA aus einem Zellysat einer „(Gesamt)-Niere“ enthielt.

Neben dem im Fokus stehenden Genprodukt, nämlich Renin, wurde stets ein sogenanntes Housekeeping-Gen quantitativ untersucht um einen relativen Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsreihen gewährleisten zu können. Hierbei handelte es sich um  $\beta$ -Aktin und RPL32.

### 9. Nebennierenprimärkultur

Um zu klären, ob Nebennierenzellen eine Reninsynthese im Rahmen eines lokalen RAS betreiben und wie diese reguliert wird, wurde eine Nebennierenprimärkultur etabliert. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, die nach einer CO<sub>2</sub>-Narkose durch Genickbruch getötet wurden.

Es erfolgte zunächst, nach Verlagerung des Darmkonvoluts nach kontralateral, die Präparation im Retroperitonealraum. Am oberen Pol der Nieren aufsitzend zeigten sich die fettig, gelblich erscheinenden Nebennieren. Entsprechend ihrer endokrinen Funktion imponierten die Nebennieren mit ihrer, trotz der geringen Größe, gut sichtbaren Gefäßzeichnung. Oftmals gestaltete sich die Entnahme der Nebennieren leichter, wenn die Nieren samt aufsitzenden Nebennieren entnommen wurden und erst anschließend eine Ablösung der Nebennieren von den Nieren erfolgte.

Um eine Kontamination der späteren Zellkultur mit mikrobiellen Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die entnommenen Nieren und Nebennieren in gekühltem PBS-Puffer gewaschen. Die Nieren wurden von der umgebenden Nierenkapsel befreit. Dann wurden Teile der Nierenrinde für die folgende Anlage einer Primärkultur mit einer sterilen Skalpellklinge entfernt.

Die Nebennieren wurden durch ein steriles Sieb mit einem Maschenabstand von 70 µm gedrückt. Hierfür wurde der Kolben einer sterilen Plastikspritze verwendet. In leichten Kreisbewegungen, ohne Aufbau von Druck, wurden die Nebennieren durch das Sieb gerieben, wobei unter dem Sieb ein Falcon als Auffanggefäß diente. Hierauf wurden die Nebennierenfragmente, die noch am Sieb anhafteten, mit 1,5 ml Kulturmedium in das Falcon gespült. Dort zeigte sich nun eine homogene, leicht trübe Zellsuspension.

In gleicher Weise wurde mit den Nierenrindenstückchen verfahren. Allerdings mit dem Unterschied, dass ein Sieb mit einem Maschenabstand von 100 µm zur Verwendung kam. Während dieser Bearbeitung des Gewebes musste auf sterile Bedingungen geachtet werden. Hierzu wurde auf einer Zellkultur-Werkbank mit entsprechendem Flow gearbeitet. Für die spätere Bewertung der Untersuchungsbefunde war es zwingend erforderlich, jede Kontamination, insbesondere der Nebennierenzellen mit Nierenrindengewebe zu vermeiden. Hierbei ist es von Bedeutung, dass im Nierenkortex durch die granulierten juxtaglomerulären

## Methoden und Material

Zellen des glomerulären Vas afferens bekanntermaßen die Reninproduktion für das systemische RAAS stattfindet. Eine Kontamination der Nebennierenkultur mit Kortexzellen mit deren extensiver Reninproduktion hätte den Nachweis einer Reninproduktion durch ein eventuell vorliegendes, lokales RAS des Nebennierengewebes, unmöglich gemacht.

Die Nebennierenzellen-Medium-Suspension wurde auf 15 Wells einer 96er-Well-Platte mit einem Volumen von jeweils 100 µl verteilt. In gleicher Weise wurde die Nierenrindenzellen-Medium-Suspension auf derselben Well-Platte ausgesät.

Um nun einen möglichen Einfluss von Angiotensin II auf die Regulation der Reninsynthese im lokalen RAS untersuchen zu können, wurden sowohl die Nebennierenkulturen wie auch die Kortexzellen einer Stimulation mit Angiotensin II ausgesetzt. Ein Einfluss von Angiotensin II auf die Reninproduktion in den Nierenkortexzellen im Sinne einer negativen Rückkopplung war bereits bekannt und besaß eine Kontrollfunktion im Versuchsaufbau.

Jeweils 5 Wells der Nebennieren- wie auch der Rindenkultur wurden mit 0 nM (Kontrolle), 10 nM oder 100 nM Angiotensin II-Medium behandelt. Das Stimulationsmedium wurde alle 12 Stunden erneuert. Die Zellen wurden nach zweimaliger Stimulation geerntet. Hierbei wurde das Medium abpipettiert und der im Well verbleibenden Zellrasen wurde mit 100 µl Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) bedeckt.

Nach einer Kulturzeit von ca. 24 Stunden zeigten nicht alle Zellen eine Adhärenz zur Bildung eines Zellrasens. Teilweise lagen Zellen frei schwimmend im Kulturmedium vor. Diese wurden bei der Entnahme des Mediums im Rahmen des „Erntevorgangs“ mit entfernt. Daher wurde in einem weiteren Schritt das Medium zentrifugiert, damit sich die darin suspendierten Zellen als Pellet abschieden. Das Medium wurde zur Reninaktivitätsmessung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) gewonnen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Trizol (TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup>) resuspendiert und mit den Zellen, die sich in der Wellplatte befanden zur RNA-Isolation und folgenden real-time PCR verwendet.

Um die Reninsynthese der Nebennierenzellen mittels einer Reninaktivitätsmessung im Kulturmedium noch genauer quantifizieren zu können, musste der Versuchsaufbau modifiziert werden. Die grundlegende Problematik bestand darin, in wie weit von der Reninkonzentration im Kulturmedium auf die intrazelluläre Reninsynthese geschlossen werden kann, da intrazellulär vorliegendes Renin bei der Messung nicht berücksichtigt wird.

## Methoden und Material

Deshalb wurde zusätzlich zur Messung der Reninaktivität im Kulturmedium eine Messung der zytosolischen Reninaktivität vorgenommen. Hierzu wurde die Zell-Medium-Suspension beim Erntevorgang aus der Vertiefung der Well-Platte entnommen und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Trennung der zellulären Bestandteile vom Kulturmedium, welches zur Reninaktivitätsmessung entnommen wurde.

Die Nebennierenzellen hingegen, welche sich bei der Zentrifugation als Pellet abschieden, wurden in einer 0,1 prozentigen Triton X 100-Lösung resuspendiert. Dies führte zu einem Aufbrechen der Zellmembranen und einer Freisetzung des intrazellulär vorliegenden Renins. Da Triton X 100 nicht zu einer Denaturierung von Proteinen führt, war eine ergänzende Reninaktivitätsmessung im Zelllysat möglich. Somit konnte zur Quantifizierung der Reninsynthese die intra- und extrazelluläre Reninkonzentration herangezogen werden.

Neben der Regulation der Reninsynthese durch Angiotensin II sollte im Rahmen dieses Versuchsaufbaus auch der Einfluss von Forskolin und IBMX auf die Reninfreisetzung der in vitro vorliegenden Nebennierenzellen untersucht werden. Forskolin steigert, wie vorab schon erwähnt, die Aktivität der intrazellulären Adenylatzyklase und erhöht somit die zytosolische cAMP-Konzentration. Zyklisches Adenosinmonophosphat stellt den zentralen intrazellulären Stimulus der Reninsekretion dar. IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) erhöht ebenfalls die intrazelluläre cAMP-Konzentration, indem es die enzymatische Funktion der Phosphodiesterase, nämlich den Abbau von cAMP, hemmt.

Die Nebennierenzellprimärkultur wurde wie oben beschrieben angelegt. Anstelle von Angiotensin II wurden die Zellen mit Forskolin und IBMX stimuliert. Hierbei wurde in der Stimulationgruppe eine Konzentration von 10 mM für Forskolin und eine Konzentration von 5  $\mu$ M für IBMX eingestellt. Der Versuchsaufbau enthielt eine Kontrollgruppe, weiter eine mit Forskolin stimulierte Gruppe, eine mit IBMX stimulierte Gruppe und eine Zellgruppe, welche mit Forskolin sowie IBMX stimuliert wurde. Die Messung der Reninkonzentration im Medium erfolgte identisch zu der Angiotensin-Stimulation mit einem ELISA, wie im folgenden Punkt beschrieben.

### 10. Reninaktivitätsmessung (Angiotensin-I-ELISA)

Die Reninsynthese sowie deren Regulation innerhalb eines lokalen, in der Nebenniere wirkenden RAS, waren auch bei diesem Zellkulturversuch von zentralem Interesse. In den bisherigen Versuchen wurde die Reninexpression auf mRNA-Ebene quantifiziert und spiegelte die Transkriptionshäufigkeit des Renin-Gens wieder.

Bei dieser Reninaktivitätsmessung erfolgte eine Quantifizierung der Reninsynthese anhand seiner enzymatischen Aktivität im Kulturmedium. Damit sollte untersucht werden, ob Nebennierenzellen Renin synthetisieren und auch ins Medium sezernieren und ob diese Synthese einer Regulation durch Angiotensin II unterliegt.

Die Messung der enzymatischen Aktivität des Renins im Kulturmedium erfolgte mittels eines ELISA, in welchem, die von der Protease Renin katalysierte Reaktion, nämlich die enzymatische Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I, betrachtet wird. Es wurde ein ELISA-Kit der Firma IBL-International® verwendet. Bei dem „Angiotensin I (PRA) ELISA“ handelt es sich um einen kompetitiven Assay. Über den Nachweis und die Quantifizierung von Angiotensin I, dem Produkt aus der Reaktion von Angiotensinogen (Substrat) mit Renin, gelingt es, auf die im Reaktionsansatz vorliegende Reninkonzentration zu schließen. Die Quantifizierung der Reninkonzentration gelingt also bei diesem Ansatz nicht direkt, sondern indirekt über die Messung des Produkts der enzymatischen Reninfunktion. Das verwendete Reninsubstrat wurde aus dem Plasma von beidseitig nephrektomierten Versuchstieren gewonnen, bei denen aufgrund der nun fehlenden Reninfunktion hohe Plasmaspiegel an Angiotensinogen erreicht werden.

Prinzipiell umfasste dieser ELISA die Bestimmung der Reninkonzentration von Einzelproben, von Kaltwerten bei denen die enzymatische Reaktion durch Abkühlen des Reaktionsansatzes unterbunden wurde, sowie von Standardwerten zur Etablierung einer Referenz, durch die eine Quantifizierung der Einzelproben erfolgte. Ziel war es, die Reninkonzentration im Zellkulturmedium der Nebennierenprimärkultur zu bestimmen.

Die Mediumproben, die wie oben beschrieben gewonnen wurden, stellten also die Einzelproben dar. Für die Kaltwerte wurde von den Einzelproben eine bestimmte Menge genommen und gepoolt. Bei diesem Ansatz wurden 2 Kaltwerte bestimmt, sodass ein Gesamtvolumen an gepoolten Einzelproben von 68 µl notwendig war.

## Methoden und Material

Für die Herstellung eines Reaktionsansatzes zur Bestimmung der Einzelproben waren jeweils 34 µl Mediumprobe, 1 µl PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid), sowie 13 µl Reninsubstrat und 5 µl Generation Buffer notwendig. Diese Komponenten wurden jeweils in einem Cup angesetzt. Hierbei verhindern PMSF als Protease Inhibitor sowie der Generation Buffer die Degradation des enzymatisch gebildeten Angiotensin I. Dieser Reaktionsansatz (Warmwert/Einzelproben) wird nun für 90 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit läuft die durch Renin katalysierte Umwandlung von Angiotensinogen (im Reninsubstrat enthalten) zu Angiotensin I ab.

Die Kaltwertproben beinhalten die gleichen, oben genannten Komponenten. Da diese allerdings bei 4 °C inkubiert werden, kann hier die enzymatische Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I nicht ablaufen. Nach der Inkubation erfolgt nun der eigentliche immunologische Assay. Hierzu wird zunächst der Standard in die entsprechenden Wells der im Kit enthaltenen Mikrotiterplatten pipettiert. Die Vertiefungen dieser Mikrowell-Platten haben an ihrer Oberfläche Antikörper gebunden. Diese sind spezifisch gegen Angiotensin I als Antigen gerichtet und binden dieses. Nach den Standardproben werden auch die inkubierten Proben (Kalt- und Warmwerte) in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert.

Im nächsten Schritt wird Angiotensin I–Biotin zu den Proben gegeben. Hierbei handelt es sich um Angiotensin I, an welches Biotin gebunden wurde. Nun konkurrieren Angiotensin I als Produkt der Reninfunktion, das während der Inkubation der Warmwertproben aus dem Reninsubstrat gebildet wurde und das hinzugegebene Angiotensin I-Biotin-Konjugat und die Bindung an die Ang-I-Antikörper an der Microwell-Oberfläche.

Abhängig von der Angiotensin I-Konzentration in den Proben, die wiederum von der ursprünglichen Reninkonzentration im Medium abhängig ist, gelingt es dem Angiotensin I-Biotin-Konjugat an die Ang I-Antikörper zu binden. Nachdem diese kompetitive Antigen-Antikörper-Reaktion abgelaufen ist und sich entsprechend der vorliegenden Konzentration in einem Gleichgewicht befindet, folgt ein Waschvorgang bei dem die nicht immunologisch gebundenen Bestandteile des Ansatzes entfernt werden.

Nun wird Streptavidin-HRP (Horseradish-Peroxidase)-Konjugat hinzugegeben. Der Streptavidin-Anteil bindet an die Biotin-Komponente des Ang I-Biotin-Konjugats, das mehr oder weniger über den Antikörper an der Mikrowell-Platte gebunden ist. Nach einem weiteren



## **Methoden und Material**

Waschvorgang wird das TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) hinzugefügt. Durch die HRP-Funktion und der Reaktion mit TMB kommt es zu einer Gelbfärbung des Reaktionsansatzes. Wird die Reaktion mit Schwefelsäure abgestoppt gibt es einen Farbumschlag nach blau.

Es erfolgt die photometrische Vermessung bei 450 nm. Die Quantifizierung der ursprünglich im Medium vorhandenen Konzentration erfolgt also photometrisch. Hierbei ist die Intensität der Färbung davon abhängig wie viel Angiotensin I während der Inkubation aus dem Reninsubstrat enzymatisch gebildet wurde. Denn davon hängt ab, wie viel Angiotensin I-Biotin-Konjugat an die Ang I-Antikörper binden kann. Je weniger Angiotensin I aus dem Inkubationsvorgang, aufgrund geringer Reninmengen, synthetisiert werden kann, desto mehr Antikörperbindungsstellen werden durch das Ang I-Biotin-Konjugat besetzt. Folglich kann auch mehr Streptavidin-HRP binden und die Farbreaktion fällt umso intensiver aus. Letztendlich kann nun anhand der Standardkurve die ursprünglich im Reaktionsansatz vorhandene Reninkonzentration berechnet werden [35].

**11. Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Autoklav	Systemec GmbH, Wetzlar
Brutschränke	WTB Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen Heraeus Labor Center, Nürnberg
Kühl- und Gefrierschränke	Schymke Klima-Kälte-Lüftung, Nürnberg
Mikroskope	Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
NanoDrop Spectrophotometer ND1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Geräte: -LightCycler® 480 Real-Time-PCR -Thermocycler: Labcycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim SENSOQUEST Biomedical Electronics, Göttingen
Pipetten: -Pipetman P1000, P200, P100, P10 -Multichannel Pipette	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH & CoKG, Wertheim
Plattenschüttler PMS-1000	Grant Bio, USA
Sterilwerkbank s@femate 1.5 vision	Labotect GmbH, Göttingen
Sunrise Absorbance Reader	TECAN Austria GmbH, Salzburg
Thermomixer	Clemens GmbH, Waldbüttelbrunn
Vortexer: -MS1 Minishaker -VTX-3000L Mixer	IKA®-Werke GmbH & CoKG, Staufen UZUSIO, Tokio, Japan
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad: -Julabo PC -Haake FK	JULABO GmbH, Seelbach Labexchange-Die Laborgerätebörse GmbH, Burladingen

## Methoden und Material

Gerät	Hersteller/Lieferant
Zentrifugen: -Centrifuge 5417 R -CS-15R Centrifuge -neoLab® - Zentrifuge mit Vortexer	Eppendorf AG, Hamburg Beckman Coulter GmbH, Krefeld neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg

Diese Übersicht erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Weitere Geräte wurden bei Bedarf über den Fachhandel erworben.

### 12. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller/Lieferant
Cups: -Easy Cap (2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml) -Safe Seal (2 ml, 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg und SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
CO2-Gasflasche	Linde AG, Pullach
Einmalkanülen steril 20G	Hartenstein Laborbedarf
Einmalspritzen steril (5 ml, 10 ml)	Hartenstein Laborbedarf
Glaswaren: -Schottgefäße, Glaspetrischalen -Erlenmeyerkolben, Bechergläser	Schott AG, Mainz
Handschuhe	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe VWR International GmbH, Darmstadt
Kryoröhrchen steril, Kryobox	NUNC A/S, Roskilde, Dänemark

## Methoden und Material

Material	Hersteller/Lieferant
Mikrotiter-/Multiwellplatten: -Zellkultur-Well-Platten, 12-, 96- Well -Light Cycler 480 Multiwell Plate 96+ -Rabbit Anti-Ang-I Antibody Coated Microwell Pl. 96	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht Roche Diagnostics GmbH, Mannheim IBL INTERNATIONAL GMBH, Hamburg
Nylon-Zellfilter (Maschenweite 70 u. 100 µm)	Hartenstein Laborbedarf
Pipetten: -Auslaufpipetten steril -Pasteurpipetten	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht Brand GmbH & CoKG, Wertheim
Pipettenspitzen mit u. ohne Filter (10, 100, 200 und 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Präparationsbesteck Pinzette, Schere	MSG Medizinische Geräte, Handel und Service GmbH, Wuppertal
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Skalpellklingen steril	Hartenstein Laborbedarf
Sterilfilter: -Filtropur BT50 Flaschenaufsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) -Filtropur S 0.2 Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) -50 ml Spritze mit Luer-Lock (Typ infuject)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht  Hartenstein Laborbedarf
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht

Diese Übersicht erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Weiteres Material wurde bei Bedarf über den Fachhandel erworben.

13. Zellkulturmedien und Medienzusätze, Puffer und Lösungen

Medium/Zusatz/Puffer/Lösungen	Hersteller/Lieferant
Angiotensin II	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Collagen A	Biochrom AG, Berlin
Dexamethason	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s Medium)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM/F12 1:1 Mixture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Epidermal Growth Factor (EGF)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol 75 %:	35,5 ml 99 % EtOH p.a., 12,5 ml DEPC-H <sub>2</sub> O
Ethanol 70 %:	700 ml 99 % EtOH (technisch), 290 ml H <sub>2</sub> O
FCS (fetal calf serum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Forskolin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufk.
Ham´s F12	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
IBMX	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufk.
Insulin-Transferrin-Selenium-G Supplement	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
MEM-Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
1x DPBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)(15140)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T3) (T5516) 1 mg	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<u>Verdauungslösung</u> -Glycin -Hyaluronidase -Collagenase Typ II -Trypsin-Inhibitor	

14. Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller/Lieferant
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Acros Organics, Morris Plains, USA
DEPC	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
dNTP Set [2,5 mM]	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (99 %) p.a.	Acros Organics, Morris Plains, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glykogen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer [0,5 µg/µl]	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Trypsin/EDTA-Solution 0,05 %/0,02 % in PBS, ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> , pH 7,6 (P10-023500)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

**15. Enzyme und Kit-Systeme**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Angiotensin I (PRA) ELISA	IBL INTERNATIONAL GMBH, Hamburg
Collagenase Type 2 [240 U/mg]	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA
Light Cycler 480 SYBR® Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) 40.000 U [200 U/µl]	Invitrogen, Karlsruhe
TRIsure™	Bioline, Luckenwalde
Reverse Transkriptase System	Promega, Mannheim

16. Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
β-Aktin-sense	GGTCCACACCCGCCACCAG
β-Aktin-antisense	GGGCCTCGTCACCCACATAGG
Aquaporin-2-sense	ACCCTGGGCCACCTCCTTGG
Aquaporin-2-antisense	GCGCTCCTGCAGGCTCTTGG
AT1-Receptor-sense	TCACCAGATCAAGTGCATTTTGA
AT1-Receptor-antisense	AGAGTTAAGGGCCATTTTGCTTT
RPL32-sense	TGGAGGTGCTGCTGATGTG
RPL32-antisense	CGTTGGGATTGGTGACTCTGA
Renin-sense	GGTGTTCTAGGCATGGGCTT
Renin-antisense	GATAATGCTGCGGGTCGCTA

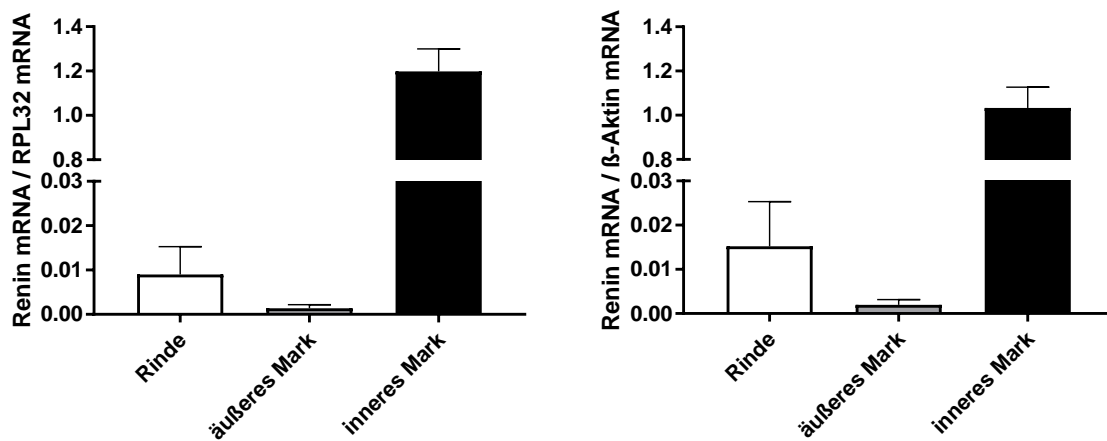


### III. Ergebnisse

#### 1. Untersuchungen an isolierten Sammelrohren aus Nierenrinde und äußerem Nierenmark, sowie an frisch isoliertem inneren Nierenmark

Wie erwähnt ist die Reninbildung im Tubulus unter Normalbedingungen sehr gering und steigt nur in pathologischen Zuständen stark an. Um zu überprüfen, ob die Renin mRNA Expression in nativem Gewebe von gesunden Mäusen überhaupt nachweisbar ist, wurden Sammelrohre aus dem Kortex und dem äußeren Mark per Mikrodissektion isoliert. Um die Sammelrohre klar identifizieren zu können, wurde eine Reportermaus verwendet (AQP-2-Cre / Tomato, siehe Kap. II.1.), die eine grüne Fluoreszenz nur in Sammelrohren zeigt. Zudem wurde bei diesen Mäusen das innere Mark der Nieren entnommen und zur Analyse verwendet.

Die Renin mRNA Expression wurde mittels real-time-PCR semiquantitativ bestimmt und zur Normierung auf die mRNA-Expression von zwei unterschiedlichen Housekeeping Genen, nämlich RPL32 und  $\beta$ -Aktin bezogen. Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte Renin mRNA in den Sammelrohren des Kortex und der äußeren Medulla nachgewiesen werden. Allerdings war die Expressionstärke in den Sammelrohren dieser Kompartimente deutlich niedriger, als im inneren Mark der Nieren. Diese unterschiedliche Verteilung war unabhängig vom verwendeten Housekeeping Gen als Referenz.

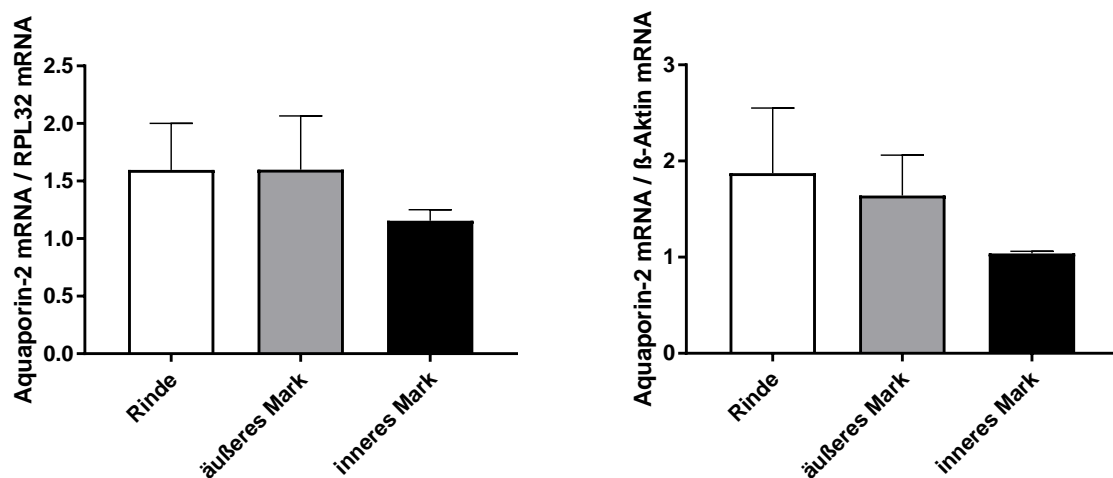


**Abb. 8: Renin mRNA Expression in isolierten Sammelrohren der Nierenrinde und des äußeren Nierenmarks sowie im inneren Nierenmark**

Zur Normierung wurden die Renin mRNA Level auf die mRNA-Expression der Housekeeping Gene RPL32 (linke Abbildung) und  $\beta$ -Aktin (rechte Abbildung) bezogen (je n=4 Rinde, äußeres Mark, inneres Mark).

## Ergebnisse

Im Gegensatz zur starken Expression der Renin mRNA im inneren Mark, war die mRNA Expression von Aquaporin-2, einem spezifisch im Sammelrohr exprimierten Protein, eher gleichmäßig in den Sammelrohren aller Nierenzonen exprimiert. Es zeigte sich im Gegenteil sogar ein Trend zu einer geringeren Expression im inneren Mark, also zu einer gegensätzlichen Verteilung verglichen mit der Renin mRNA Expression (Abb. 9).



**Abb. 9: Aquaporin-2 mRNA Expression in isolierten Sammelrohren der Nierenrinde und des äußeren Nierenmarks sowie im inneren Nierenmark**

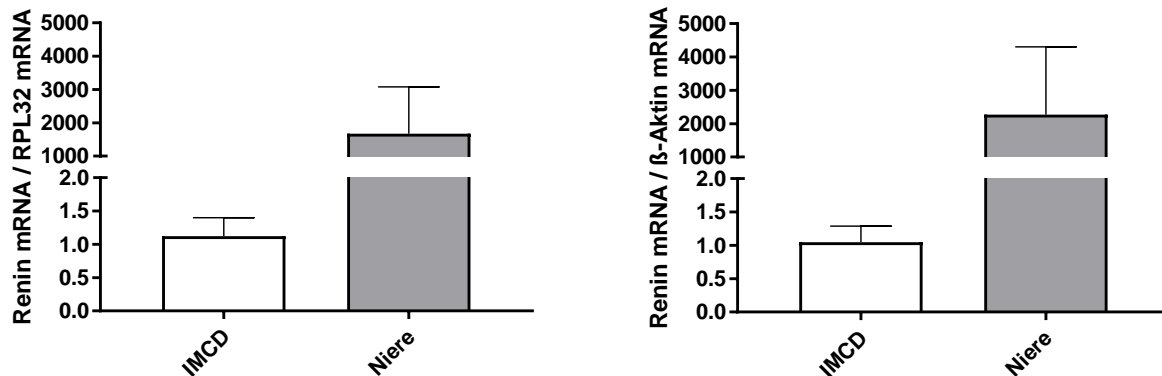
Zur Normierung wurden die Aquaporin-2 mRNA Level auf die mRNA-Expression der Housekeeping Gene RPL32 (linke Abbildung) und  $\beta$ -Aktin (rechte Abbildung) bezogen (je n=4 Rinde, äußeres Mark, inneres Mark).

### **2. Primärzellkultur aus isolierten Sammelrohren und isoliertem inneren Nierenmark**

Auf der Grundlage der nachweisbaren Renin mRNA Expression in den isolierten Sammelrohren und vor allem dem isolierten inneren Mark, wurde im nächsten Schritt versucht, aus diesen Strukturen Primärzellkulturen von Sammelrohrzellen anzulegen.

Trotz der Verwendung unterschiedlicher Protokolle (Kulturmedien, Kulturschalen, eingesetzte Gewebemenge, etc.) gelang es nicht, Primärzellkulturen aus isolierten Sammelrohren des Kortex oder des äußeren Marks anzulegen, die eine reproduzierbare Renin mRNA Expression aufwiesen. Die Zyklenzahl bei dem der Crossing Point in der real-time-PCR erreicht wurde entsprach dem einer Negativ Kontrolle, z.B. einer Probe, die anstelle von cDNA nur Wasser enthielt. Diese Versuche wurden daher erfolglos eingestellt.

Im Gegensatz zu den isolierten Sammelrohren, wuchsen aus dem isolierten inneren Mark Zellen (IMCD Zellen) aus. Diese Zellen zeigten eine klare Expression von Renin mRNA, wobei die Expression gegenüber nativem Nierengewebe, welches auch juxtaglomeruläre Zellen als stark reninexprimierende Zellen enthält, sehr gering war (Abb. 10).



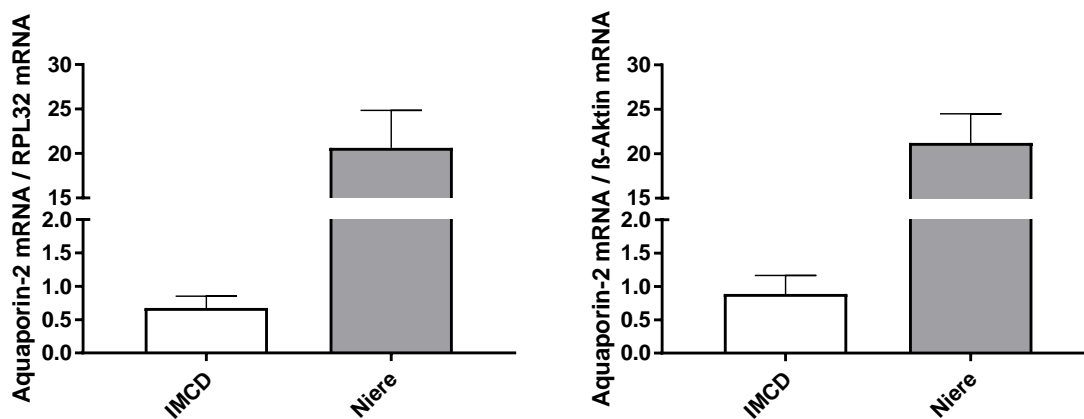
**Abb. 10: Renin mRNA Expression in IMCD Zellen im Vergleich zu der Renin mRNA Expression in einer nativen (Gesamt)-Niere**

Zur Normierung wurden die Renin mRNA Level auf die mRNA-Expression der Housekeeping Gene RPL32 (linke Abbildung) und  $\beta$ -Aktin (rechte Abbildung) bezogen (je  $n=3$  IMCD, native (Gesamt)-Niere).

Vergleicht man den Crossing Point der Renin mRNA Expression der IMCD Zellen mit dem der nativen inneren Medulla, also dem Ausgangsgewebe der IMCD Zellen vor der Kultivierung, so zeigt sich, dass die Reninsynthese in Laufe der Kultur geringer wird. Während der Crossing Point bei nativem Gewebe bei  $20,3 \pm 0,12$  Zyklen lag, waren bei IMCD  $29,5 \pm 0,6$  Zyklen notwendig um den Crossing Point zu erreichen. Die Negativkontrolle zeigte keine Renin Expression (Crossing Point über 35 Zyklen).

## Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um Sammelrohrzellen handelt, wurde die Expression von Aquaporin-2 (AQP-2) bestimmt. AQP-2 wird in der Niere ausschließlich im Sammelrohr und im Verbindungstubulus exprimiert. Da es im inneren Nierenmark allerdings keine Verbindungstubuli gibt, kann aus dem Nachweis von AQP-2 geschlossen werden, dass die untersuchten Zellen von Sammelrohren abstammen. Wie in Abb. 11 gezeigt, exprimieren die IMCD Zellen tatsächlich AQP-2. Allerdings, ähnlich wie beim Renin, ist das Expressionsniveau im Vergleich zur Gesamtniere gering. Auch im Vergleich zum Ausgangsgewebe (Crossing Point  $17,15 \pm 0,17$ ) ist die Expression vermindert (IMCD  $24,47 \pm 1,27$ ).



**Abb. 11: Aquaporin-2 mRNA Expression in IMCD Zellen im Vergleich zu der Renin mRNA Expression in einer nativen (Gesamt)-Niere**

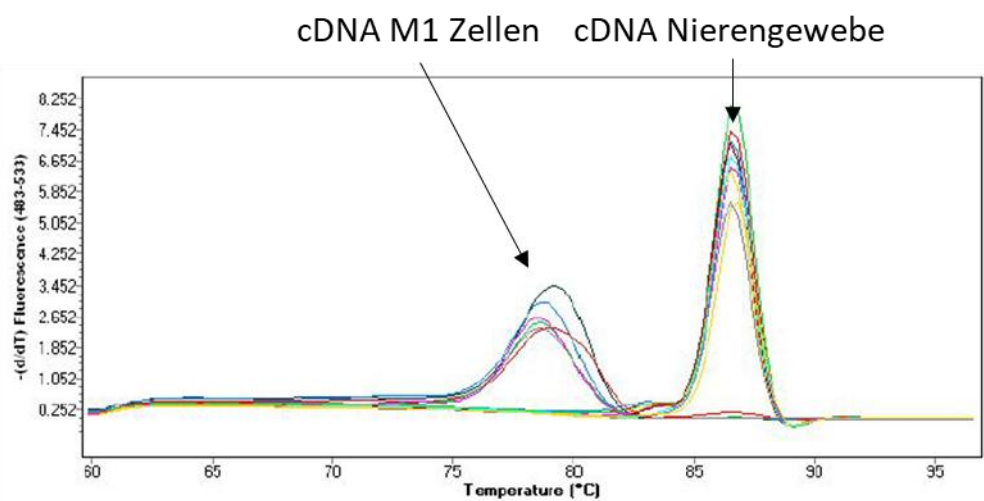
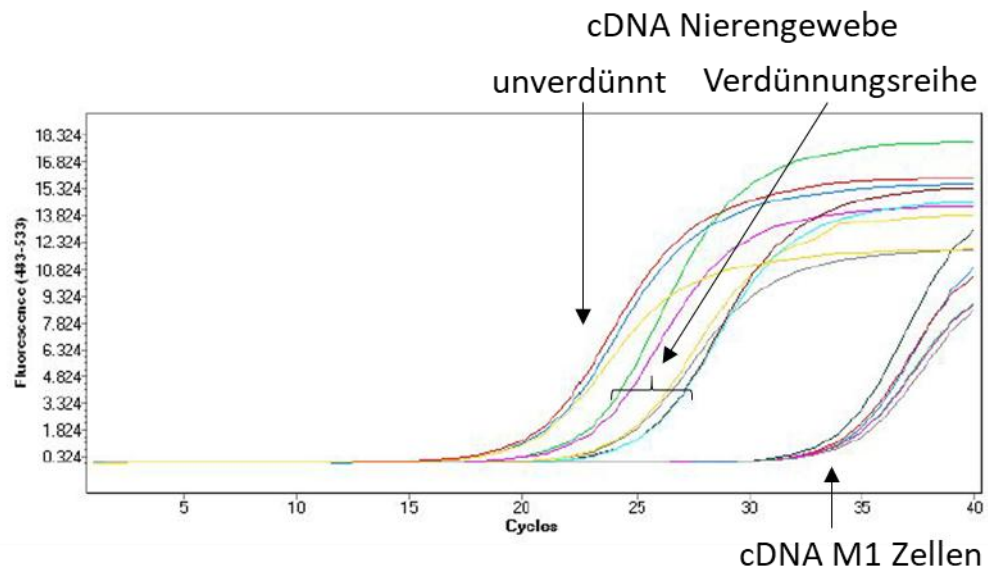
Zur Normierung wurden die Aquaporin-2 mRNA Level auf die mRNA-Expression der Housekeeping Gene RPL32 (linke Abbildung) und  $\beta$ -Aktin (rechte Abbildung) bezogen (je  $n=3$  IMCD, native (Gesamt)-Niere).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es möglich ist, eine Primärzellkultur von Sammelrohrzellen aus dem inneren Mark anzulegen. Die Expression von Renin und Aquaporin-2, einem zentralen Funktionsprotein nativer Sammelrohre, nimmt zwar in Kultur ab, die Expressionsstärke wäre aber ausreichend, um weiterführende Untersuchungen zur Regulation der Reninbildung im Sammelrohr durchzuführen.

### 3. Reninexpression in den Sammelrohrzelllinien M1 und mpkCCD-14

Die zuvor etablierte Methode zur Primärzellkultur von Sammelrohrzellen ist generell für weiterführende Untersuchungen geeignet. Allerdings hat eine Primärzellkultur den Nachteil, dass für jedes Experiment neue Kulturen angelegt werden müssen. Neben dem hohen Zeitaufwand für die Isolation und das Aus- und Anwachsen der Zellen, stellt auch der damit verbundene Verbrauch an Versuchstieren ein ethisches Problem dar. Diese Probleme können durch die Verwendung von immortalisierten Zelllinien, die ständig nachwachsen und daher schnell und in erforderlicher Menge verfügbar sind, umgangen werden. Allerdings verlieren immortalisierte Zelllinien in vielen Fällen ihre Gen- und Proteinexpression, entfernen sich also in ihrer genetischen Signatur von ihren Ursprungszellen. Um zu überprüfen, ob zwei der in der Nierenforschung am häufigsten verwendeten Sammelrohrzelllinien ausreichend Renin mRNA exprimieren, um sie für weitere Untersuchungen nutzen zu können, wurden M1 Zellen und mpkCCD-14 Zellen in Kultur genommen.

Trotz verschiedener Modifikationen der Kulturbedingungen ließ sich in keiner der beiden Zelllinien Renin mRNA nachweisen. Eine bei der real-time-PCR mitlaufenden Positivkontrolle (cDNA Gesamtniere, Crossing Point ca. 20 Zyklen, Abb. 12, oben) belegte, dass die PCR regelrecht funktioniert hatte und auch die Expression des Housekeeping Gens  $\beta$ -Aktin in den Zellen war stets im erwarteten Rahmen (Crossing Point 12 – 13 Zyklen). Der Crossing Point der Renin mRNA jedoch lag regelmäßig im Bereich der Negativkontrolle (Abb. 12, oben) oder es zeigten sich lediglich unspezifische PCR-Produkte (Abb. 12, unten: Schmelzkurvenanalyse), sodass daraus geschlossen werden muss, dass diese Zelllinien kein Renin exprimieren, oder dass die Expression zumindest so gering ist, dass die Nutzung der Zellen für weiterführende Untersuchungen nicht sinnvoll ist.



**Abb. 12: real-time-PCR zur semiquantitativen Messung der Renin mRNA in der Sammelrohrzelllinie M1**

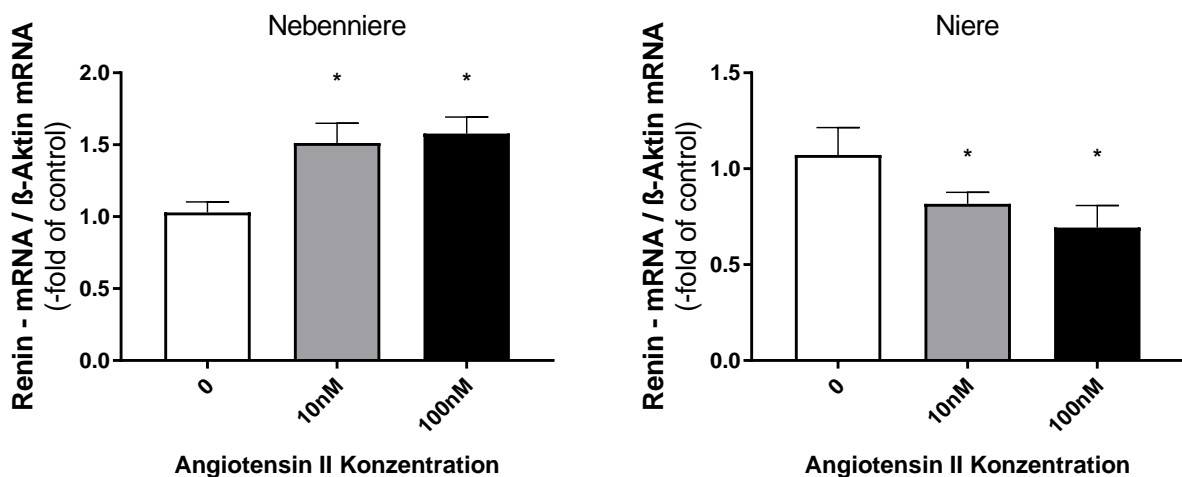
Obere Abbildung: Darstellung der CPs bzw. des Fluoreszenzsignals während der Amplifizierung der Renin cDNA

Untere Abbildung: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte



#### 4. Reninexpression in Nebennierenzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Sammelrohrzellen eine Quelle lokaler Reninbildung darstellen und damit für die mögliche Etablierung eines Zellkulturmodells geeignet sind, sollte auch geklärt werden, ob Zellen der Nebennierenrinde Renin synthetisieren. Weiter sollte eine Primärzellkultur aus Nebennierenzellen angelegt werden, um die Regulation des Renins auf zellulärer Ebene untersuchen zu können.



\* bedeutet  $p < 0.05$  vs. Kontrolle

**Abb. 13: Renin mRNA Expression in Nebennierenzellen (linke Abbildung) und in Zellen der Nieren (Rinde) (rechte Abbildung) unter Stimulation mit Angiotensin II**

Zur Normierung wurden die Renin mRNA Level in Nebenniere und Nieren (Rinde) auf die mRNA-Expression des Housekeeping Gens  $\beta$ -Aktin bezogen (je  $n=6$  Nebenniere, Niere).

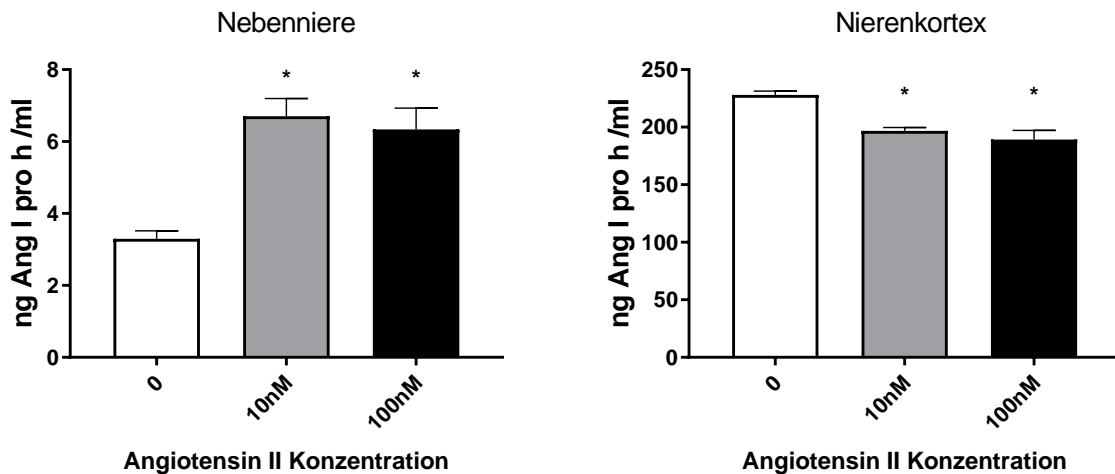
## Ergebnisse

Zunächst wurde untersucht, ob Nebennierenzellen eine Reninsynthese zeigen und somit Renin mRNA exprimieren. Weiter wurde Angiotensin II hinsichtlich eines möglichen stimulatorischen Effekts auf die Reninsynthese überprüft. Hierzu wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen von Angiotensin II (10 nM, 100 nM) ausgesetzt. Tatsächlich zeigte sich zum einen eine Renin Expression in den Nebennierenzellen und darüber hinaus eine verstärkte Reninsynthese unter dem Einfluss von Angiotensin II. Dieser Zusammenhang spiegelt sich in der steigenden Renin mRNA Konzentration unter Stimulationsbedingungen wider (Abb. 13, links).

Zum Vergleich wurde auch die Renin mRNA Expression in der Nierenrinde untersucht. Da in diesem Gewebe die JG-Zellen lokalisiert sind, ist die Renin mRNA Expression und damit auch die Reninsynthese erwartungsgemäß hoch und viel höher als in den Nebennierenzellen (etwa 100-fach). Unter Stimulation mit Angiotensin II (10 nM, 100 nM) wird die Reninsynthese in den kortikalen Nierenzellen wie erwartet über den bereits bekannten, negativen Feedback-Mechanismus gehemmt.

In Zusammenfassung dieser Ergebnisse ergeben sich für Angiotensin II hinsichtlich der Reninsynthese also gegensätzliche regulatorische Effekte. Während Angiotensin II die Reninbildung in den Nebennierenzellen stimuliert, hat es auf die Reninbildung in den kortikalen Nierenzellen einen hemmenden Effekt.

Weiter wurden diese regulatorischen Effekte nicht nur auf Transkriptionsebene untersucht, sondern auch auf enzymatischer Ebene mittels einer Reninaktivitätsmessung. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die regulatorischen Effekte von Angiotensin II lediglich die Reninbildung oder aber auch die Reninfreisetzung beeinflussen, wurde die Reninaktivität im Kulturmedium (Überstand) bestimmt (Abb. 14).



\* bedeutet  $p < 0.05$  vs. Kontrolle

**Abb. 14: Reninaktivität/Konzentration gemessen im Kulturmedium (Überstand) einer Nebennierenkultur (linke Abbildung) und einer Zellkultur mit kortikalen Nierenzellen (rechte Abbildung) jeweils unter Stimulation mit Angiotensin II (10 nM, 100 nM)**

(je n=17 Nebenniere, Nierenkortex)

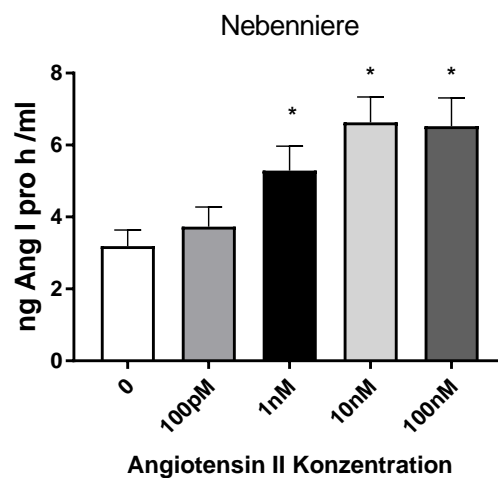
Zunächst ist festzustellen, dass in der Nebennierenkultur eine Reninaktivität nachzuweisen ist. Analog zu den Ergebnissen aus den PCR-Analysen (Abb. 13) zeigt sich auch bei der Reninaktivitätsmessung im Überstand eine Steigerung der Reninaktivität bei den Nebennieren unter dem Einfluss von Angiotensin II. Weiter bestätigt sich der hemmende Effekt von Angiotensin II auf die Reninbildung/freisetzung durch die kortikal gelegenen JG-Zellen, wobei dieser inhibitorische Effekt aufgrund der fehlenden Vorstimulation eher gering ausgeprägt ist.

Neben den gegensätzlichen Regulationseffekten durch Angiotensin II unterscheiden sich die Nebennierenzellen und die kortikalen Nierenzellen in der Bildung einer Reninaktivität. Diese ist erwartungsgemäß in den JG-Zellen deutlich höher. Schließlich wird über die JG-Zellen Renin für das systemisch wirkende RAS bereitgestellt, während die Reninaktivität in den Nebennierenzellen eher für lokale Effekte verantwortlich ist.

## Ergebnisse

Die Veränderung der Reninaktivität in der Nebenniere unter dem Einfluss von Angiotensin II ist in dem Bereich von 10 bis 100 nM konzentrationsunabhängig. Das bedeutet, dass trotz der Verwendung eines 10-fach höher konzentrierten Stimulationsmediums in diesem Konzentrationsbereich keine Steigerung der Reninaktivität festzustellen ist.

Da es sich bereits bei 10 nM um eine physiologisch relativ hohe Konzentration handelt, ist möglicherweise davon auszugehen, dass in diesem Bereich eine Sättigung erreicht wird. Deshalb wurde in einem weiteren Schritt eine Wiederholung der Stimulation durchgeführt. Hierbei fanden Stimulationsmedien von 100 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM Verwendung, wobei sich in einem Bereich von 100 pM bis 10 nM eine Konzentrationsabhängigkeit der Reninaktivität vom Stimulationsmedium ableiten ließ.



\* bedeutet  $p < 0.05$  vs. Kontrolle

**Abb. 15: Reninaktivität/Konzentration gemessen im Kulturmedium (Überstand) einer Nebennierenkultur unter Stimulation mit Angiotensin II (100 pM, 1, 10 und 100 nM)**

(n=7 Nebenniere)

### IV. Diskussion

#### 1. Vorwort

Aus dem Nachweis einer Reninsynthese außerhalb der glomerulären JG-Zellen ergeben sich viele Fragestellungen. Diese beziehen sich nicht nur auf die physiologische Bedeutung und die Effekte eines lokal wirksamen RAS, sondern, nachdem eine erhöhte, gewebsständige Reninproduktion bereits bei Krankheitsbildern wie dem Diabetes mellitus [42] oder der arteriellen Hypertonie [29] nachgewiesen werden konnte, auch auf die Rolle, die dieses System in der Pathophysiologie einnimmt. Aufbauend auf das bessere Verständnis eines lokalen RAS in der Physiologie und auch in der Pathophysiologie ergibt sich auch die Hoffnung, Erkrankungen, bei deren Pathogenese ein lokales RAS mitwirkt, besser verstehen und gegebenenfalls sogar therapieren zu können. Hieraus erklärt sich das Ziel dieser Arbeit, ein Zellmodell zu entwickeln, anhand dessen die Erforschung des lokalen RAS und seiner Regulation unterstützt werden kann.

Um die lokale Reninbildung und -regulation in den Sammelrohrzellen der Mausniere und den murinen Nebennierenzellen untersuchen zu können, wurden verschiedene *in vitro* Kulturen etabliert. Da Voruntersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe [29] auf eine regulatorische Rolle von Angiotensin II auf das lokale RAS hinwiesen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Wirkung von Angiotensin II im lokalen RAS *in vitro* untersucht.

### 2. Nachweis einer lokalen Reninsynthese in Sammelrohren

Zunächst wurde versucht, durch die Isolation und Entnahme des inneren Nierenmarks, welches eine sehr hohe Sammelrohrdichte aufweist, eine große Menge an Sammelrohrzellen zu gewinnen. Zusätzlich erfolgte die Mikrodissektion von Sammelrohren aus dem äußeren Mark und der Nierenrinde. Um gezielt Sammelrohre ohne Kontamination mit anderen Strukturen aus dem heterogenen, renalen Gewebeverbund zu isolieren, wurden für die Mikrodissektion Reporter-Mäuse verwendet.

Die so gewonnenen Zellen wurden zunächst jedoch nicht zur Etablierung einer Primärkultur verwendet, sondern es erfolgte direkt die Quantifizierung der Reninexpression.

Während sich bei den gewonnenen Sammelrohrproben aus dem äußeren Mark und der Nierenrinde nur eine geringe Reninsynthese nachweisen ließ, wiesen die Sammelrohrzellen des inneren Nierenmarks eine deutliche Expression der Renin mRNA auf. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten [74, 75, 76, 78, 79].

In dieser Versuchsreihe konnte eine *in vivo* Reninsynthese in den Sammelrohren gesunder Mäuse gezeigt werden. Hieraus folgen zwei wichtige Erkenntnisse.

- Die Methode der Mikrodissektion und Isolation des inneren Nierenmarks ist geeignet, um primäre Sammelrohrzellen als Grundlage für die folgenden *in vitro* Versuche zu gewinnen. Unterstützt wird dies durch den Nachweis von Aquaporin-2, das die Sammelrohrzellen charakteristischerweise exprimieren.
- Die Sammelrohre zeigen auch unter physiologischen Bedingungen eine, wenn auch niedrigere als in pathologischen Zuständen, lokale Reninsynthese.

Damit erfüllen die primären Sammelrohrzellen die Grundvoraussetzung für Zellkulturversuche, in denen die Regulation der lokalen Reninsynthese betrachtet werden soll.

### 3. Aus in vivo nach in vitro

#### Etablierung eines Zellkulturmodells mittels Mikrodissektion nicht wegweisend

Anschließend wurde der Focus darauf gerichtet, eine Primär-Zellkultur anzulegen. Zwar konnten bei der Mikrodissektion tatsächlich Sammelrohrzellen isoliert werden, beim Versuch der Kultivierung zeigten sich allerdings häufig Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen, was auf den Entnahmeprozess der Nieren zurückzuführen ist. Obwohl versucht wurde, durch steriles Arbeiten und Zusetzen von antimikrobiellen Substanzen, dieser Problematik zu begegnen, mussten jedoch trotzdem mehrere Kulturen verworfen werden. Darüber hinaus war die durch die Mikrodissektion gewonnene Zellmenge sehr gering, sodass ein Anwachsen der Sammelrohrzellen in vitro häufig nicht zu beobachten war. Stattdessen wurde der Zellrasen oftmals von den schneller wachsenden Fibroblasten gebildet. Letztendlich konnte bei den wenigen Ansätzen, die hinsichtlich der Primärkultur doch erfolgreich waren, keine adäquate Reninsynthese festgestellt werden. Ganz überraschend war dieses Ergebnis jedoch nicht, da bei der Kultivierung von Primärzellen eine Reihe von Problemen auftreten kann. Verursacht werden diese Probleme u. a. durch eine geringe Zellzahl, die begrenzte Lebensdauer der Zellen, Kontaminationen und das Auftreten von typischen Veränderungen, die im Kulturverlauf primärer Zellen eintreten (z.B. Verringerung der Zellteilungsrate und das Eintreten der Seneszenz) [61, 83].

#### 4. IMCD-Primärkultur - Verlust der Eigenschaften eines lokalen RAS in vitro?

Durch die Entnahme des inneren Nierenmarks konnten größere Sammelrohrzellmengen ex vivo entnommen werden und standen auch in ausreichend großer Anzahl für eine Primärkultur zu Verfügung. Anhand der Quantifizierung der Expression des Markergens für Sammelrohre „Aquaporin-2“, konnte nachgewiesen werden, dass Sammelrohrzellen in relevanter Menge in der Primärkultur vorliegen. Die durchgeführte RTqPCR zeigte eine, im Vergleich zum Ausgangsgewebe zwar geringe, aber doch nachweisbare Renin- und Aquaporin-2-Expression. Diese Änderung des Expressionsprofils ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Auch bei primären Zellen kommt es zur Entdifferenzierung der Zellen, wenn sie aus dem natürlichen Gewebeverband gelöst werden. Trotz kontaminationsfreier Aufzucht reagieren die kultivierten Zellen häufig nicht mehr so wie im Ursprungsorgan und Enzymsysteme werden nicht mehr exprimiert [60]. In den Versuchen

dieser Arbeit konnte jedoch, wie gesagt, ein Zellkulturmodell angelegt werden, welches über eine Renin Expression verfügt, die zwar in der Kultur abnimmt, es aber gerade noch erlauben würde, weitere Untersuchungen durchzuführen.

### **5. Immortalisierte M1- und mpkCCD-14-Zelllinien zeigen keine Reninsynthese**

Nachdem es gelungen war, eine Primärkultur aus frisch entnommenen Sammelrohrzellen anzulegen, stellte sich die Frage, ob sich für den Nachweis einer lokalen Reninsynthese auch immortalisierte Zelllinien eignen. Nicht zuletzt sollte durch den Wechsel auf immortalisierte Zelllinien auch Zeit, Material und insbesondere der Verbrauch an Versuchstieren eingespart werden.

Für die erste Versuchsreihe fand eine M1-Sammelrohrzelllinie Verwendung. Der Anspruch an diese Zelllinie als Grundlage für eine weiterführende Untersuchung des lokalen RAS war primär der Nachweis einer Reninsynthese in vitro. Im Verlauf wurden die Zellen einer Stimulation mit Angiotensin II verschiedener Konzentrationen ausgesetzt. Nach entsprechender Kultur- bzw. Stimulationszeit wurde eine Quantifizierung der Renin mRNA mittels RTqPCR durchgeführt. Hierbei konnte, trotz eines guten Zellwachstums, weder in der Stimulations- noch in der (nicht stimulierten) Kontrollgruppe reproduzierbar eine signifikante Renin mRNA-Abundanz nachgewiesen werden. Selbst nach zahlreichen Modifikationen, sowohl der Kulturbedingungen, als auch der Stimulationsdauer, zeigte sich keine Renin mRNA Expression in ausreichender Höhe, um weiterführende Untersuchungen zur Regulation durchführen zu können. Um auszuschließen, dass die gewählten Renin-Primer keine gute Amplifikation der Renin mRNA erzielten, wurden weitere Renin-Primer getestet. Dies allerdings ebenfalls ohne Erfolg. Auch mit dem Wechsel auf einen „intron spanning Reninprimer“ gelang kein Nachweis einer relevanten Reninsynthese. Dies spiegelte sich in den Ergebnissen der RTqPCR wieder, bei denen die mRNA Menge des transkribierten Reningens unterhalb einer, mit dieser hochsensitiven Methode, nachweisbarer Konzentration lag.

Im Gegensatz zum Renin erbrachte die Bestimmung der mRNA Expression des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin ein realistisches Ergebnis, das für die Güte der Zellkultur und der anschließenden molekularbiologischen Bestimmungsmethoden spricht. Es lässt sich also feststellen, dass die verwendeten Sammelrohrzelllinien in den Versuchen dieser Arbeit kein



Renin synthetisiert haben und somit der für ein lokales RAS ausschlaggebende Nachweis fehlt. Das Zellmodell konnte deshalb keine Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen. Zwar konnte in früheren Arbeiten eine Reninsynthese in Sammelrohrzellen nachgewiesen werden [29] und darüber hinaus in einer Arbeit aus dem Jahre 2008 [42], ebenfalls in Sammelrohrzellen aus einer M1-Zelllinie stammend, auch ein Regulationsmechanismus durch Angiotensin II, bei den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch das Expressionsniveau von Renin als so extrem gering, dass es als nicht vorhanden eingestuft werden musste. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten Sammelrohrzellen ihre physiologische Eigenschaft, Renin im Rahmen eines gewebständigen RAS zu bilden, *in vitro* verloren haben. Schließlich waren die Zellen einer Zelllinie nicht mehr den differenzierten Zell-Zell-Interaktionen ausgesetzt, wie wir sie für den Zustand *in vivo* annehmen dürfen. Dieses Verhalten ist nicht selten und stellt ein häufiges Problem bei Zellkulturuntersuchungen dar, da während der Kultivierung über längere Zeit die Eigenschaften der Zellen meist nicht konstant bleiben. „Es können typische Zelleigenschaften verloren gehen, aber auch atypische Charakteristika erworben werden“ [61].

Auch die zusätzliche Quantifizierung der Synthese des AT1-Rezeptors, über den Angiotensin II die Reninsynthese der Sammelrohrzellen modulieren kann [27, 28], zeigte eine nur sehr geringe Expression des AT1-Rezeptorgens. Hieraus kann geschlossen werden, dass, selbst wenn die M1-Sammelrohrzellen Renin gebildet hätten, eine Modulation der Reninsynthese aufgrund des nur sehr schwach exprimierten AT1-Rezeptors in diesem Zellmodell nicht zu erwarten gewesen wäre. Die Arbeit an dem M1-Sammelrohrzellmodell wurde deshalb beendet, um sich anschließend einer weiteren Sammelrohrzelllinie zu widmen. Hierbei handelte es sich um mpkCCD-14-Zellen. Diese unterschieden sich allerdings hinsichtlich ihrer Renin- und auch AT1-Rezeptor Expression kaum von den M1-Zellen, waren deshalb als Grundlage für ein „*in vitro* Modell“ zur weiteren Untersuchung eines lokalen RAS ebenfalls nicht geeignet, und wurden verworfen.

Mittlerweile wurden in der Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen zur Expression von Renin in M1-Zellen und anderen Sammelrohrzelllinien durchgeführt. Während M1-Zellen, trotz weiterer Modifikationen der Kulturbedingungen gar kein bis sehr wenig Renin exprimieren, findet sich in mCT1-Zellen Renin mRNA in ausreichender Konzentration um funktionelle Untersuchungen zu dessen Regulation durchführen zu können. Allerdings müssen auch diese

Untersuchungen immer unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass möglicherweise andere Komponenten, die zur regelhaften Regulation der Reninsynthese erforderlich sind, in diesen Zellen nicht exprimiert sein könnten.

### **6. Nebennierenprimärkultur**

#### **Nachweis einer Reninsynthese und Darstellung der regulativen Effekte von Angiotensin II auf Renin in Nebennierenzellen in vitro**

Mehrere Vorarbeiten anderer Gruppen lieferten Hinweise auf eine lokale Reninbildung in der Nebenniere, insbesondere in der Zona glomerulosa [63, 16, 22]. Die regulativen Effekte von Angiotensin II auf die adrenale Reninbildung bzw. -freisetzung wurden allerdings kontrovers diskutiert [63, 62]. Um die früheren Untersuchungen zu überprüfen und weiterführende Untersuchungen zur zellulären Regulation der Reninsynthese und -freisetzung durchführen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Nebennierenzellen in Kultur untersucht. Hier war insbesondere die Wirkung von Angiotensin II auf die Reninbildung bzw. -freisetzung von Interesse. Hierfür wurde die Reninaktivität sowohl im Kulturmedium der Nebennierenprimärkultur als auch im adrenalen Zytoplasma beobachtet. Genauer gesagt wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II und die Stimulation der Reninfreisetzung durch die Behandlung der Zellen mit Forskolin und IBMX untersucht.

Zunächst konnte dabei gezeigt werden, dass im Kulturmedium eine Reninaktivität nachweisbar ist. Weiter ließ sich feststellen, dass Renin von den Nebennierenzellen sezerniert worden war. Hinweise auf eine möglicherweise vorliegende Kontamination der Zellkultur mit anderen Zellen, welche für die Reninbildung verantwortlich sein könnten, gab es nicht. Es kann zwar die Überlegung angestellt werden, ob die adrenalen Zellen in der Kultur Renin sezernierten, das sie vorher in vivo aufgenommen hatten, wahrscheinlicher ist es jedoch, von einer de novo Reninsynthese durch die Nebennierenzellen auszugehen, da sich unter Stimulation der Zellen mit Angiotensin II in vitro, nachgewiesen mittels ELISA eine erhöhte Reninaktivität im Medium zeigte, während in der nicht stimulierten Kontrollgruppe eine, im Vergleich zur Stimulationsgruppe, geringere Reninkonzentration zu verzeichnen war. Es ist also davon auszugehen, dass die Nebennierenzellen unter dem Einfluss von Angiotensin II zu einer vermehrten Reninsekretion bzw. -synthese angeregt werden. Somit ist auch anzunehmen, dass beim lokalen adrenalen RAS hinsichtlich der Wirkung von Angiotensin II

## Diskussion

eine gegensätzliche Regulation im Vergleich zum systemischen RAAS vorliegt. Beim plasmatischen RAAS wirkt Angiotensin II im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmend auf die Reninsynthese und -sekretion der JG-Zellen. Beim lokalen RAS ist die Wirkung von Angiotensin II auf die Reninsynthese und -freisetzung als ein positiver Feedbackmechanismus zu bezeichnen.

Darüber hinaus beschäftigte sich diese Versuchsreihe mit weiteren Mechanismen der Reninfreisetzung. Es ist bekannt, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration eines der wichtigsten intrazellulären Signalmoleküle darstellt, welches die Reninsekretion stimuliert. Durch Zusetzen von IBMX und Forskolin zum Kulturmedium sollte der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht, und die Reninsekretion gesteigert werden. Hier konnte jedoch, anders als bei der Stimulation mit Angiotensin II, keine Steigerung der Reninsekretion oder Erhöhung der Reninaktivität im Kulturmedium beobachtet werden, weswegen die Ergebnisse auch nicht detailliert gezeigt werden.

Patrick J. Mulrow stellte 1989 [63] in der Arbeit „Adrenal Renin: A Possible Local Regulator of Aldosterone Production“ die Hypothese auf, dass adrenal exprimiertes Renin an der Regulation der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa der Nebenniere beteiligt ist. Bestärkt wurde diese Annahme durch Ergebnisse von Nakamura et al. [65], die zeigten, dass die zu erwartende kaliuminduzierte Stimulation der Aldosteronproduktion in vitro unter der Wirkung des ACE-Hemmers Captopril ausblieb. Bei diesem Versuch, der in vitro durchgeführt wurde, stand das Nebennierengewebe nicht unter dem Einfluss des systemischen RAAS, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine lokale Reninsynthese bei der Stimulation der Aldosteronbildung beteiligt sein muss. Aufgrund der Übereinstimmung von Ergebnissen dieser früheren Arbeiten mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit ist die Existenz eines lokalen adrenalen RAS anzunehmen. Darüber hinaus kann von einer Beeinflussung der Aldosteronfreisetzung durch die lokale Reninsynthese ausgegangen werden [65].

Weiter ist aus den Daten dieser Arbeit zu schließen, dass zwischen der lokalen Angiotensin II Konzentration und der Stimulation der Reninsynthese und -sekretion durch Nebennierenzellen ein positiver Zusammenhang besteht. Wird unter dem Einfluss von Angiotensin II vermehrt Renin gebildet, wird wiederum durch das lokal gebildete Renin die Konzentration von Angiotensin II erhöht. Dieses führt in der Nebenniere, insbesondere in der Zona glomerulosa, zu einer vermehrten Freisetzung von Aldosteron und Renin, womit ein sich selbst

## **Diskussion**

verstärkender Prozess im Rahmen der beschriebenen positiven Rückkopplung beginnt. Von dem hierdurch gebildeten Aldosteron ist mit einer Natrium- und Wasserretention durchaus eine systemische Wirkung, vermittelt über den renalen Tubulusapparat, zu erwarten.

Resultiert hierdurch ein erhöhtes intravasales Volumen, ist eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks anzunehmen. Wird dieser Gedanke weitergeführt, so kann vermutet werden, dass dem adrenalen RAS sogar eine Rolle in der Pathophysiologie des arteriellen Hypertonus zugesprochen werden kann. Zum Beweis dieses Zusammenhangs müssen selbstverständlich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### V. Zusammenfassung

Beginnend mit dem Nachweis von extraglomerulär synthetisiertem Renin hat sich bis heute das Bild eines lokalen RAS weiterentwickelt. So können dem gewebständigen RAS lokal regulative Effekte, aber auch eine Beteiligung bei pathophysiologischen Prozessen, wie etwa der diabetischen Nephropathie zugeschrieben werden. Darüber hinaus lassen sich auch grundlegende Unterschiede zwischen dem lokalen und dem systemischen RAS herausarbeiten. Es besteht eine gegensätzliche Regulation der Reninsynthese unter dem Einfluss von Angiotensin II. Auch können das lokale und das plasmatische RAS nicht gänzlich getrennt voneinander betrachtet werden. Hier ist auch eine wechselseitige Beeinflussung denkbar. Mit dem Ziel, das Wissen über die Funktionsweise, insbesondere über die Regulation des gewebständigen RAS zu erweitern, wurde diese Arbeit angefertigt.

In Mikrodisektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass in Sammelrohrzellen eine lokale Reninsynthese stattfindet. Aufbauend auf diesen Nachweis gelang es, durch die Entnahme des inneren Nierenmarks, eine größere Anzahl von Sammelrohrzellen (IMCD Zellen) zur Verfügung zu haben. Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich in der Zellkultur eine, für weitere Untersuchungen ausreichende, Renin Expression. Bei Kultivierungsversuchen mit immortalisierten Zelllinien (M1- und mpkCCD-14-Zelllinien) konnte trotz mehrerer Modifikationen der Versuchsbedingungen, keine signifikante Reninsynthese festgestellt werden. Wie jedoch unter Punkt IV.5. bereits erwähnt, wurde bei Folgeversuchen in der Arbeitsgruppe in Zellen der mCT1-Zelllinie eine, für weitere Versuche geeignete, Renin mRNA Konzentration nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit gelang es, eine Primärzellkultur aus Nebennierenzellen zu etablieren, in der eine Reninsynthese, im Rahmen eines adrenalen RAS, nachzuweisen war. Darüber hinaus konnte auch der regulative Effekt von Angiotensin II auf die lokale Reninsynthese untersucht werden. Hier zeigte sich, gegensätzlich zum plasmatischen RAS, eine Stimulation der Reninaktivität unter dem Einfluss von Angiotensin II.

Abschließend kann somit festgehalten werden, dass es entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit gelang, Zellkulturmodelle u.a. in Form von IMCD Primärkulturen anzulegen, die sogar in vitro eine lokale Reninsynthese zeigten. Aus den Nebennierenprimärkulturen ergaben sich Hinweise auf die Regulation einer extrarenalen, lokalen Reninsynthese.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) **Aguilera, G., Schirar, A., Baukal, A., Catt, K.J., (1981).** Circulating angiotensin II and adrenal receptors after nephrectomy. *Nature*. 1981, 289, S. 507-509.
- 2) **Anderson, E.A., Sinkey, C.A., Lawton, W.J., Mark, A.L., (1989).** Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension*. 1989, 14, S. 177-183.
- 3) **Antonipillai, I., Tan, S.Y., Suzuki, S., Franco-Saenz, R., Mulrow, P.J., (1981).** Active and inactive renin in low renin states: studies in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981, 53, S. 694-697.
- 4) **Awad, A.S., Webb, R.L., Carey, R.M., Siragy, H.M., (2005).** Increased renal production of angiotensin II and thromboxane B2 in conscious diabetic rats. *Am J Hypertens*. 2005, 18, S. 544-548.
- 5) **Baumbach, L., Skott, O., (1986).** Renin release from different parts of rat afferent arterioles in vitro. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1986, 251, S. F12-F16.
- 6) **Bens, M., Vallet, V., Cluzeaud, F., Pascual-Letallec, L., Kahn, A., Rafestin-Oblin, M.E., Rossier, B.C., Vandewalle, A., (1999).** Corticosteroid-Dependent Sodium Transport in a Novel Immortalized Mouse Collecting Duct Principal Cell Line. *J Am Soc Nephrol*. 1999, 10, S. 923-934.
- 7) **Boivin, V., Jahns, R., Gambaryan, S., Ness, W., Boege, F., Lohse, M.J., (2001).** Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2- adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int*. 2001, 59, S. 515-531.
- 8) **Carlsson, S., Skarphedinsson, J.O., Delle, M., Hoffman, P., Thoren, P., (1992).** Reflex changes in post- and preganglionic sympathetic renal nerve activity upon arterial baroreceptor activation and during severe haemorrhage in the rat. *Acta Physiol Scand*. 1992, 144, S. 317-323.
- 9) **Castrop, H., Klar, J., Wagner, C., Höcherl, K., Kurtz, A., (2003).** General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003, 284, S. F518-F524.
- 10) **Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., Wagner, Ch., (2010).** Physiology of Kidney Renin. *Physiol Rev*. 2010, 90, S. 607-673.
- 11) **Chiu, N., Park, I., Reid, I.A., (1996).** Stimulation of renin secretion by the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996, 276, S. 1073-1077.
- 12) **Chiu, T., Reid, I.A., (1996).** Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996, 278, S. 793-799.

- 13) Chiu, Y.J., Hu, S.H., Reid, I.A., (1999). Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999, 290, S. 16-19.
- 14) Deinum, J., Tarnow, L., van Gool, J.M., De Bruin, R.A., Derkx, F.H., Schalekamp, M.A., Parving, H.H., (1999). Plasma renin and prorenin and renin gene variation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1999, 14, S. 1904-1911.
- 15) Deinum, J., Rønn, B., Mathiesen, E., Derkx, F.H., Hop, W.C., Schalekamp, M.A., (1999). Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1999, 42, S. 1006-1010.
- 16) Deschepper, C.F., Ganong, W.F., (1988). Renin and angiotensin in endocrine glands. *In Frontiers in Neuroendocrinology, Volume 10. Edited by L Martini, WF Ganong.* 1988.
- 17) DiBona, G.F., Sawin, L.L., (1985). Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1985, 248, S. F15-F23.
- 18) DiBona, G.F., (2000). Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000, 279, S. R1517-R1524.
- 19) Dinh, D.T., Frauman, A.G., Johnston, C.I., Fabiani, M.E., (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* 2001, 100, S. 481-492.
- 20) Doi, Y., Atarashi, K., Franco-Saenz, R., Mulrow, P.J., (1983). Effects of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. *Hypertension [Supplement].* 1983, 6, S. I/124-I/129.
- 21) Dzau, V.J., Ingelfinger, J., Pratt, R.E., Ellison, K.E., (1986). Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension.* 1986, 8, S. 544-548.
- 22) Field, L.J., McGowan, R.A., Dickinson, D.P., Gross, K.W., (1984). Tissue and gene specificity of mouse renin expression. *Hypertension.* 1984, 6, S. 597-603.
- 23) Friis, U.G., Jensen, B.L., Aas, J.K., Skott, O., (1999). Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res.* 1999, 84, S. 929-936.
- 24) Friis, U.G., Jensen, B.L., Sethi, S., Andreasen, D., Hansen, P.B., Skott, O., (2002). Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res.* 2002, 90, S. 996-1003.

- 25) Fuller, P.J., Yang, J., Young, M.J., (2017).** Coregulators as mediators of mineralocorticoid receptor signalling diversity. *Journal of Endocrinology*. 2017, 234, S. 23-34.
- 26) Ganten, D., Ganten, U., Kubo, S., et al., (1974).** Influence of sodium, potassium, and pituitary hormones on sio-renin in rat adrenal glands. *Am J Physiol*. 1974, 227, S. 224-229.
- 27) Gonzalez, A.A., Liu, L., Lara, L.S., Seth, D.M., Navar, L.G., Prieto, M.C., (2011).** Angiotensin II Stimulates Renin in Inner Medullary Collecting Duct Cells via Protein Kinase C and Independent of Epithelial Sodium Channel and Mineralocorticoid Receptor Activity. *Hypertension*. 2011, 57, S. 594-599.
- 28) Gonzalez, A.A., Lara, L.S., Luffman, C., Seth, D.M., Prieto, M.C., (2011).** Soluble form of the (pro)renin receptor is augmented in the collecting duct and urine of chronic angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension*. 2011, 57, S. 859-864.
- 29) Gonzalez, A.A., Prieto, M.C., (2015).** Renin and the (Pro)renin Receptor in the Renal Collecting Duct. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015, 42(1), S. 14-21.
- 30) Greenberg, S.G., He, X.R., Schnermann, J.B., Briggs, J.P., (1995).** Effect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1995, 268, S. F948-F952.
- 31) Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A., Schweda, F., (2006).** The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res*. 2006, 99, S. 1197-1206.
- 32) Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., Taugner, R., (1990).** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 1990, 70, S. 1067-1116.
- 33) Henrich, W.L., McAllister, E.A., Smith, P.B., Champbell, W.B., (1988).** Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1988, 255, S. F474-F478.
- 34) Höcherl, K., Wolf, K., Castrop, H., Ittner, K.P., Bucher, M., Kees, F., Grobecker, H.F., Kurtz, A., (2001).** Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflügers Arch*. 2001, 442, S. 821-827.
- 35) IBL International GmbH, (2013).** Angiotensin I (PRA) ELISA. *Instructions for Use*. 2013
- 36) Ichihara, A., Hayashi, M., Kaneshiro, Y., Suzuki, F., Nakagawa, T., Tada, Y., Kuora, Y., Nishiyama, A., Okada, H., Uddin, M.N., Nabi, A.H., Ishida, Y., Inagami, T., Saruta, T., (2004).** Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest*. 2004, 114, S. 1128-1135.



- 37) Ichihara, A., Kaneshiro, Y., Takemitsu, T., Sakoda, M., Itoh, H., (2007).** The (pro)renin receptor and the kidney. *Semin Nephrol.* 2007, 27, S. 524-528.
- 38) Ichihara, A., Sakoda, M., Kurauchi-Mito, A., Kaneshiro, Y., Itoh, H., (2009).** Renin, prorenin and the kidney: a new chapter in an old saga. *J Nephrol.* 2009, 22, S. 306-311.
- 39) Ingelfinger, J.R., Pratt, R.E., Ellison, K., Dzau, V.J., (1986).** Sodium Regulation of Angiotensinogen mRNA Expression in Rat Kidney Cortex and Medulla. *J Clin Invest.* 1986, 78, S. 1311-1315.
- 40) Joppien, S., Maier, S.L., Wendling, D., (2011).** Experimentelle Doktorarbeit, 1. Auflage. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.* 2011. ISBN 978-3-437-42696-4
- 41) Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Takemitsu, T., Sakoda, M., Suzuki, F., Nakagawa, T., Hayashi, M., Inagami, T., (2006).** Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor genetransgenic rats. *Kidney Int.* 2006, 70, S. 641-646.
- 42) Kang, J.J., Toma, I., Sipos, A., Meer, E.J., Vargas, S.L., Peti-Peterdi, J., (2008).** The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension.* 2008, 51, S. 1597-1604.
- 43) Karnik, S.S., Unal, H., Kemp, J.R., Tirupula, K.C., Eguchi, S., Vanderheyden, P.M.L., Thomas, W.G., (2015).** Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol Rev.* 2015, 67, S. 754-819.
- 44) Keeton, T.K., Campbell, W.B., (1980).** The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev.* 1980, 32, S. 81-227.
- 45) Kempf, T., Bavendiek, U., Bauersachs, J., (2017).** Neue medikamentöse Therapieansätze bei chronischer Herzinsuffizienz. *Der Internist.* 2017, 58(9), S. 990-999.
- 46) Kirchheim, H., Ehmke, H., Persson, P., (1988).** Physiology of the renal baroreceptor mechanism of renin release and its role in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1988, 62, S. 68E-71E.
- 47) Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Bauer, C., (1984).** Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem Biophys Res Commun.* 1984, 124, S. 359-366.
- 48) Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Taugner, R., Bauer, C., (1986).** Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986, 83, S. 4769-4773.
- 49) Kurtz, A., Götz, K.H., Hamann, M., Wagner, C., (1998).** Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95, S. 4743-4747.

- 50) Kurtz, A., Götz, K.H., Hamann, M., Kieninger, M., Wagner, C., (1998).** Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998, 274, S. F709-F717.
- 51) Le Fevre, M.E., Guild, S.J., Ramchandra, R., Barrett, C.J., Malpas, S.C., (2003).** Role of angiotensin II in the neural control of renal function. *Hypertension.* 2003, 41, S. 583-591.
- 52) Leonard, B.L., Evans, R.G., Navakatikyan, M.A., Malpas, S.C., (2000).** Differential neural control of intrarenal blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000, 279, S. R907-R916.
- 53) Li, C., Siragy, H.M., (2014).** High glucose induces podocyte injury via enhanced (pro)renin receptor-Wnt- $\beta$ -catenin-snail signaling pathway. *PLoS One.* 2014, 9, e89233.
- 54) Lohmeier, T.E., Hildebrandt, D.A., Hood, W.A., (1999).** Renal nerves promote sodium excretion during long-term increases in salt intake. *Hypertension.* 1999, 33, S. 487-492.
- 55) Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., (2010).** Pharmakologie und Toxikologie, 17. Auflage. *Thieme Verlag, Stuttgart.* 2010. ISBN-9783133685177.
- 56) Masilamani, S., Kim, G.H., Mitchell, C., Wade, J.B., Knepper, M.A., (1999).** Aldosterone-mediated regulation of ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit proteins in rat kidney. *The Journal of Clinical Investigation.* 1999, 104, S. 19-23.
- 57) Mendelssohn, F.A.O., (1982).** Angiotensin II is concentrated or locally produced in rat adrenal gland. *Clin Exp Pharmacol Physiol [Supplement].* 1982, 7, S. 3-7.
- 58) Mendes, A.C., Ferreira, A.J., Pinheiro, S.V., Santos, R.A., (2005).** Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regul Pept.* 2005, 125, S. 29-34.
- 59) Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N.G., Reudelhuber, T.L., (1996).** Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension.* 1996, 28, S. 840-846.
- 60) Minuth, W.W., (1994).** Perfusionszellkultur – Eine neue Methode für organspezifische, pathologische und toxikologische Untersuchungen. *MTA.* 1994, 9,1, S. 10-13.
- 61) Minuth, W.W., Strehl, R., Schumacher, K., (2003).** Zukunftstechnologie Tissue Engineering, von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim.* 2003. ISBN 3-527-30793-1
- 62) Mizuno, K., Hoffman, L.H., McKenzie, J.C., Inagami, T., (1988).** Presence of renin secretory granules in rat adrenal gland and stimulation of renin secretion by angiotensin II but not by adreno cortico tropin. *J Clin Invest.* 1988, 82, S. 1007-1016.

- 63) Mulrow, P.J., (1989).** Adrenal Renin: A Possible Local Regulator of Aldosterone Production. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 1989, 62, S. 503-510.
- 64) Nafz, B., Berthold, H., Ehmke, H., Hackenthal, E., Kirchheim, H.R., Persson, P.B., (1997).** Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1997, 273, S. F200-F205.
- 65) Nakamura, M., Misono, K.S., Naruse, M., Workman, R.J., Inagami, T., (1985).** A role for the adrenal renin-angiotensin system in the regulation of potassium-stimulated aldosterone production. *Endocrinology*. 1985, 117, S. 1772-1778.
- 66) Naruse, M., Inagami, T., (1982).** Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982, 79, S. 3295-3299.
- 67) Naruse, M., Sussman, C.R., Naruse, K., et al., (1983).** Renin exists in human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983, 57, S. 482-487.
- 68) Neves, F.A., Duncan, K.G., Baxter, J.D., (1996).** Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension*. 1996, 27, S. 514-517.
- 69) Nishiyama, A., Nakagawa, T., Kobori, H., Nagai, Y., Okada, N., Konishi, Y., Morikawa, T., Okumura, M., Meda, I., Kiyomoto, H., Hosomi, N., Mori, T., Ito, S., Imanishi, M., (2008).** Strict angiotensin blockade prevents the augmentation of intrarenal angiotensin II and podocyte abnormalities in type 2 diabetic rats with microalbuminuria. *J Hypertens*. 2008, 26, S. 1849-1859.
- 70) Noble, A.R., Abu-Kishk, R.A., D'Aloia, M.A., Williams, B.C., Lush, D.J., (1994).** Cyclic GMP-linked pathway for renin secretion. *Kidney Int*. 1994, 46, S. 1588-1590.
- 71) Oshima, Y., Morimoto, S., Ichihara, A., (2014).** Roles of the (pro)renin receptor in the kidney. *World J Nephrol*. 2014, 3(4), S. 302-307.
- 72) Pratt, R.E., Carleton, J.E., Richie, J.P., Heusser, C., Dzau, V.J., (1987).** Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84, S. 7837-7840.
- 73) Price, D.A., Porter, L.E., Gordon, M., Fisher, N.D., De'Oliveira, J.M., Laffel, L.M., Passan, D.R., Williams, G.H., Hollenberg, N.K., (1999).** The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *I Am Soc Nephrol*. 1999, 10, S. 2382-2391.
- 74) Prieto-Carrasquero, M.C., Harrison-Bernard, L.M., Kobori, H., Ozawa, Y., Hering-Smith, K.S., Hamm, L.L., Navar, L.G., (2004).** Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension*. 2004, 44, S. 223-229.
- 75) Prieto-Carrasquero, M.C., Kobori, H., Ozawa, Y., Gutierrez, A., Seth, D., Navar, L.G., (2005).** AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005, 289, S. F632-F637.

- 76) Prieto-Carrasquero, M.C., Botros, F.T., Pagan, J., Kobori, H., Seth, D.M., Casarini, D.E., Navar, L.G., (2008).** Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*. 2008, 51, S. 1590-1596.
- 77) Radna, R.L., Caton, Y., Jha, K.K., Kaplan, P., Li, G., Traganos, F., Ozer, H.L., (1988).** Growth of immortal simian virus 40 tsA-transformed human fibroblasts is temperature dependent. *Mol. Cell. Biol.* 1988, 9, S. 3093-3096.
- 78) Rohrwasser, A., Morgan, T., Dillon, H.F., Zhao, L., Callaway, C.W., Hillas, E., Zhang, S., Cheng, T., Inagami, T., Ward, K., Terreros, D.A., Lalouel, J.M., (1999).** Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*. 1999, 34, S. 1265-1274.
- 79) Rohrwasser, A., Ishigami, T., Gociman, B., Lantelme, P., Morgan, T., Cheng, T., Hillas, E., Zhang, S., Ward, K., Bloch-Faure, M., Meneton, P., Lalouel, J.M., (2003).** Renin and kallikrein in connecting tubule of mouse. *Kidney Int.* 2003, 64, S. 2155-2162.
- 80) Ryan, J.W., (1967).** Renin-like enzyme in the adrenal gland. *Science*. 1967, 158, S. 1589-1590.
- 81) Sauer, B., Henderson, N., (1988).** Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85, S. 5166-5170.
- 82) Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M., (2010).** Physiologie des Menschen, 31. Auflage. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg*. 2010. ISBN-13 978-3-642-01650-9
- 83) Schmitz, S., (2011).** Der Experimentator „Zellkultur“. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*. 2011. ISBN 978-3-8274-2572-0
- 84) Schnermann, J., Briggs, J.P., (2008).** Function of the juxtaglomerular apparatus; control of glomerular hemodynamics and renin secretion. In: Alpern R.J., Hebert S.C., eds. *The Kidney Physiology and Pathophysiology*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 2008, S. 589-626.
- 85) Schricker, K., Kurtz, A., (1993).** Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 1993, 265, S. F180-F186.
- 86) Schweda, F., Kurtz, A., (2004).** Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand*. 2004, 181, S. 383-390.
- 87) Schweda, F., Friis, U., Wagner, Ch., Skott, O., und Kurtz, A., (2007).** Renin Release. *Physiology*. 2007, 22, S. 310-319.

- 88) Shier, D.N., Kusano, E., Stoner, G., Franco-Saenz, R., Mulrow, P.J.** Production of renin, angiotensin II and aldosterone by adrenal explant cultures. Response to potassium and converting enzyme inhibition. *Endocrinology, in press*.
- 89) Stoos, B.A., Naray-Fejes-Toth, A., Carretero, O.A., Ito, S., Fejes-Toth, G., (1991).** Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line. *Kidney International*. 1991, 39, S. 1168-1175.
- 90) Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B., Dietel, M., (2016).** Harrisons Innere Medizin, Deutsche Ausgabe, 19. Auflage, Band 1-3. *ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin*. 2016. ISBN 978-3-88624-560-4
- 91) Tigerstedt, R., Bergmann, P.G., (1898).** Niere und Kreislauf. *Skand. Arch. Physiol*. 1898, 8, S. 223-271.
- 92) Thrasher, T.N., (1994).** Baroreceptor regulation of vasopressin and renin secretion: low-pressure versus high-pressure receptors. *Front Neuroendocrinol*. 1994, 15, S. 157-196.
- 93) Vandongen, R., Peart, W.S., Boyd, G.W., (1973).** Adrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *Circ Res*. 1973, 32, S. 290-296.
- 94) Wagner, C., Kurtz, A., (1998).** Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998, 7, S. 437-441.
- 95) Warnecke, C., Sürder, D., Curth, R., Fleck, E., Regitz-Zagrosek, V., (1999).** Analysis and functional characterization of alternatively spliced angiotensin II type 1 and 2 receptor transcripts in the human heart. *J Mol Med (Berl)*. 1999, 77, S. 718-727.
- 96) Weinberger, M.H., Aoi, W., Henry, D.P., (1975).** Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ Res*. 1975, 37, S. 318-324.
- 97) Weir, M.R., Dzau, V.J., (1999).** The rennin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999, 12, S. 205S-213S.
- 98) Welsch, U., Deller, T., (2010).** Lehrbuch Histologie, 3. Auflage. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München*. 2010. ISBN 978-3-437-44431-9
- 99) Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., Shay, J.W., (1989).** Reversible cellular senescence: A two-stage model for the immortalization of normal diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol*. 1989, 9, S. 3088-3092.
- 100) Zilles, K., Tillmann, B.N., (2010).** Anatomie. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg*. 2010. ISBN 978-3-540-69481-6

## VII. Anhang

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
Ang	Angiotensin
ANP	artriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AQP-2	Aquaporin-2
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovines-Serum-Albumin (Rinderserumalbumin)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gesamtwasserhärte
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD-Zellen	Sammelrohrzellen
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
CP	Crossing Point
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium (Nährmedium)
DMEM/F12	Nährmedium für die Zellkultur (Mixture)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	nukleolytisches Enzym (Nuklease)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay

ENaC	epithelialer Natriumkanal
EPO	Erythropoietin (ein Glykoprotein-hormon)
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
G	Gramm
G	Zentrifugalkraft
GCA-flox wt/Podocin Cre	Wildtyp-Mäuse
GFP	grün-fluoreszierendes Marker-Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
Cre	cAMP response element
Ham's F12	Nährmedium (modifiziert)
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HIF	hypoxie-induzierter-Faktor (Transkriptionsfaktor, regelt die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish-Peroxidase)
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IL 1 beta	Interleukin 1 beta (Entzündungsmediator)
IMCD-Zellen	Sammelrohrzellen des inneren Nierenmarks
in vitro	im Reagenzglas (außerhalb des Organismus)
in vivo	im lebendigen Organismus
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
JG	juxtaglomerulär
KHK	koronare Herzkrankheit
L	Liter
M	Masse
M1	murine Sammelrohrzelllinie
MAPK	mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
Mg	Milligramm

Min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
mosmol	milliosmol
mpkCCD	Maus-Zelllinie
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NKCC-2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter
nM	nanomolar (nmol/l)
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
osmol	Einheit für die Menge osmotisch wirksamer Teilchen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH-Wert	Zeigt den sauren, basischen oder neutralen Wert bei wässrigen Lösungen
pM	picomolar (pmol/l)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Poly-A-Bereich	Bereich der mRNA
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
PRR	Prorenin-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Enzym (Ribonuklease)
ROMK	Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks
RPL32	ribosomales Protein L32
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	real-time-PCR (Echtzeit-PCR)



RTqPCR	quantitative Echtzeit-PCR
SGLT (1/2)	Natrium (Sodium)/Glukose Cotransporter
Sec.	Sekunde
Std.	Stunde
TGF-beta	transformierender Wachstumsfaktor beta
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor (Botenstoff)
TRIsure™	Reagenz zur Isolierung von DNA und RNA
U	Umdrehung
V	Volumen
VSMCs	glatte Gefäßmuskelzellen
Well-Platten	Mikrotiterplatten für mikrobiologische Arbeitsgänge
Wnt	ein Signalprotein
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar (μmol/l)
B	Beta (Massenkonzentration)
°C	Grad Celsius
%	Prozent (Hundertstel)

## 2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Synthese und Sekretion von Renin und Prorenin (aus: Schweda, et al., *Physiology*, 2007, 22, S. 311 [87])
- Abb. 2:** Schematische Darstellung des RAAS (erstellt nach Lüllmann, Mohr, Hein, *Pharmakologie und Toxikologie*, 2010, S. 134-138 [55] und Schmidt, Lang, Heckmann, *Physiologie des Menschen*, 2010, S. 674 [82])
- Abb. 3:** intrazelluläre Signalkaskade für die Stimulation und Inhibition der Reninsekretion (aus: Schweda, et al., *Physiology*, 2007, 22, S. 314 [87])
- Abb. 4:** Darstellung der Rekombination bei mT/mG-Reporterermäusen (*eigene Zeichnung*)
- Abb. 5:** Nierenverdau unter dem Mikroskop (*eigene Aufnahme vom 24.07.2014*)
- Abb. 6:** Nierenverdau mit GFP-markierten Sammelrohrzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (*eigene Aufnahme vom 20.05.2014*)
- Abb. 7:** Darstellung der mit GFP markierten Sammelrohre des inneren Nierenmarks unter dem Fluoreszenzmikroskop (*eigene Aufnahme vom 20.05.2014*)
- Abb. 8:** Renin mRNA Expression in isolierten Sammelrohren der Nierenrinde und des äußeren Nierenmarks sowie im inneren Nierenmark
- Abb. 9:** Aquaporin-2 mRNA Expression in isolierten Sammelrohren der Nierenrinde und des äußeren Nierenmarks sowie im inneren Nierenmark
- Abb. 10:** Renin mRNA Expression in IMCD Zellen im Vergleich zu der Renin mRNA Expression in einer nativen (Gesamt)-Niere
- Abb. 11:** Aquaporin-2 mRNA Expression in IMCD Zellen im Vergleich zu der Renin mRNA Expression in einer nativen (Gesamt)-Niere
- Abb. 12:** real-time-PCR zur semiquantitativen Messung der Renin mRNA in der Sammelrohrzelllinie M1
- Abb. 13:** Renin mRNA Expression in Nebennierenzellen (linke Abbildung) und in Zellen der Nieren (Rinde) (rechte Abbildung) unter Stimulation mit Angiotensin II
- Abb. 14:** Reninaktivität/Konzentration gemessen im Kulturmedium (Überstand) einer Nebennierenkultur (linke Abbildung) und einer Zellkultur mit kortikalen Nierenzellen (rechte Abbildung) jeweils unter Stimulation mit Angiotensin II (10 nM, 100 nM)
- Abb. 15:** Reninaktivität/Konzentration gemessen im Kulturmedium (Überstand) einer Nebennierenkultur unter Stimulation mit Angiotensin II (100 pM, 1, 10 und 100 nM)

## **Erklärung**

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

.....

Martin Fuchs

Burglengenfeld, den 08.03.2020

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung meiner Doktorarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Frank Schweda für die Vergabe der Doktorandenstelle und die Vorhaltung der dazugehörigen Gerätschaften und Haushaltsmittel für die Erstellung der Arbeit zu dem überaus interessanten und medizinisch zukunftsweisenden Thema. In besonders anspornender Weise konnte mich Herr Prof. Schweda durch seine enorme fachliche Kompetenz und mit seinen Ratschlägen sowohl beim wissenschaftlichen Arbeiten als auch bei der schriftlichen Abfassung der vorliegenden Arbeit immer wieder motivieren und trug damit maßgeblich zum Gelingen der durchgeführten Versuchsreihen und der vorliegenden Doktorarbeit bei. Meine hieraus gewonnenen Kenntnisse, auf die ich sowohl in meiner bisherigen, medizinischen Berufslaufbahn als auch sicher in meinem zukünftigen Berufsleben immer wieder dankend zurückgreifen kann, sind eine wertvolle Grundlage und Bereicherung für meine Tätigkeit als Arzt.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Laborteam der Arbeitsgruppe Schweda bedanken. Neben der fachlichen Unterstützung und Hilfestellung, welche ich hier erfahren durfte, wurde ich auch sehr freundschaftlich in das Team aufgenommen. Hierfür ein Dankeschön an Regine Volkmann, Frieda Webinger, Robert Götz, Dr. Anna Federlein, Dr. Daniela Valetta-Theis, Dr. Janina Staffel und insbesondere an Katharina Ortmaier, die mir mit großer Geduld und viel Verständnis von Beginn an bei der Laborarbeit zur Seite stand.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets unterstützt und mit Rat und Tat begleitet haben.

Abschließend möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Freundin Eva bedanken, die nicht nur großes Verständnis zeigte, sondern mich darüber hinaus auch immer wieder motiviert und unterstützt hat und dabei selbst vor nächtlichen „Laborfahrten“ nicht zurückschreckte.