

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr.med. vet. Dr. med. Dr. med. habil. Fred Sinowatz

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

(Prof. Dr. med. Armin Kurtz)

Isolierung reninbildender Zellen der Mausniere

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Leonhard Hirsch

aus Pürkwang

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz
Korreferent:	Univ.-prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	7
1.2. Das Blutgefäßsystem der Niere	8
1.2.1. Das Blutgefäßsystem in der adulten Niere	8
1.2.2. Das Blutgefäßsystem in der juvenilen Niere.....	10
1.3. Die juxtaglomeruläre Zelle	12
1.4. Renin.....	13
1.5. Renales Reninexpressionsmuster.....	14
1.5.1. Reninexpression während der murinen Nephrogenese	14
1.5.2. Reninexpression nach Entkopplung des RAAS	15
1.5.3. Calcium als Effektor der Reninexpression	19
1.6. Bisherige Methoden zur Aufreinigung von Reninzellen.....	20
1.7. Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Material	26
2.1.1. Geräte	26
2.1.2. Verbrauchsmaterial	27
2.1.3. Chemikalien, Beads, Enzyme, Kits	28
2.1.4. Primer	30
2.1.5. Antikörper	30
2.1.6. Puffer und Lösungen.....	31
2.1.7. Software und Internetdienste	34
2.2. Methoden	35
2.2.1. Versuchstiere	35

2.2.2. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986).....	35
2.2.3. Bead-Perfusion.....	39
2.2.4. Magnetseparation nach Takemoto et al. (2002).....	43
2.2.5. Molekularbiologische Methoden	46
2.2.6. Immunhistochemische Färbung	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)	53
3.1.1. Unbehandelter Wildtyp	54
3.1.2. Losartan stimulierter Wildtyp.....	55
3.2. Modifikation der JG-Zell-Präparation.....	56
3.2.1. Variation der Verdaulösung.....	56
3.2.2. Vorperfusion	58
3.2.3. Verkürzung der Verdauzeit.....	59
3.3. Beadperfusion	61
3.3.1. Beadperfusion an unbehandelten Mäusen	61
3.3.2. Beadperfusion an Low Salt und Enalapril stimulierten Mäusen	64
3.3.3. Beadperfusion an Losartan stimulierten Mäusen	67
3.3.4. Vitalitätskontrolle anhand Zellkultur.....	68
4. Diskussion.....	71
4.1. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)	72
4.1.1. Schwierigkeiten und Verbesserungen	72
4.1.2. Standardprotokoll bei unbehandelten Mäusen	73
4.1.3. Standardprotokoll bei Losartan stimulierten Mäusen	74
4.2. Modifikation der JG-Zell-Präparation.....	75
4.2.1. Variation der Verdaulösung.....	75
4.2.2. Vorperfusion	75

4.2.3. Verkürzung der Verdauzeit.....	76
4.2.4. Folgerungen anhand der Modifikationen.....	77
4.3. Beadperfusion	78
4.3.1. Vorüberlegungen zur Beadperfusion	78
4.3.2. Beadperfusion an unbehandelten Mäusen	79
4.3.3. Beadperfusion an Low Salt und Enalapril stimulierten Mäusen	84
4.3.4. Schwierigkeiten bei der Beadperfusion adulter Mäuse	87
4.3.5. Beadperfusion an Losartan stimulierten Mäusen	87
4.4. Ausblick.....	89
5. Zusammenfassung	92
6. Summary	95
7. Literaturverzeichnis	98
8. Anhang	105
8.1. Abbildungsverzeichnis	106
8.2. Abkürzungsverzeichnis	111
8.3. Danksagung	115

1. Einleitung

1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist einer der wichtigsten Regulatoren des Blutdrucks, und des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers. Das RAAS besteht aus der Aspartylprotease Renin, dem Glykoprotein Angiotensin und dem Steroidhormon Aldosteron.

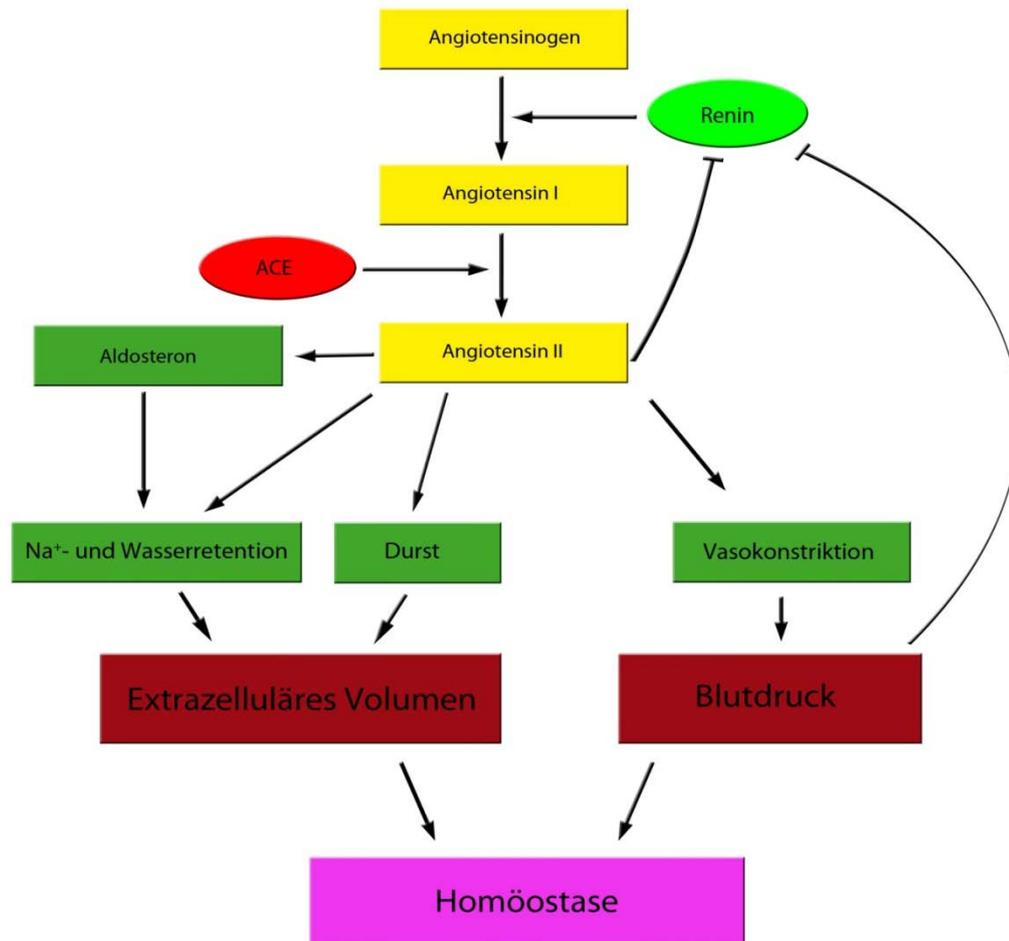


Abb. 1.1: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Im Plasma zirkulierendes Renin spaltet vom Angiotensinogen, einem aus der Leber stammenden Oligopeptid, das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (AngI) ab. AngI wird anschließend durch das im Lungenepithel produzierte Angiotensin Converting Enzyme (ACE) um zwei Aminosäuren zu Angiotensin II (AngII) verkürzt. Das Oktapeptid AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) stellt die aktive und vasokonstriktorisch wirksame Komponente dar. Die Signalweiter-

leitung erfolgt über AngII-Rezeptoren (AT₁-, AT₂-Rezeptor), welche sich auf Zellen des kardiovaskulären, des endokrinen und des Endothelsystems befinden (Unger et al., 1996; Ardaillou, 1999; Grobecker, 1999). In der Niere wird der physiologische Effekt des AngII hauptsächlich über den AT₁-Rezeptor vermittelt (Timmermans et al., 1993). Von dessen zwei Isoformen AT_{1a} und AT_{1b}, welche in ihrer Aminosäurestruktur zu 94% identisch sind, scheint vor allem der AT_{1a}-Rezeptor bedeutend für das RAAS zu sein (Iwai und Inagami, 1992). Mäuse mit einer Deletion des AT_{1a}-Rezeptor-Gens zeigen durch verminderten Blutdruck und gesteigerte Reninexpression ein Aussetzen der kompensatorischen Effekte des RAAS (Sugaya et al., 1995). Neben dem direkten vasokonstriktorischen Effekt löst AngII über das zentrale Nervensystem ein Durstgefühl aus. Zudem wird die Nebennierenrinde zur Synthese und Ausschüttung des Hormons Aldosteron angeregt, welches eine verstärkte Rückresorption von Kochsalz und Wasser in der Niere bewirkt. Der daraus resultierende Anstieg des Blutvolumens führt zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Hackenthal et al., 1990).

1.2. Das Blutgefäßsystem der Niere

1.2.1. Das Blutgefäßsystem in der adulten Niere

Nicht unwesentlich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind die Blutgefäße der Niere. Die Blutversorgung der Niere ist außerordentlich intensiv. Etwa 20% der vom Herzen geförderten Blutmenge durchströmt beide Nieren. Dabei ist die Durchblutung innerhalb des Nierenparenchyms nicht homogen. So entfallen rund 80% der gesamten renalen Durchblutung auf den Kortex, während 15% juxtamedullär und nur 5% in der inneren Medulla gemessen werden (Aukland, 1975; Fourman und Moffat, 1971).

Die Blutzufuhr der Niere erfolgt über die Arteria renalis, welche direkt aus der Aorta abzweigt. Diese teilt sich im Hilusbereich und ihre Äste treten in den Sinus renalis ein. Zwischen den Nierenlappen ziehen die Arteriae interlobares renis ausgehend vom Sinus renalis zentrifugal in Richtung Nierenrinde. Entlang der Mark-Rinden-Grenze ziehen die Arteriae arcuatae bogenförmig in das Innere der Nierenlappen. Von den Arteriae arcuatae zweigen die Arteriae interlobulares ab. Sie treten in die Nierenrinde ein, wobei sich ihre Endäste in der Nierenkapsel

verzweigen. In der Nierenrinde entspringen aus den Arteriae interlobulares die afferenten Arteriolen, welche über den Gefäßpol in ein Nierenkörperchen eintreten, um dort das Kapillarknäuel des Glomerulus zu bilden. Alle Arterien der Niere sind Endarterien und besitzen daher keine Anastomosen untereinander.

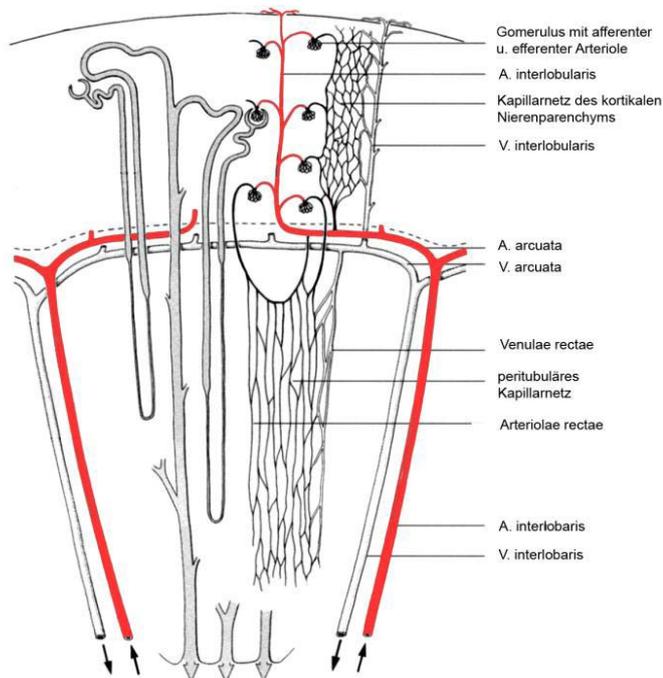


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Vaskularisation der Niere (nach König und Liebich, 2005).

Die Glomeruluskapillaren laufen wieder zusammen und verlassen als Arteriola glomerularis efferens am Gefäßpol das Nierenkörperchen. Da sich die Kapillaren hier wieder zu einem arteriellen Gefäß sammeln, wird dies als Wundernetz bezeichnet. Die efferente Arteriole ergießt sich dann in das eigentliche Kapillargebiet um die Tubuli. Zur Versorgung des Nierenmarks ziehen zentripetal Arteriolen rectae, ausgehend von den efferenten Arteriolen oder den Arteriae arcuatae. Im Nierenmark finden sich somit anstatt größeren Gefäßen nur Kapillarschlingen, welche absteigend arteriell und aufsteigend venös sind. Die Venen verhalten sich wie die Arterien, wobei eine Entsprechung für die Arteriolen glomerulares fehlt. Sie vereinigen sich zur Vena renalis, welche nach Austritt aus dem Hilus in die Vena cava caudalis mündet (Salomon et al., 2005; König und Liebich, 2005).

1.2.2. Das Blutgefäßsystem in der juvenilen Niere

Die Angiogenese der Mausniere beginnt am zwölften Embryonaltag mit der sich entwickelnden Nierenarterie und setzt sich über die Interlobulararterien bis hin zu den arcuaten Arterien fort. Diese arcuaten Arterien lassen sich in arcuate Hauptstämme und die davon abzweigenden arcuaten Seitenäste (Abb. 1.3) gliedern (Sauter et al., 2008).

Noch während der pränatalen Phase zeigen sich erste Anzeichen der Bildung von Interlobulararterien in der subkapsulären Zone (Abb. 1.3a). Im Laufe der Entwicklung zeigt sich eine stetig wachsende Anzahl von afferenten Arteriolen, welche sowohl aus den arcuaten Haupt-, als auch aus den arcuaten Seitenästen hervorgehen (zu sehen z.B. an pp1 Abb. 1.3a+b). Ausgehend von den sich entwickelnden Interlobulararterien beginnen sich ab dem dritten postpartalen Tag auch in diesen Gefäßabschnitten afferente Arteriolen zu entwickeln. Bis zum zehnten Tag nach der Geburt nimmt die Reifung dieser Gefäße immer weiter zu.

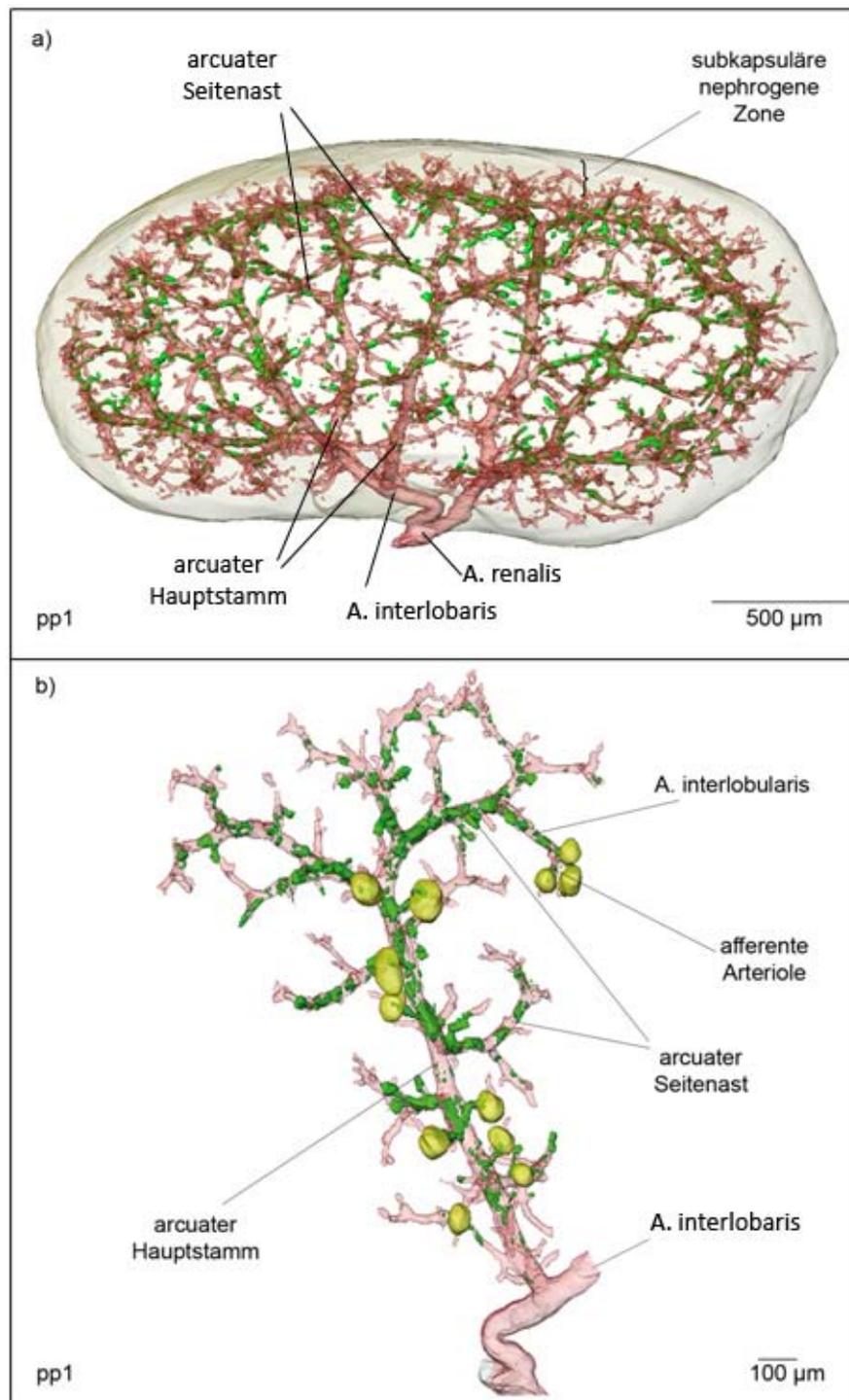


Abb. 1.3: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp1
a) im arteriellen Gefäßsystem (rot);
b) in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb)
 (nach Sauter et al., 2008).

1.3. Die juxtaglomeruläre Zelle

Die juxtaglomerulären Zellen befinden sich in der Tunica Media der afferenten Nierenarteriolen an der Eintrittsstelle in das Kapillarnetzwerk des Glomerulus. Aufgrund ihrer kubischen Form, ähnlich einer Epithelzelle, werden sie auch juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JGE-Zellen) genannt und unterscheiden sich daher von den sie umgebenden vaskulären Glattmuskelzellen und Mesangialzellen. Zusammen mit den Macula densa Zellen, den extraglomerulären Mesangial- und den endothelialen Glattmuskelzellen bilden sie den juxtaglomerulären Apparat (Taugner et al., 1984).

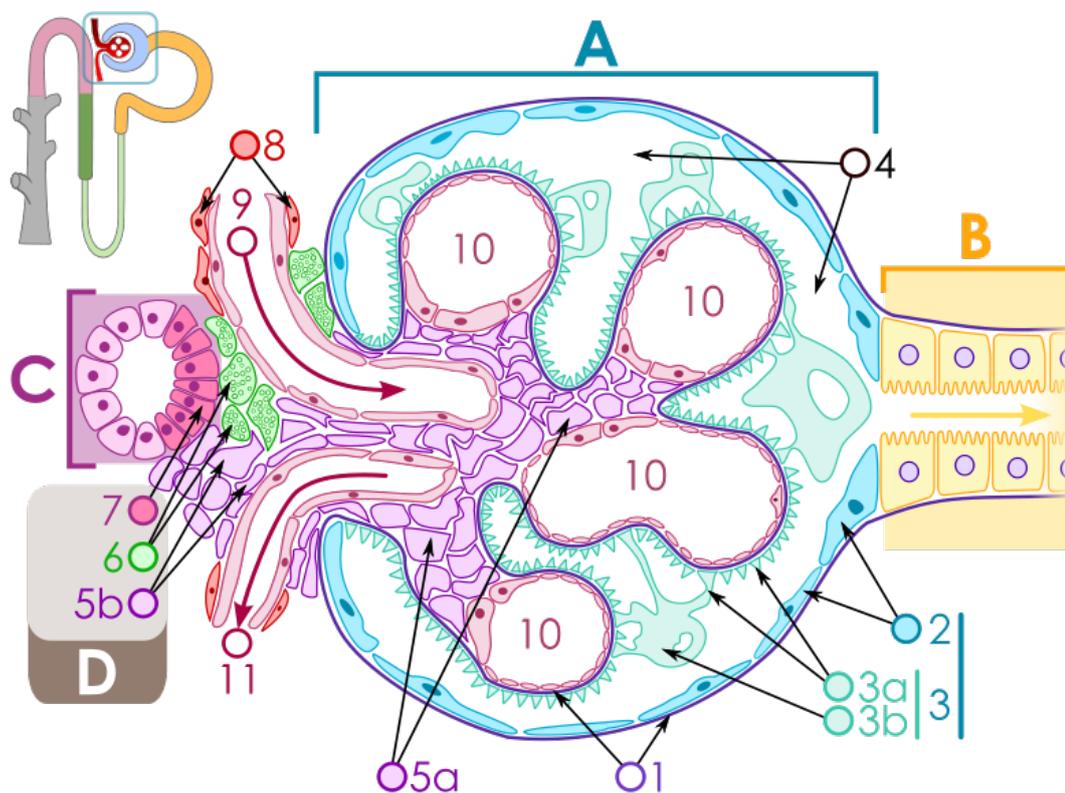


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau des Nierenkörperchens nach Michał Komorniczak (2009):

- | | |
|---|---|
| A – Nierenkörperchen | 6. Juxtaglomeruläre Zellen |
| B – Proximaler Tubulus | 7. Macula densa |
| C – Distaler gewundener Tubulus | 8. Myozyten (Muskelzellen der Arteriolenwand) |
| D – Juxtaglomerulärer Apparat | 9. Arteriola afferens |
| 1. Basalmembran (Basal lamina) | 10. Glomeruläre Kapillaren |
| 2. Bowmankapsel – Parietalschicht | 11. Arteriola efferens |
| 3. Bowmankapsel – Viszeralschicht | |
| 3a. Podozytenfüßchen | |
| 3b. Podozyt | |
| 4. Lumen der Bowman-Kapsel (Harnraum) | |
| 5a. Mesangium – Die intraglomerulären Mesangiumzellen | |
| 5b. Mesangium – Die extraglomerulären Mesangiumzellen | |

Als auffälliges Charakteristikum besitzen sie eine Vielzahl von elektronenoptisch dichten Reninspeichervesikeln, obwohl Anzeichen einer Exocytose nur selten zu beobachten sind. Diese vesikulären Strukturen weisen eine rhomboide, runde oder auch zisternenartige Ausprägungsform auf (Abb. 1.3).

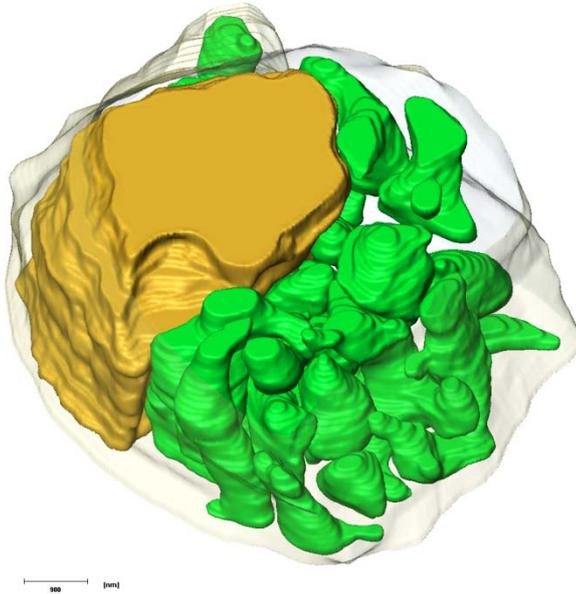


Abb. 1.5: 3D-Rekonstruktion einer juxtaglomerulären Zelle; Grün: Renin in vesikulären Strukturen, gelb: Zellkern. Bar=100nm. (Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dominik Steppan, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

1.4. Renin

Aufgrund eines Überschusses an Angiotensinogen und ACE stellt die Aspartyl-Protease Renin den limitierenden Faktor der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade dar (Kurtz, 1989; Peters und Clausmeyer, 2002; Mercure et al., 1998). Durch selektive Abspaltung des Dekapeptids AngI von Angiotensinogen regelt Renin somit auch die Aktivität des RAAS. Seit seiner Entdeckung vor mehr als hundert Jahren wurde eine Vielzahl von Geweben entdeckt, welche das Renin exprimieren und das Renin oder zumindest Prorenin beinhalten. Die große Mehrheit des zirkulierenden und biologisch aktiven Renins stammt aus reninproduzierenden Zellen der Niere, wohingegen extrarenale Zellen nur Prorenin freisetzen. Bei nephrectomierten Tieren ist demnach auch kein zirkulierendes Renin nachzuweisen (Sealy et al., 1988). Neben den juxtaglomerulären Zellen der Niere wurde die Produktion von Renin in mononuklearen Zellen, wie Mastzellen (Silver et al., 2004) und Makrophagen

(Iwai et al., 1996), steroidbildenden Zellen im Nebennierenkortex, Theca Interna Zellen des Ovars und Leydig Zwischenzellen des Hodens entdeckt (Naruse et al., 1985; Deschepper et al., 1986; Itskovitz et al., 1992).

1.5. Renales Reninexpressionsmuster

Generell zeigt die Reninexpression bei allen Spezies während der Nephrogenese eine schrittweise Verlagerung von den großen Gefäßen bis hin zur klassischen juxtaglomerulären Position im Adultzustand. Zunächst findet man reninbildende Zellen entlang des gesamten präglomerulären Gefäßbaumes in der Media größerer Gefäße, wie der Nierenarterie, den Interlobararterien und den Arteriae arcuatae. Nach und nach verschwinden die Reninzellen aus den größeren Gefäßen und sind schließlich nur noch in den afferenten Arteriolen an den Gefäßpolen der Glomeruli zu finden (Richoux et al., 1987; Minuth et al., 1981; Celio et al., 1985).

1.5.1. Reninexpression während der murinen Nephrogenese

Die typische juxtaglomeruläre Position ist das Endergebnis einer höchst wandlungsfähigen Reninexpression während der Nierenentwicklung (Sauter et al., 2008). Im Metanephron zeigen reninbildende Zellen ein charakteristisches Entwicklungsmuster. Einige Forscher erkennen schon im undifferenzierten Mesenchym reninbildende Zellen (Sequeira Lopez et al., 2001). Bei Mäusen lässt sich die Reninexpression der Niere ab dem Embryonaltag 15 (E15) entlang der arcuaten Gefäßstämme beobachten, wobei diese bis zur Geburt zunimmt.

Nach der Geburt verschwindet das Renin größtenteils aus den arcuaten Hauptästen. Die Reninexpression lässt sich dann vermehrt in den dickeren arcuaten Seitenästen und in noch größerem Maße an den juxtamedullären afferenten Arteriolen finden. Dabei ist sie an den juxtaglomerulären Enden am höchsten ausgeprägt. Nach und nach verringert sich die Anzahl der reninbildenden Zellen auch in den arcuaten Seitenästen. In diesen Gefäßen hat sich die Reninexpression von den proximalen hin zu den mehr distalen Aufzweigungen, einschließlich der afferenten Arteriolen, verlagert. Ab dem siebten Tag nach der Geburt (pp7) zeigt sich die Reninexpression nur noch am terminalen Ende der afferenten Arteriolen, welche von den arcuaten Seitenästen abzweigen. Ab Tag 10 nach der Geburt (pp10) ist die Reninexpression schließlich an der juxtaglomerulären Position der

afferenten Arteriolen in der juxtamedullären Zone und der Mitte des Kortex zu finden (siehe Abb. 1.6) (Sauter et al., 2008).

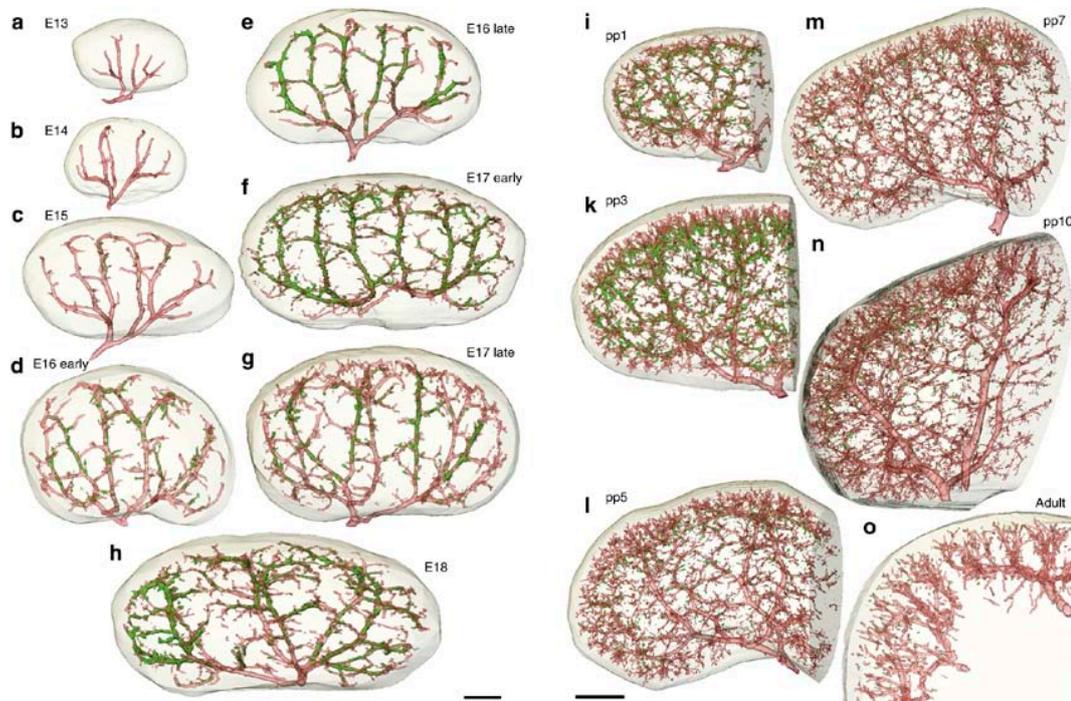


Abb. 1.6: Rekonstruktion ganzer Mausnieren während der Entwicklung mit den immunoreaktiven Bereichen für Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Bar = 300 μ m für Embryonalstadien (a-h) und 500 μ m für postnatale Stadien (i-o). **(a)** Tag E13, **(b)** Tag E14, **(c)** Tag E15, **(d)** früher Tag E16, **(e)** später Tag E16, **(f)** früher Tag E17, **(g)** später Tag E17, **(h)** Tag E18, **(i)** postnataler Tag 1 (pp1), **(k)** pp3, **(l)** pp5, **(m)** pp7, **(n)** pp10 und **(o)** (adult) Tag 90 (Sauter et al., 2008).

1.5.2. Reninexpression nach Entkopplung des RAAS

Bringt man die Homeostase von Natrium oder Blutdruck aus dem Gleichgewicht, führt dies über eine Wiedereinführung der Reninproduktion in der Tunica Media von vorgeschalteten präglomerulären Gefäßen zu einem Anstieg der reninbildenden Zellen (Cantin et al., 1977; Gomez et al., 1989). Zellen, welche die Reninexpression während der Nierenentwicklung abgeschaltet haben, können also beim adulten Tier wieder reaktiviert werden, um Renin zu produzieren (Sequeira Lopez et al., 2004). Per Definition sind diese rekrutierten Zellen keine JG Zellen und es ist unklar, ob diese Zellen alle Funktionsweisen der JG Zellen aufweisen, obwohl sie die Fähigkeit von Reninbildung und -speicherung mit ihnen teilen (Kim et al., 1989). Eine pharmakologische Hemmung des RAAS in der adulten Niere, wie etwa durch den ACE-Hemmer Enalapril, vermehrt die Zahl der

reninbildenden Zellen in präglomerulären Gefäßen und erzeugt so ein Verteilungsmuster, welches in etwa das einer sich entwickelnden Niere widerspiegelt (Gomez et al., 1990). In diesem Zusammenhang spricht man hier auch von einer retrograden Rekrutierung reninproduzierender Zellen. Auch Salzverlust ist eine Situation, in der eine kompensatorische Aktivierung des RAAS erforderlich wird.

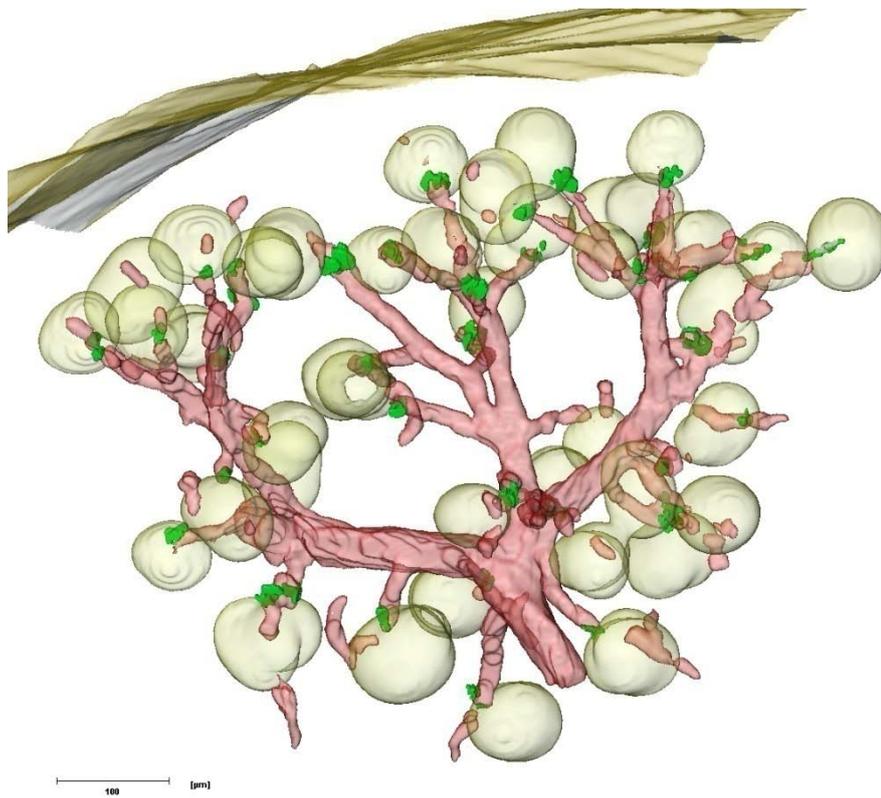


Abb. 1.7: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immunoreaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten Wildtypmaus. Bar=100µm. (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

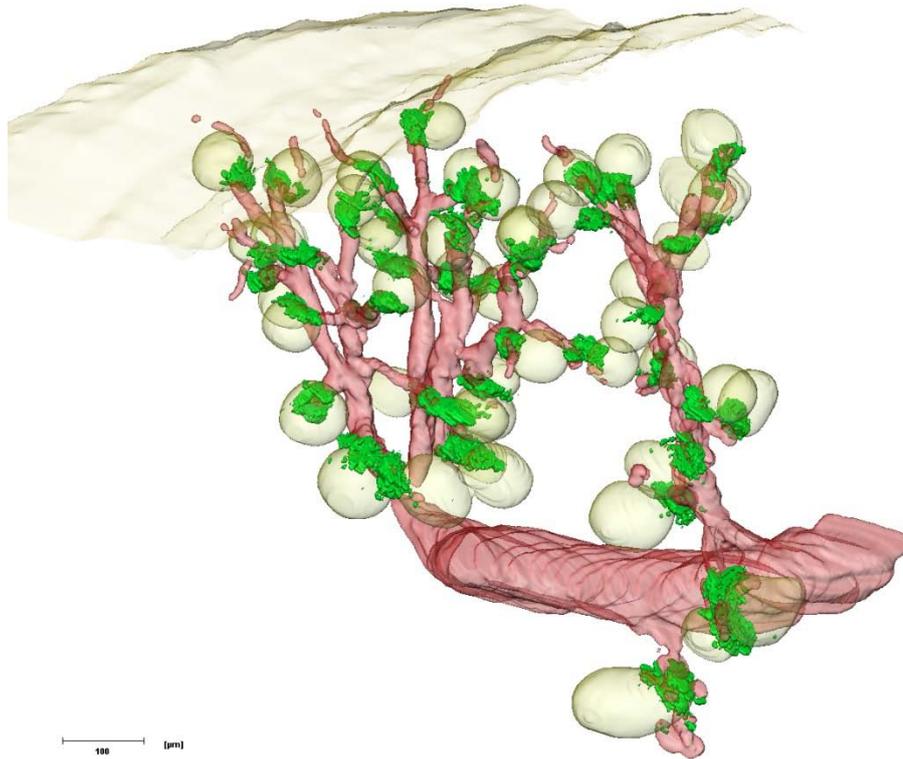


Abb. 1.8: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immunoreaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten Wildtypmaus nach dreiwöchiger Stimulation mit einer Nidrigsalzdiät und Enalapril. Bar=100µm. (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

Vegleicht man die Reninexpression einer unbehandelten adulten Wildtypmaus (Abb. 1.7) mit derjenigen einer adulten Maus nach drei Wochen Stimulation anhand einer Nidrigsalzdiät und Enalapril (Abb. 1.8), so wird eine deutliche Vermehrung der Reninzellen entlang der afferenten Arteriolen erkennbar. Die Wände der afferenten Arteriolen enthalten viele ausdifferenzierte granuläre Reninzellen, welche teilweise stromaufwärts bis zur ersten Verzweigung zu finden sind (Rasch et al., 1997).

Eine Blockade der endogenen Effekte von Angiotensin II (AngII) verursacht eine Stimulation der Reninsekretion und der Reningenexpression in vivo (Keeton et al., 1981; Gomez et al., 1988; Ludwig et al., 1987; Nakamura et al., 1990; Schricker et al., 1995; Hackenthal et al., 1990). Dieser Stimulation des RAAS wird eine Unterbrechung der negativen Rückkopplung von AngII zugrunde gelegt (Keeton et al., 1981; Hackenthal et al., 1990).

AngII kann sowohl die Reninsekretion (Keeton et al., 1981; Hackenthal et al., 1990), als auch die Reninexpression (Nakamura et al., 1990; Schricker et al.,

1995; Johns et al., 1990; Schunkert et al., 1992) in JG-Zellen unterbinden, was auch als „short-loop-feedback“ Kontrolle des RAAS bezeichnet wird. Versuche zeigten, dass die Verabreichung des AngII-Antagonisten Losartan den Level der renalen Renin-mRNA-Expression um ein Vielfaches anzuheben vermag (Wagner et al., 1997).

Demzufolge weisen auch adulte Mäuse, denen Gene bestimmter Komponenten des RAAS, wie etwa Angiotensinogen (AGT) (Kim et al., 1995; Nagata et al., 1996; Tanimoto et al., 1994), Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) (Esther et al., 1996; Krege et al., 1995) oder der AngII Typ 1a (AT_{1a}) Rezeptor (Ito et al., 1995; Matsusaka et al., 1996; Olivero et al., 1998; Sugaya et al., 1995; Tsuchida et al., 1998) fehlen, eine starke Hyperplasie der reninbildenden Zellen auf.

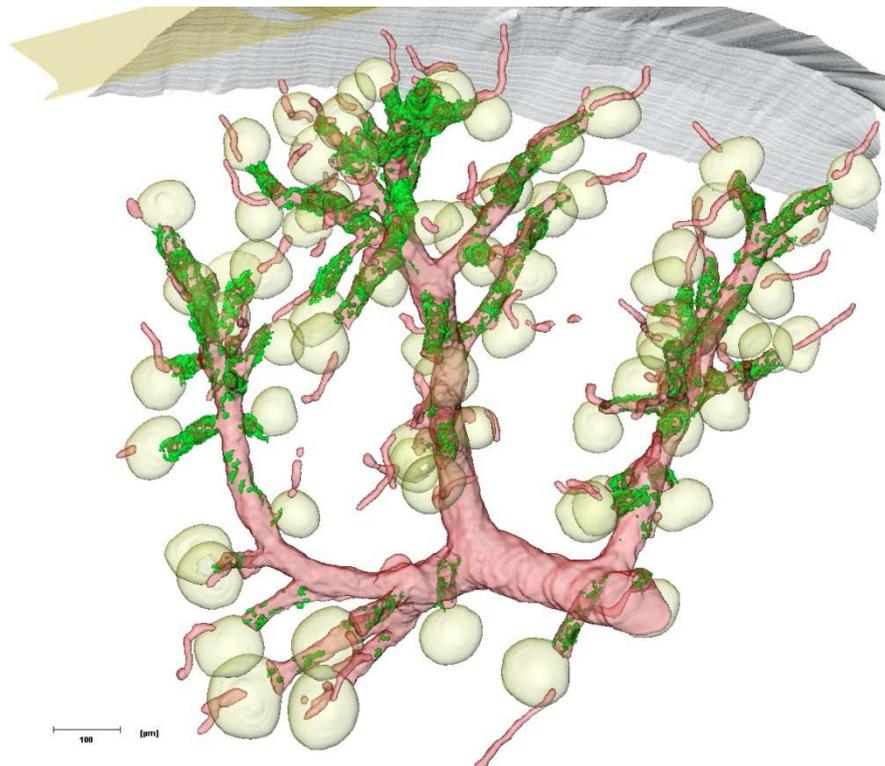


Abb. 1.9: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immunoreaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus. Bar=100µm (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

In Nieren von AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Mäusen (AT_{1a} -/-) (Abb. 1.9) zeigt sich relativ zu Wildtyp-Nieren (Abb. 1.7) eine erhöhte Anzahl von reninbildenden Zellen. Diese lassen sich hier größtenteils in der Nähe der Glomeruli, entlang der

kortikalen afferenten Arteriolen und in geringerem Grad, auch in Verbindung mit den Interlobulararterien finden. Auch einige wenige arcuate Seitenäste weisen Reninzellen auf. Wie auch beim Wildtyp, befinden sich hier die reninbildenden Zellen in der arteriolen Gefäßwand. Jedoch haften, im Gegensatz zum Wildtyp, zusätzliche Reninzellen den Gefäßen von außen an (Machura et al., 2009).

AT_{1a}^{-/-} Nieren weisen relativ zu Wildtyp-Nieren fünfmal mehr Renin mRNA auf. In adulten AT_{1a}^{-/-} Nieren werden auch beachtliche Veränderungen der Gefäßarchitektur sichtbar, welche sich im Auftreten von mehrschichtigen, dickeren, und auch kürzeren arcuaten und interlobularen Arterien verdeutlichen (Oliverio et al., 1998; Inokuchi et al., 2001; Machura et al., 2009).

1.5.3. Calcium als Effektor der Reninexpression

In sezernierenden Geweben wirken die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) üblicherweise stimulierend auf die Sekretion (Cohen et al., 1997). In JG-Zellen jedoch agiert Ca²⁺ als Inhibitor von Reninsekretion und -expression. Man spricht daher auch vom Calcium-Paradoxon der Reninfreisetzung. Auf welche Weise die Hemmung zustande kommt oder was die Ziele der PKC sind, ist weitgehend unklar. Es ist aber bekannt, dass AngII und Endothelin zu einer gesteigerten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und/oder einer Aktivierung der PKC führen und sich somit negativ auf die Reninexpression auswirken (Hackenthal et al., 1990; Kurtz et al., 1986; Müller et al., 2002; Ritthaler et al., 1995). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine verringerte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die Reninsekretion isolierter JG-Zellen anregt (Moe et al., 1991). Die Anwesenheit des Adenylylcyclase-Stimulators Forskolin etwa geht mit einer verminderten Calciumaufnahme der Reninzellen in Zellkultur einher, wobei auch der Calciumausstrom abnimmt. Somit kann gefolgert werden, dass Forskolin die Calciumpermeabilität der Reninzellmembran herabsetzt (Kurtz et al., 1984). Forskolin verursacht also eine Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration, welche in einer vermehrten Reninexpression und Sekretion resultiert.

1.6. Bisherige Methoden zur Aufreinigung von Reninzellen

JG Zellen wurden erstmals 1925 als granuläre Zellen in der afferenten Nierenarteriole in nächster Nähe zum Glomerulus beschrieben (Ruyter J.H.C., 1925). Wie die Übersicht zeigt, wurde daraufhin eine Vielzahl von Versuchen unternommen, um reninbildende Zellen zu isolieren und untersuchen zu können:

Jahr	Versuch	Hauptschwierigkeiten
1979	Nierengewebschnitte	Eingeschränkte Vitalität und zelluläre Heterogenität
1982	Kultivierte neonatale Zellen	Dedifferenzierung und fehlende Definition der Aussagekraft der regulatorischen Mechanismen
1985	Kultivierte menschliche JG-Tumor-Zellen	Überlebensfähigkeit
1986	JG-Zell-Präparation über Dichtegradienten (Kurtz et al.)	Konstanthaltung, Verunreinigung durch Fremdzellen, geringe Zellzahl
1987	Chorionzellen aus der Plazenta (Poisner et al.)	Kein JG-Zell-spezifischer Regulationsmechanismus
1987	Mikrodissoziierte, mikroperfundierte glomeruläre Präparationen	Konstanthaltung, Erhaltung der Vitalität
1990	Zelllinien transgener Mäuse	Charakterisierung der Zelltypen und Dedifferenzierung
1992	Transformierte JG-Zellen auf Matrigel	Menge an Material

Erst einige Jahrzehnte nach der Entdeckung der JG-Zellen lieferten Präparate aus Nierengewebschnitten erste Einblicke in die physiologische Regulation der Reninfreisetzung. Unter physiologischen Bedingungen wurden drei wichtige afferente Signale ermittelt, nämlich der Dehnungsgrad der afferenten Arteriole (Barorezeptor Mechanismus), der Natriumtransport im Macula Densa Segment des Nephrons (Macula Densa Mechanismus) und die adrenerge Stimulation (β -

adrenerger Mechanismus). Jedoch wurden damals nur wenige zelluläre Mechanismen, die zu diesen Abläufen führten, festgestellt, obwohl man bereits vermutlich beteiligte Second Messenger Systeme beobachtete (Curchill P.C., 1985).

Zwei wesentliche Nachteile limitierten jedoch den Einsatz von Gewebsschnitten: Erstens die Heterogenität der Zelltypen im Präparat und zweitens die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen über längere Zeitabschnitte. Die vielen Versuche reninbildende Zellen der Niere zu kultivieren, waren von wenig Erfolg gekrönt. Einer dieser Versuche enthüllte eine erhöhte Widerstandsfähigkeit von neonatalen Zellen gegenüber den Bedingungen in Kultur, aber auch diese Zellen dedifferenzierten schließlich. Außerdem war die Bedeutung der regulatorischen Mechanismen in Bezug auf die adulten JG-Zellen nur schwer festzustellen (Rightsel et al., 1982).

Daraufhin wurde entdeckt, dass auch Chorionzellen der Plazenta Renin synthetisieren. Obwohl die Funktion des Renins aus diesen Zellen ungeklärt bleibt, verbesserte die Tatsache, dass sie leicht verfügbar und dass Primärkulturen leicht anzulegen waren, die Möglichkeit, dass sie ein brauchbareres Modell für die Erforschung der Langzeitregulation der Bildung und Freisetzung von Renin liefern könnten (Poisner A.M. und Poisner R., 1987). Da in diesen Zellen die Freisetzung von Prorenin/ aktivem Renin ziemlich hoch war, deutete dies darauf hin, dass die Regulation der Proreninprozessierung nicht die in den JG-Zellen beobachtete widerspiegelte. Sowohl erhöhte Calcium- als auch cAMP-Spiegel förderten die Reninfreisetzung, was diese Methode als angemessenes Modell für die Erforschung der negativen Regulation der Reninfreisetzung durch Calcium, dem augenscheinlich wichtigsten negativen Regulationsmechanismus der Niere, ausschloß.

In der Zwischenzeit wurden mikrodissoziierte mikroperfundierte Präparate, die den juxtaglomerulären Apparat beinhalten, erarbeitet, mit denen man die Regulation der Reninfreisetzung direkt ergründen wollte (Ito et al., 1991; Skott et al., 1987).

Erste JG-Zellen in Kultur

Anschließend an frühere Bemühungen entwickelten Pinet et al. 1985 erstmals ein JG-Zell-Modell, welches dauerhaft in vitro erhalten werden konnte. Dabei

transfizierten sie virale DNS des Simian Virus 40 (SV40) in JG Zellen, welche aus einem menschlichen JG-Zell-Tumor isoliert wurden, in dem Bestreben, eine reninproduzierende JG-Zelllinie zu erzeugen. Nachdem die Reninfreisetzung mit der Zeit immer weiter abgenommen hatte, ging nach über einem Jahr auch diese Zelllinie verloren, wobei man annahm, dass der Tumorprozess nicht mit einem weiteren exogen eingeführten Onkogen vereinbar sei (Pinet et al., 1985). Darauffolgend wurden Zellen mehrerer etablierter Linien mit Maus- und Human-Renin transfiziert, um die Isolation von Zelllinien mit immunoreaktivem Renin voranzubringen. Es war jedoch sehr unwahrscheinlich, dass diese Zellen die Vielzahl von übergreifend wirksamen Faktoren ausprägten, welche in physiologisch funktionsfähigen JG-Zellen aktiv sind. Aufgrund dessen konnten diese Zellen die Mechanismen der Regulierung von Reninbildung und -freisetzung, welche JG-Zellen in vivo ausprägten, nicht widerspiegeln (Pratt et al., 1988; Jat und Sharp, 1989).

Erste Technik zur Isolierung von JG-Zellen aus Nieren un behandelter Tiere

Vor 1986 wurde kein Verfahren berichtet, welches die Gewinnung kortikaler Zellfraktionen angereichert mit JG-Zellen von un behandelten Tieren ermöglichte. Bei dieser Technik nach Kurtz et al. werden Nierenzellsuspensionen anhand eines Kollagenase Verdaus erstellt. Nach einem Siebeschritt kann über einen Percollgradienten eine reninzellenreiche Phase isoliert werden, welche dann für die Zellkultur zur Verfügung steht. Es wurde gezeigt, dass diese Phase 40-50% JG-Zellen enthält. Eine weitere Anreicherung konnte anhand von Kunststoffplatten erreicht werden, an die sich vorzugsweise JG-Zellen anhefteten (Kurtz et al., 1986; Della Bruna et al., 1991).

Erhaltung isolierter JG-Zellen auf Matrigel

Da die normale Lebensdauer von JG-Zellen in Zellkultur begrenzt war, wurde versucht diese durch die Anwendung von Matrigel zu verlängern. Matrigel ist ein gelatinöses Proteingemisch, welches von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkom-Zellen sezerniert wird und als Ersatz für die Extrazellulärmatrix in Kultur dient. Primärkulturen konnten so zwar über mehr als 12 Wochen erhalten werden, jedoch erwies sich das Handling als äußerst schwierig. Zudem zeigten

unterschiedliche Matrigelsubstrate jeweils eine ganz andere Morphologie bei der Entwicklung der Zellkulturen (Rayson B.M., 1992).

Zelllinien von Nierentumoren

Ein weiterer Versuch, einen Fortschritt bei den JG-Zellkulturen zu machen, war die Isolierung reninbildender Zellen aus Nierentumoren, die in transgenen Mäusen mit einem Fusionstransgen aus Renin-Promotor und SV40 T Antigen erzeugt wurden. Die daraus hervorgegangenen As4.1 Zellen zeigten zwar hohe Expressionsraten der Renin-mRNA, jedoch sezernierten sie größtenteils Prorenin. Weitere Nachteile waren die Dedifferenzierung der Zellen und eine möglicherweise hervorgerufene Änderung in der Regulation der Reninsynthese und -freisetzung (Sigmund et al., 1990; Jones et al., 1997).

1.7. Zielsetzung

Im Focus dieser Arbeit steht die Etablierung einer Methode, um reninbildende Zellen der Niere in möglichst hoher Anzahl und mit möglichst hohem Reinheitsgrad isolieren zu können. Grund dafür sind Limitationen der bisherigen Versuchsmodelle, die in einem unbefriedigenden Kenntnisstand über die intrazellulären Abläufe der Reninfreisetzung, sowie ihrer Steuerung resultieren. Auch die ursprünglich von der Arbeitsgruppe Kurtz etablierten Kurzzeitprimärkulturen von JG-Zellen der Ratten- und Mausniere haben sich, trotz grundsätzlicher Regulierbarkeit der Reninsekretion, aufgrund von relativ geringen Zellzahlen und Kontamination mit anderen Zelltypen, als ungeeignet für zellbiologische und biochemische Analysen erwiesen. Die Erzeugung von funktionstüchtigen Primärkulturen von JG-Zellen mit möglichst hohem Reinheitsgrad, stellt somit eine grundlegende Voraussetzung für die Erforschung der Abläufe der Reninfreisetzung in JG-Zellen auf zellulärer Ebene dar. Ein tieferes zellbiologisches Verständnis der Reninfreisetzung und deren Regulation, ist nicht nur aus grundlagenwissenschaftlicher Sicht extrem interessant, sondern könnte auch die therapeutische Option einer Modulierung der Reninfreisetzung eröffnen, ohne dabei in die Freisetzung von Sekretionsprodukten aus anderen endo- und exokrinen Zellen eingreifen zu müssen. Klinisch höchst relevante

Überaktivitätszustände des RAAS könnten somit, über eine Hemmung der Reninfreisetzung auf zellulärer Ebene, äußerst elegant therapiert werden.

Zur Erreichung des Ziels dieser Arbeit wird zunächst versucht die ursprüngliche Methode der JG-Zell-Präparation, welche sich kurz in einer Enzymverdau, darauffolgenden Siebeschritt und sich anschließendem Percoll-Gradienten gliedert (Kurtz et al., 1985), in einzelnen Schritten so zu modulieren, dass sich ein höherer Reinheitsgrad an Reninzellen erzielen lässt. Sollte dies keine weiteren Fortschritte mehr erbringen, wird anhand der Nierenperfusion mit magnetischen Partikeln eine weitere Taktik verfolgt. Der Grundgedanke dieser Methode ist nicht, wie bisher, eine Aufreinigung anhand der Dichte, sondern vielmehr eine Aufreinigung anhand der anatomischen Struktur. Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen sollen mit den sich darin befindlichen reninbildenden Zellen isoliert werden. Mausnieren werden mit Magnetpartikeln von verschiedenen Durchmessern (4,5µm, 6µm, 8µm) perfundiert, in der Erwartung, dass sich diese in den Abschnitten der afferenten Arteriolen mit entsprechender Gefäßweite festsetzen. Diese Gefäßfragmente sollen im Anschluss, unter Zuhilfenahme eines Magneten, von den restlichen Nierenbestandteilen isoliert werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	DELL Optiplex 745
CO ₂ -Inkubator mit Direkt- heizung	Forma 3336, Thermo Scientific, Bonn
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnet	BD IMagnet, Cell separator Magnet, BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, JenaAxiovert 200M, Zeiss, Jena
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfuse	Miniplus 2, Gilson, Middleton, USA
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach

Gerät	Hersteller
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Kippzentrifuge, Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Sorvallzentrifuge RC 5C Plus, Du Pont, Neu-Isenburg Zentrifuge + Vortex CM-70M, neoLab, München

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
Nylonsiebe (100µm Maschenweite) BD Falcon Cell Strainer	Omnilab, München
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich USA
Pasteurpipetten, Glas, 230mm	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
PP-Röhrchen 13ml mit Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf-Cup 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon-Tube 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht

Produkt	Hersteller
Skalpellklingen	Feather, Köln
VICRYL-Fäden 3-0	Ethicon, Norderstedt
Wellplatten (96-Well)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3. Chemikalien, Beads, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Beads 4,5 μ m, Dynabeads M-450 Epoxy	Invitrogen, Karlsruhe
Beads 6 μ m + 8 μ m, Compel Magnetic, COOH modified	Bangs Laboratories Inc., Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Blaue Latexbeads, Polybead Dyed Blue Microspheres	Bangs Laboratories Inc., Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Roche, Mannheim
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Endothelin1	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/ μ l	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x bzw. Colorless, 5x	Promega, Mannheim
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim

Produkt	Hersteller
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K₂HPO₄ x 3 H₂O	Merck, Darmstadt
KH₂PO₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Losartan Potassium	LKT Laboratories Inc., St.Paul, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl₂	Merck, Darmstadt
MgSO₄	Merck, Darmstadt
NaHCO₃	Merck, Darmstadt
Na₂HPO₄ x 2 H₂O	Merck, Darmstadt
NaH₂PO₄	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)₁₅ Primer, 0,5µg/µl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C₆H₈N₂ x HCl	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sevofluran SEVOrane	Abbott, Wiesbaden
SYBR[®] Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol[®]-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylazin	Ratiopharm, Ulm

2.1.4. Primer

Die Primer für quantitative PCR (qPCR) wurden von der Firma Biomers.net in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100pmol/μl eingestellt.

Name	Sequenz
GAPDH-S	5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3'
GAPDH-AS	5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'
Renin-S	5'-ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC-3'
Renin-AS	5'-ATG CGG GGA GGG TGG GCA CCT G-3'

2.1.5. Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti- Renin -IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:200
mouse anti - Glatt - muskelaktin -IgG	polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:50

Sekundärantikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
donkey anti-chicken -IgY	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse -IgG	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400

2.1.6. Puffer und Lösungen

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

JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)

Lösung 1 (10x)	
NaCl	1300 mM
Saccharose	200 mM
Glucose	100 mM
Tris	100 mM
KCl	50 mM
CaCl ₂	20 mM

Verdaulösung	
Lösung 1 (1x)	35 ml
Trypsin	75 mg
Collagenase A	54 mg

Magnetische Isolation über Beadperfusion nach Takemoto et al. (2002)

modifiziert nach Blutke (2006)

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,4	
NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

HBSS (Hank´s Buffered Salt Solution), pH 7,4	
NaCl	137 mM
D-Glucose	5,6 mM
KCl	5,4 mM
NaHCO ₃	4,2 mM

CaCl ₂	1,3 mM
MgSO ₄	0,6 mM
MgCl ₂	0,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄	0,3 mM

Verdaulösung bei Beadperfusion (pro Niere)	
HBSS	1 ml
Collagenase A	1 mg

Puffer A1 in 1000ml aqua dest., pH 8,0	
1M NaH ₂ PO ₄	19 ml
1M Na ₂ HPO ₄	81 ml

Blockierlösung	
BSA (Bovines Serum Albumin)	5mg
Puffer A1	1ml

Verwendete Beadlösungen

Alle verwendeten Beads wurden für die Perfusion in PBS gelöst. Pro Tier wurden 20ml an Perfusionslösung verwendet. Die Konzentrationen der Stamm- bzw. Perfusionslösungen der einzelnen Beadgrößen gliedern sich wie folgt:

Beadgröße	Konzentration Stammlösung (Beads/ml)	Menge an Stammlösung in 20ml PBS	Konzentration Perfusionslösung (Beads/ml)
4,5µm	4,0 x 10 ⁸	100µl	2 x 10 ⁶
6,0µm	3,4 x 10 ⁸	120µl	2 x 10 ⁶
8,0µm	1,6 x 10 ⁸	250µl	2 x 10 ⁶

Immunhistochemie

Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)	
Methanol	60%
Chloroform	30%
Eisessig	10%

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,4	
NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%

Blockierlösung	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1%
HS	10%

Molekularbiologie

DEPC-H₂O	
DEPC in H ₂ O bidest. schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren	1/1000 V

RNeasy Mini Kit 50	
Puffer RW1	Waschpuffer
Puffer RPE	Waschpuffer
Puffer RLT	Lösungspuffer

2.1.7. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2007* geschrieben. Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt.

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

Die Mikroskopie erfolgte mit *AxioVision Rel.4.5* von Zeiss und die 3D-Rekonstruktion mit *Amira 4.1* visualization software (Visage Imaging., USA).

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere

Für die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich Wildtypen des Stammes 129 SvJ verwendet.

Adulte Tiere wurden je nach Versuchsansatz mit einer Ketamin-Xylazin-Mischung betäubt und über die Aorta abdominalis perfundiert, oder die Nieren wurden nach Genickbruch direkt entnommen.

Jüngere Versuchstiere zwischen dem postpartalen Tag 10 bis 12 (pp10-12) wurden vor dem Genickbruch mit Sevofluran betäubt. Bei Versuchsansätzen mit Perfusion, wurde diese über den linken Herzventrikel vorgenommen.

Alle Versuchstiere wurden im Einklang mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Es wurde stets auf für Nager optimale Haltungsparameter geachtet (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Losartanbehandlung

Für eine RAAS-Stimulation wurde den Mäusen von pp1 bis pp10 täglich Losartan (30mg/kg gelöst in NaCl-Lösung) in die Nackenfalte injiziert. Während des Abwiege- und Injektionsvorgangs wurden die Tiere bei 37°C auf einer Wärmeplatte gelagert.

Niedrigsalz-Enalapril-Behandlung

Zur Stimulation des RAAS bei adulten Mäusen wurden die Versuchstiere drei Wochen lang ausschließlich mit Niedrigsalzfutter (0,02% NaCl) ernährt. Das Trinkwasser wurde durch eine Lösung des ACE-Inhibitors Enalapril (0,1mg/ml entsprechend $10\text{mg}/\text{kg}_{\text{BW}} \times \text{d}$) ersetzt und bis zum Versuchsende beibehalten.

2.2.2. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)

Das ursprüngliche Protokoll zur JG-Zell-Präparation gliedert sich in einen Enzymverdau, einen sich anschließenden Siebeschritt und fünf darauffolgende Zentrifugationsschritte. Wesentliches Element ist hierbei die Sorvallzentrifugation.

fugation in einem Percoll-Gemisch zur Erstellung eines Dichtegradienten. Die Einzelzellsuspension wird also je nach Dichte in mehrere Phasen aufgeteilt.

Kurzprotokoll JG-Zell-Präparation:

Nierenentnahme

- Betäubung der Maus mit Sevofluran, Genickbruch
- Eröffnung der Bauchdecke und des Bauchfells in der Medianen kaudal des Sternums
- die entnommenen Nieren werden entkapselt und mit einem Skalpell kleingeschnitten

Enzymverdau

- die geschnittenen Nieren werden in einer 100ml Flasche mit 40ml Verdaulösung versetzt
- es folgt ein Verdau mit Magnetrührer bei 37°C im Wasserbad für 60 bis 90 min

Filtrationsschritt

- der Verdau wird im Anschluss auf einen 22µm Nylonfilter gegeben und filtriert
- nach Spülen mit wenig Lsg1 wird das Filtrat in ein 50ml Falcon-Tube überführt

Zentrifugationsschritte

Erster Zentrifugationsschritt

- die Zentrifugation erfolgt bei 2200rpm in der Kippzentrifuge für 7min bei RT
- der Überstand wird verworfen, während 5ml Rest mit Lsg1 resuspendiert werden
- das Falcon Tube wird erneut mit Lsg1 auf 50ml aufgefüllt

Zweiter Zentrifugationsschritt

- die Zentrifugation erfolgt bei 2200rpm in der Kippzentrifuge für 7min bei RT
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes
- das Pellet wird mit 2ml Lsg1 resuspendiert
- die 2ml Lösung lässt man langsam auf ein Percollgemisch (19ml Lösung1, 9ml Percoll/NaCl) in einem Sorvallbecher tropfen, sodass die Zellen oben schwimmen

Dritter Zentrifugationsschritt = Sorvallzentrifugation

- die Zentrifugation erfolgt bei 11.000rpm für 30min bei 4°C

- im Anschluss wird die oberste Phase des Dichtegradienten mit einer Glaspipette abgesaugt und verworfen
- die zweite Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein 50ml Falcon-Tube überführt
- diese wird mit Lsg1 auf 50ml aufgefüllt

Vierter Zentrifugationsschritt

- die Zentrifugation erfolgt bei 2200rpm in der Kippzentrifuge für 7min bei RT
- der Überstand wird abgegossen und das Falcon-Tube auf 50ml mit Lsg1 aufgefüllt

Fünfter Zentrifugationsschritt

- die Zentrifugation erfolgt bei 2200rpm in der Kippzentrifuge für 7min bei RT
- der Überstand wird abgegossen und verworfen

Kultivierung in Medium

Das Pellet wird je nach verwendeter Wellplatte und benötigter Wellanzahl mit der entsprechenden Menge an RPMI-Medium resuspendiert und auf die Wells pipettiert. Bei 20 Wells einer 96-Well-Platte werden 2ml RPMI-Medium verwendet, je 100 μ l pro Well.

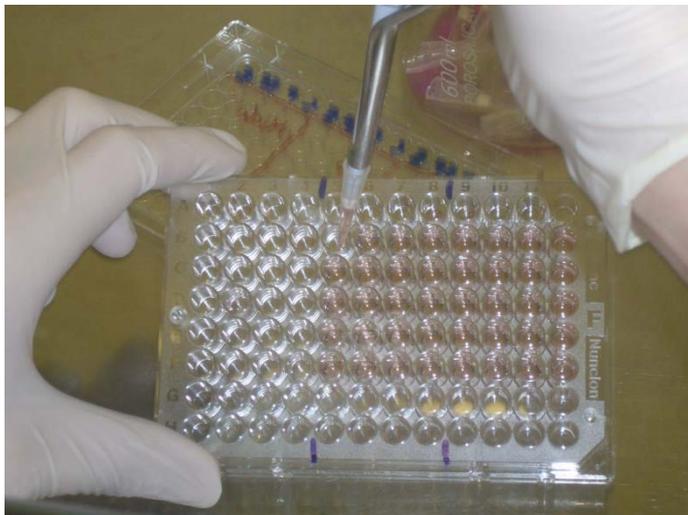


Abb. 2.1: Bestückung einer 96-Wellplatte mit Zellen in Medium.

Zellkultur

Die Well-Platte wird bei 37°C in 5% CO₂ im Brutschrank gelagert. Nach 20 Stunden wird das Nährmedium mit einer Pipette vollständig abgesaugt, wobei die

Zellen an der beschichteten Kunststoffoberfläche haften bleiben. Es werden fortan vier Gruppen gebildet. Die Kontrollgruppe (c) wird mit 100µl Nährmedium pro Well befüllt. Bei den weiteren Gruppen werden je 1ml Medium, 0,5µl einer 10^{-2} molaren Forskolinlösung (f) bzw. 3µl einer 10^{-4} molaren Endothelinlösung (e) zugegeben. Eine Mischgruppe (e+f) erhält beide Zusätze in entsprechender Menge. Auch hier werden wieder je 100µl Medium mit Zusatz pro Well pipettiert. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen geerntet. Das Medium wird komplett abgesaugt und auf jedes Well 100µl einer Mischung aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol (1µl β -ME/100µl RLT-Puffer) gegeben. Nach Zusatz von weiteren 100µl 70%-Ethanol werden die nunmehr 200µl pro Well in ein RNeasy Mini Spin Column überführt. Es folgt eine RNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit 50.

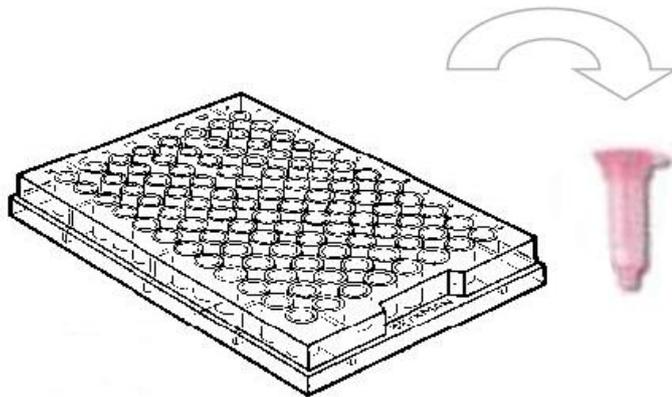


Abb. 2.2: Schema der Überführung der Zellen aus der 96-Well-Platte in ein RNeasy Mini Spin Column.



Abb. 2.3: Einfüllen der Zellen in RNeasy Mini Spin Columns.

2.2.3. Bead-Perfusion

Während in einem Methodenvergleich von Andreas Blutke (2005) bei der magnetischen Isolierung von Glomeruli der Mausniere zu einer druckgesteuerten Perfusion (60mmHg Enddruck) geraten wird, wurde die Perfusion in der vorliegenden Arbeit mit einer flussgesteuerten Perfuse von Gilson (40ml/3min) durchgeführt. Die Methode nach Blutke sieht auch bei adulten Tieren eine Perfusion über das linke Herz unter Einbeziehung des gesamten Körperkreislaufs vor. Dabei ergibt sich im Vergleich zu einem Zugang über die Aorta abdominalis eine viel längere Perfusionsstrecke. Diese resultiert sowohl in einem verminderten Perfusionsdruck in den Nieren, als auch in einem Mehrverbrauch an teurer Beadlösung. Aus diesem Grund entschied ich mich, den adäquateren Zugang über die Aorta abdominalis zu verwenden.

Perfusion von adulten Tieren

Adulten Tieren wurde nach Betäubung mit Ketamin/Xylacin und Fixierung in Rückenlage die Bauchdecke und das Peritoneum mit einem Medianschnitt eröffnet. Am kranialen und kaudalen Schnittende wurden in lateraler Richtung je zwei Entlastungsschnitte gesetzt und so der Bauchsitus freigelegt. Das Darmkonvolut wurde unter Zuhilfenahme von Wattestäbchen nach rechts verlagert. Im Anschluss wurde die Aorta abdominalis, mit den davon abzweigenden Arteriae renales dexter et sinister, aufgesucht. Zur Erreichung eines besseren Perfusionsdruckes in den Nieren wurde kranial der Abzweigung der Arteria renalis dexter und unmittelbar kaudal der Arteria mesenterica cranialis eine Ligatur um die Aorta abdominalis zusammen mit der Vena cava caudalis gesetzt. Diese Ligatur wurde jedoch erst nach Fixation der Perfusionskanüle festgezogen.

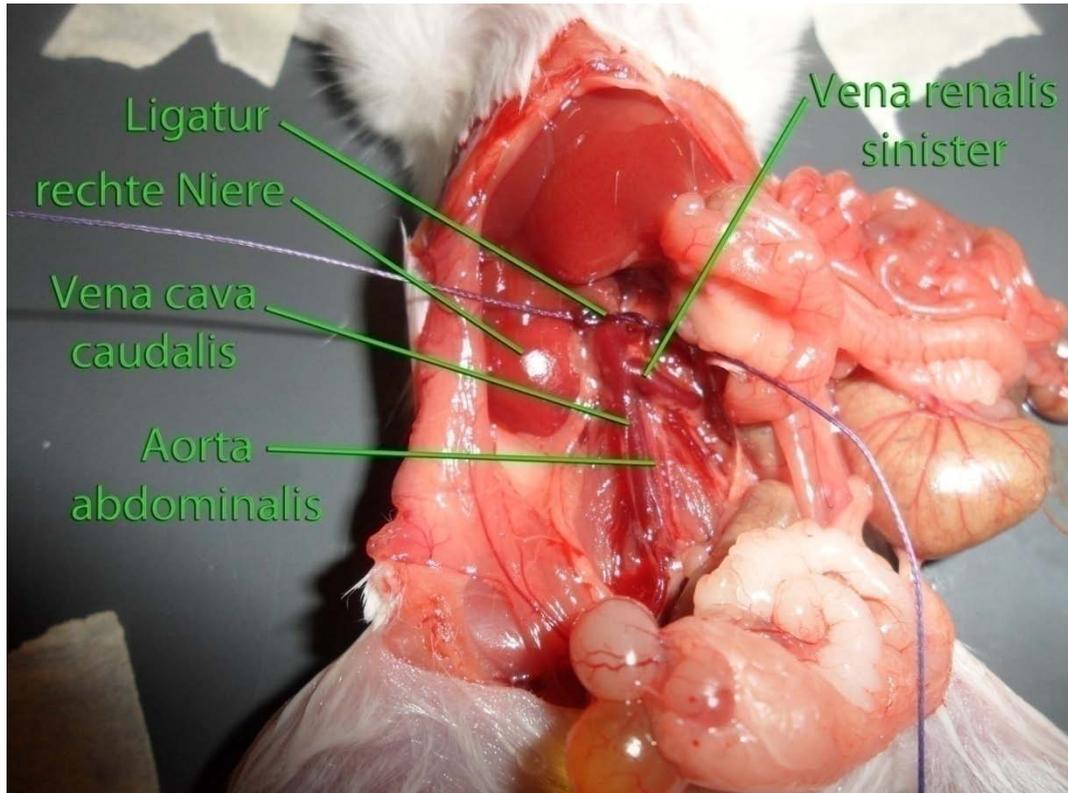


Abb. 2.4: Eröffnetes Abdomen einer adulten Maus mit rechts verlagertem Darmkonvolut. Ligatur um Vena cava caudalis und Aorta abdominalis vorbereitet.

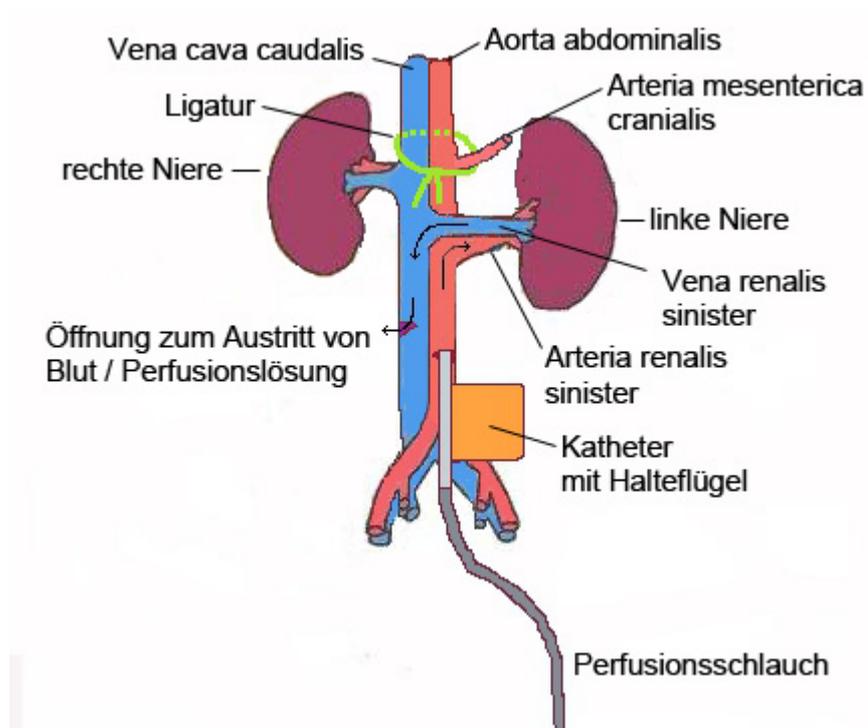


Abb. 2.5: Schema der Perfusion über die Aorta abdominalis bei adulten Mäusen; grün: Ligatur um Vena cava caudalis und Aorta abdominalis unmittelbar kaudal der Arteria mesenterica cranialis.

Zum Einführen der Perfusionskanüle wurde die Aorta abdominalis unmittelbar kaudal des Abgangs der Arteria renalis sinister abgeklemmt und durch einen seitlichen Schnitt mit einer Augenschere eröffnet. Dieser Zugang wurde möglichst weit kaudal der Abzweigungen der arteriae renales, etwas kranial der Aufzweigung der Aorta abdominalis in die Arteriae iliacae und sacralis mediana gewählt, um bei etwaigen Schwierigkeiten, wie Aortenabriss oder Längsriss des Gefäßes, kranial noch weitere Möglichkeiten für das Setzen der Kanüle zu haben. Eine gebogen spitz zulaufende Pinzette wurde in die Inzision eingeführt und erleichterte über Aufweitung das Einführen der Kanüle. Die leicht geöffnete Pinzette wurde in ventraler Richtung etwas angehoben, so dass die Kanüle unmittelbar darunter, wie unter eine Art Dachwölbung in den Hohlraum des Gefäßlumens eingeführt werden konnte. Die Kanüle wurde einige Millimeter in kranialer Richtung in das Gefäß vorgeschoben und mit einer flachen Klemme fixiert (Abb. 2.6).

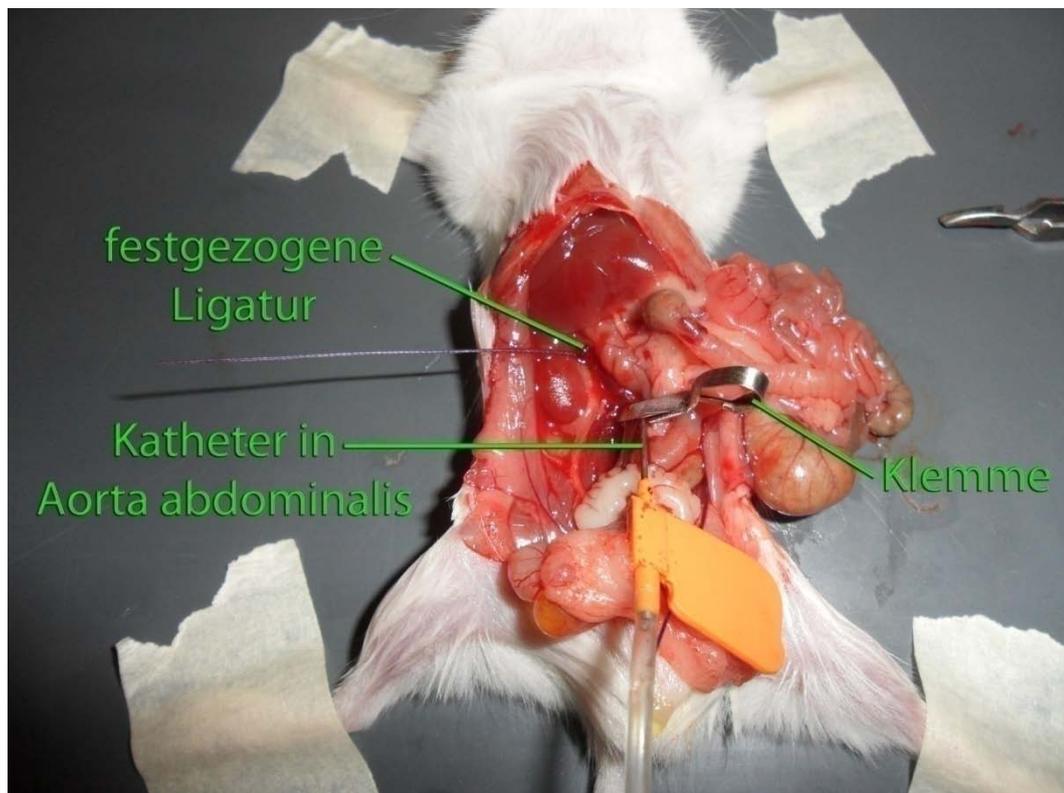


Abb. 2.6: Perfusion einer adulten Maus über die Aorta abdominalis.

Nach dem Festziehen der zuvor gelegten Ligatur, wurde die Klemme zum Unterbinden des Blutstromes von der Aorta entfernt und in der Vena cava caudalis, leicht kaudal der gesetzten Kanüle, eine Abflussmöglichkeit für die zugeführte Perfusionslösung geschaffen. Bei Einleitung der Perfusion wurden zunächst 20ml mit Heparin versetzte NaCl-Lösung perfundiert, um sämtliche Blutbestandteile aus den Nieren zu spülen, da diese, wegen der einsetzenden Koagulation, sehr nachteilig bei der Beadperfusion gewesen wären. Gleich im Anschluss wurden dann 20ml einer PBS-Lösung mit den gelösten Beads perfundiert. Für die Versuche mit Perfusion von Verdauungslösung wurden nur 20ml dieser Lösung, in entsprechend angegebener Zusammensetzung, perfundiert. Im Anschluss an die Perfusion wurden die Nieren entnommen, entkapselt und mit Rasierklingen auf ca. $0,75 \text{ mm}^3$ kleingeschnitten. Als nächster Schritt folgte ein je nach Versuchsansatz variierender Verdau.

Perfusion von juvenilen Tieren

Bei den juvenilen Versuchstieren zwischen pp10 und pp12 wurde der Perfusionszugang zum Kreislaufsystem, einschließlich der Nierengefäße, über den linken Herzventrikel gewählt. Da sich die Einstichstelle am Herzen nicht in gleicher Weise wie an der Aorta abdichten ließ, wurde versucht, die daraus resultierenden Perfusatverluste über eine Senkung des Perfusionsflusses auf 10ml/min zu vermindern. Bei den mit Sevofluran betäubten Versuchstieren wurde zunächst median das Abdomen eröffnet. Das Zwerchfell wurde stumpf durchtrennt und der Brustkorb, nach seitlichen Scherenschnitten durch die Rippen, nach kranial eröffnet. Zur besseren Sicht auf das Herz wurde der Brustkorb in kranialer Richtung hoch geklappt und komplett entfernt. Die Herzspitze wurde mit einer Pinzette fixiert, was das Einführen der Perfusionskanüle in den linken Herzventrikel erleichterte. Der Einstich erfolgte knapp unter dem linken Herzohr in Richtung Herzspitze, wobei das Herzseptum intakt blieb.

In ähnlicher Weise wie bei den adulten Tieren wurden zuerst 10 bis 20ml NaCl-Heparin-Lösung perfundiert und im Anschluss 20ml PBS-Lösung mit den darin enthaltenen Beads. Die Kanüle musste den gesamten Perfusionsvorgang über in Position gehalten werden, was die Inanspruchnahme von Assistenz bei der Bedienung des Gerätes bedingte.

2.2.4. Magnetseparation nach Takemoto et al. (2002)

Collagenase-Verdau

Die Nieren wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke von annähernd $0,75\text{mm}^3$ geschnitten. Es ist wichtig, das Gewebe zu schneiden und nicht zu zerhacken. Das Gewebe jeder Niere wurde zusammen mit 1ml Collagenase A-Lösung (1mg / ml HBSS) in ein 2ml Eppendorf-Cup überführt und für 30 min bei 37°C in ein Wasserbad gegeben. Das Eppendorf-Cup wurde zur Durchmischung des Inhalts alle fünf Minuten leicht geschwenkt. Im Anschluss an den Verdau wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Siebeschritt

Nach dem Verdau wurde das Gewebe unter Zuführung von 7ml PBS mit einem abgeflachten Stempel vorsichtig durch ein Nylonsieb mit Maschenweite $100\mu\text{m}$ gedrückt und in einem 50ml Falcon-Tube aufgefangen. Dieser Schritt erfolgte gleichzeitig für das Gewebe beider Nieren einer Maus.

Magnetische Isolation und Waschschrte

Die 7ml Lösung wurde in ein 13ml PP-Röhrchen überführt und das 50ml-Falcon zweimal mit je 1,5ml PBS nachgespült. Darauf wurde das 13ml PP-Röhrchen zur Separation der Gewebsteile vor einen Magneten platziert. Nach 7min wurde die Lösung mittels einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die perfundierten Gewebsteile mit den darin enthaltenen Beads wurden durch den Magneten an den Rand des Gefäßes gezogen. Mit der magnetfern eingeführten Pipette wurden somit nur diejenigen Gewebsfragmente, zusammen mit der Lösung, abgesaugt, welche keine magnetischen Partikel beinhalteten.

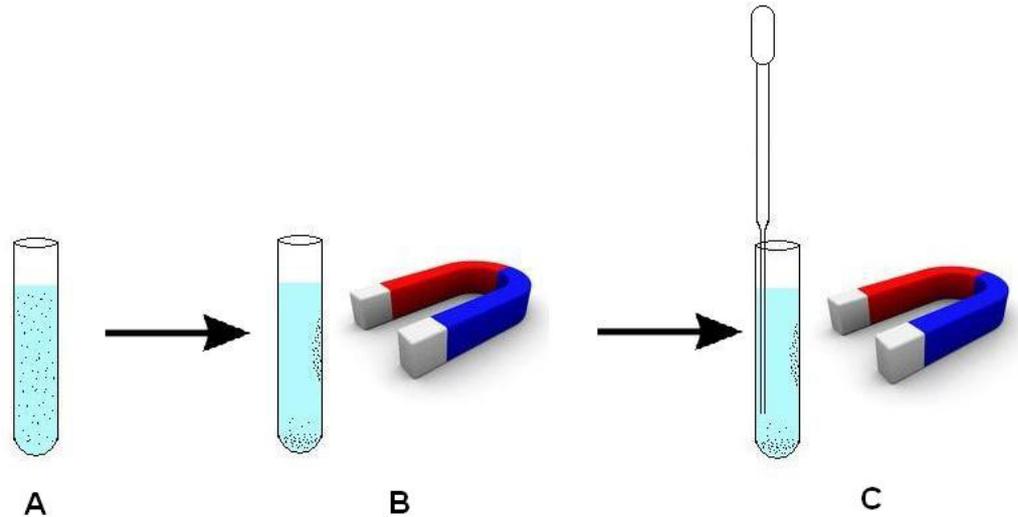


Abb. 2.7: Schema der Magnetseparation. **A:** Lösung mit Nierengewebsfragmenten nach Verdau und 100 μ m-Siebeschritt; **B:** 7min Magnetseparation, perfundierte Anteile werden durch den Magneten an den Rand des Gefäßes gezogen und in Position gehalten; **C:** magnetfernes Einführen der Pipette zur Entfernung der Lösung und nicht vom Magneten erfasster Nierengewebsanteile.

Im Anschluss wurde das 12ml-Cup vom Magneten entfernt und erneut mit 10ml PBS (4°C) aufgefüllt. Nach Verschluss wurde es vorsichtig geschwenkt und gerollt, um die isolierten Fragmente wieder in Lösung zu bringen. Mit einer erneuten fünfminütigen Platzierung vor dem Magneten wurde der Vorgang wiederholt.

Während das Protokoll nach Takemoto et al. (2002) im weiteren Vorgehen einen zweiten Siebeschritt vorsieht, wurde dieser, aufgrund der zu erwartenden Fragmentverluste, bei den hier durchgeführten Versuchsansätzen unterlassen. Unter Zusatz von blauen Latexpartikeln durchgeführte Perfusionsversuche, ermöglichten eine visuelle Verfolgung der perfundierten Fragmente während des Isolationsvorganges. Schon beim ersten Siebeschritt waren klar erkenntlich blaue Anteile im Nylonsieb verblieben, was auf einen Verlust der angedachten Gefäßfragmente hindeutete. Da der erste Siebeschritt jedoch wesentlich für eine weitere Zerkleinerung größerer Gewebsverbände nach dem Verdau war, konnte dieser nicht unterlassen werden. Ein Versuch, den Siebeschritt durch ein anderes Zerkleinerungsverfahren zu ersetzen, welches auf dem Prinzip schnell rotierender Kunststofflamellen beruhte, erwies sich nach mikroskopischer Kontrolle als ungeeignet. Die Lösung zeigte sich bei diesem Verfahren als äußerst inhomogen mit zahlreichen extrem kleinen Fragmenten. Außerdem war zu befürchten, dass

die bei dieser Methode auftretenden Scherkräfte sowohl die perfundierten Beads aus den Gefäßfragmenten lösen, als auch die Reninspeichergranula zur Reninausschüttung veranlassen.

Ein dritter Waschschrift wurde hierauf in 10ml PBS mit sich anschließender 5 min Magnetisolation durchgeführt. Nachdem das Isolat unter leichtem Schwenken wieder in 10ml PBS gelöst worden war, wurde es für 5min bei 2300rpm in die Rotationszentrifuge gegeben. Der Überstand wurde abgesaugt, wobei 2ml Restlösung mit dem Isolat in ein 2ml Eppendorf-Cup überführt wurden. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (5min, 3000rpm, 4°C) ermöglichte es, das Isolat von der restlichen Pufferlösung zu befreien und im weiteren Vorgehen die RNA nach der TRIzol-Methode zu isolieren.

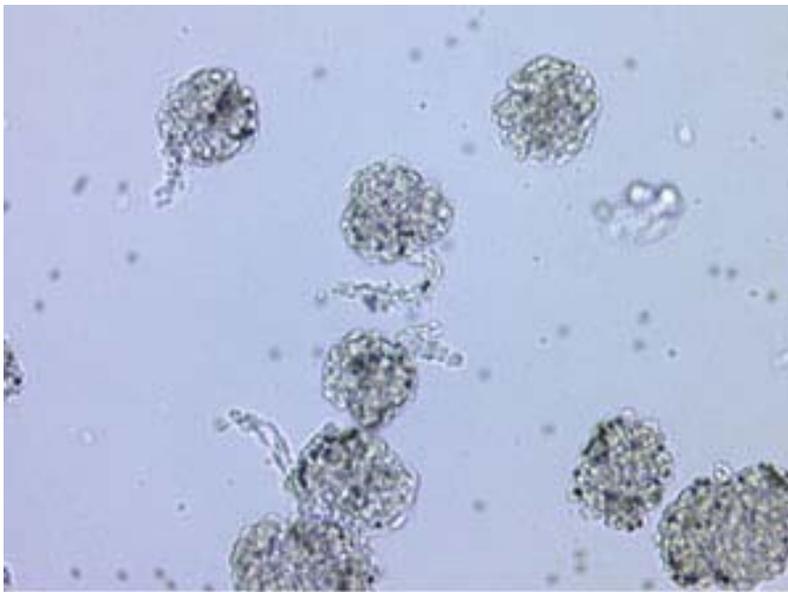


Abb. 2.8 : Isolierte Mausglomeruli nach Perfusion mit 4,5µm-Dynabeads (Takemoto et al. 2002).

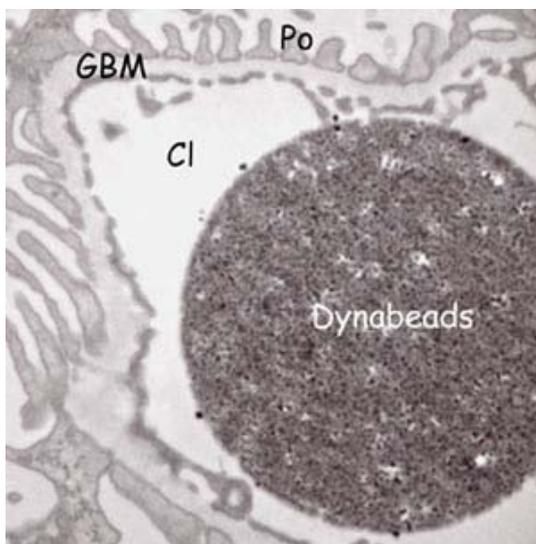


Abb. 2.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines isolierten Glomerulus. GBM: Glomeruläre Basalmembran, Cl: Kapillarlumen, Po: Podocyten-Fußfortsätze (Takemoto et al., 2002).

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Bei den Zellkulturversuchen wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (50) von Qiagen isoliert. Die RNA-Isolierung bei den Versuchsansätzen mit Beadperfusion erfolgte anhand der TRIzol-Methode.

RNA-Isolation mit dem RNeasy Mini Kit

Zur Überführung der Zellen aus der Zellkultur in die im Kit enthaltenen RNeasy Mini Spin Columns wurde zunächst das Komplette RPMI-Medium aus den Wells abgesaugt. Zum Lösen der Zellen vom Wellboden wurden pro Well 100µl Puffer RLT vermischt mit β-Mercaptoethanol (10µl β-ME/ml Puffer RLT) zugegeben. Im Anschluss wurden auf jedes Well 100µl 70% Ethanol hinzugefügt. Die so enthaltenen 200µl pro Well wurden komplett in je ein RNeasy Mini Spin Column überführt. Die RNeasy Mini Spin Columns stellen eine Filtersäule dar und werden in 1,5ml Sammelrohre eingeführt, welche nach jedem Zentrifugationsschritt gewechselt werden.

Kurzprotokoll der RNA-Isolation mit dem RNeasy Mini Kit:

- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 30s bei 12000rpm
- Hinzufügen von 700µl Puffer RW1 (Waschpuffer)
- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 30s bei 12000rpm
- Hinzufügen von 500µl Puffer RPE (Waschpuffer)
- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 30s bei 12000rpm
- Hinzufügen von 500µl Puffer RPE (Waschpuffer)
- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 2min bei 12000rpm
- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 1min bei 14000rpm
- Umsetzen der RNeasy Mini Spin Columns in 1,5ml-Cups mit Deckel
- Hinzufügen von 18µl RNase-freiem Wasser
- Zentrifugation der RNeasy Mini Spin Columns für 1min bei 12000rpm
- Verwerfen der RNeasy Mini Spin Columns
- 1,5ml-Cups mit enthaltener Total-RNA auf Eis stellen

RNA-Isolation mit dem TRIzol-Reagenz

Die RNA-Isolierung mit dem TRIzol-Reagenz wurde nach dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Mit Hilfe von Chloroform wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wird dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180°C RNase-frei gemacht. Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz:

- 1ml TRIzol-Reagenz für ½ adulte Mausniere bzw. entsprechend weniger für embryonale und postpartale Nieren in Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen; bei Magnet-Isolaten wurden je nach Ausbeute 100 – 300 µl TRIzol-Reagenz verwendet
- Ganze Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30s homogenisieren; Isolat nach Verdau und Magnetauftrennung über Zentrifugation (5 min, 2300rpm) von Pufferlösung befreien und Isolat mit TRIzol-Reagenz resuspendieren
- Mix in 2ml Eppendorf-Cup überführen, 5 min bei RT stehen lassen (Proteine denaturieren, lösen sich in Phenol)
- 1/5 Vol. (für ½ adulte Niere also 200µl) Chloroform zugeben, schütteln (nicht vortexen)
- 20min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren
- ca. 500µl wässrigen Überstand in 1,5ml Eppendorf Cup überführen, dabei auf keinen Fall Interphase mitnehmen (unten rote Phenolphase, dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500µl) mit Isopropanol mischen, kräftig schütteln
- 10min bei RT RNA ausfällen
- 10min bei 4°C bei 12000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml 75% Ethanol waschen
- 5min bei 4°C bei 7500rpm zentrifugieren, Überstand abkippen

- Pellet 10min bei RT trocknen und je nach Größe in 20-300µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2min bei 65°C im Schüttler resuspendieren, bei - 80°C lagern

Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels eines Photometers bei 260nm und 280nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260nm und 280nm wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

2.2.5.2. cDNA-Synthese

Mittels reverser Transkription (RT) ist es möglich, die isolierte RNA in copy DNA (cDNA) zu übersetzen. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit der PCR-Technik analysieren. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren.

10µl Ansatz	
1µg	Gesamt-RNA
1µl	Oligo-(dT) ₁₅ Primer (0,5µg/µl)
add	DEPC-H ₂ O
	5min auf 65°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis stellen

Zu dem Reaktionsgemisch (10µl) wurde folgender Mix zugegeben:

Mix	
1µl	M-MLV Reverse Transkriptase (100U)
4µl	dNTPs (2,5mM)
4µl	Puffer (5x first strand buffer)
3µl	DEPC-H ₂ O

Die cDNA-Synthese erfolgte dann 1h bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz anschließend 2min auf 94°C erhitzt. Für die

quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit 20µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.5.3. *Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)*

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem Lightcycler 480 SYBR Green Master PCR Kit von Roche an einem Roche Lightcycler 480 durchgeführt.

Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dies ermöglicht den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet, wobei gebundenes SYBR Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist.

10µl Reaktionsansatz	
5µl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0,5µl	sense Primer (10pmol/µl)
0,5µl	antisense Primer (10pmol/µl)
3µl	dd H ₂ O
1µl	cDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	15 min	Aktivierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
40	58°C	20 sec	Annealing
40	72°C	20sec	Elongation

Der Reaktionsansatz von 10 µl besteht aus 5 µl Lightcycler 480® SYBR Green Master, je 0,5 µl des sense und antisense Primers, 3 µl zweifach destilliertem

Wasser und 1 µl cDNA. Das Amplifikationsprotokoll besteht, nach einer Aktivierungsphase der HotStarTaqTM DNA-Polymerase von 15 min bei 95°C, aus 40 Zyklen mit 15 sec Denaturierungsphase bei 95°C, 20 sec Annealingphase bei 58°C und 20 sec Elongationsphase bei 72°C.

Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GAPDH.

Bei den durchgeführten Versuchen wurde jede Probe doppelt angesetzt, wobei durch Zugabe der entsprechenden Primer zum einen Renin und zum anderen GAPDH vermessen wurden.

2.2.6. Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper an das Antigen im fixierten Gewebe. Anschließend werden die Präparate mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird es ermöglicht, den Antigen-Antikörper-Komplex zu detektieren. Sichtbar wird dieser Komplex durch die Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge.

Kurzprotokoll der indirekten Immunhistochemie

- Fixierung des Isolates mit Methyl-Carnoy auf Objektträger über Nacht
- 3 x 5 min waschen der Präparate in PBS-Puffer auf dem Schüttler
- 30 min blockieren mit Blockierlösung (10% HS und 1% BSA in PBS) bei RT zur Abschwächung unspezifischer Bindungen
- Inkubation mit 1. AK über Nacht bei 4°C in einer geschlossenen, feuchten Kammer
(Verdünnung der 1. AK in Blockierlösung)

- am folgenden Tag: 3x5min waschen der Schnitte in Waschpuffer (PBS mit 1% BSA)
- Inkubation mit 2. AK 2h bei RT im Dunkeln
(Verdünnung der 2. AK in PBS/1%BSA)
- 3 x 5min waschen der Präparate in PBS im Dunkeln
- eindeckeln mit Glycergel

3. Ergebnisse

3.1. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)

Zunächst wurde im ersten Ansatz versucht, getreu dem ursprünglichen Protokoll der JG-Zell-Präparation zu arbeiten. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden die Nieren von unbehandelten Mäusen entnommen, auf etwa $0,75\text{mm}^3$ kleingeschnitten und anschließend in 0,15% Collagenase A und Trypsin unter Verwendung eines Magnetrührers für 1,5h verdaut. Nach einem Siebeschritt, einem Percoll-Dichtegradienten und einigen Waschschritten, wurden die isolierten Zellen in ein Kulturmedium überführt und je 20 Wells einer 96-Well-Kunststoffplatte mit $100\mu\text{l}$ versehen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 in feuchter Atmosphäre inkubiert. Um die Vitalität der Reninzellen beurteilen zu können, wurde nach 20h Zellkultur das Nährmedium erneuert und auf jeweils fünf Proben Forskolin, Endothelin und eine Mischung aus beiden, mit entsprechenden Konzentrationen, gegeben. Die Kontrolle blieb dabei unbehandelt. Vitale Reninzellen zeigen bei Zusatz von Forskolin eine erhöhte Reninexpression, während Endothelin ein entgegengesetztes Bild zeigt. Nach einer weiteren 24h Inkubation wurde daraufhin die RNA isoliert und mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Konzentration der cDNA wurde schließlich, getrennt für Renin und GAPDH, über eine Real Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in einem Lightcycler vermessen. Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit wurde bei der Vermessung aller Versuchsansätze die gleiche Standardlösung als Bezugsgröße verwendet. Um im Anschluss auf die Reinheit der reninbildenden Zellen im Isolat rückschließen zu können, wurde ihr spezifischer Marker, die Renin-mRNA mit der GAPDH-mRNA, als Marker für andere enthaltene Zellen, ins Verhältnis gesetzt.

3.1.1. Unbehandelter Wildtyp

Um die Reproduzierbarkeit des Ausgangsprotokolls zu gewährleisten, wurden drei Ansätze exakt nach dem ursprünglichen Protokoll der JG-Zell-Präparation von Kurtz et al. durchgeführt.

Dabei ergab sich bei den unbehandelten Kontrollen für das Verhältnis Renin-mRNA zu GAPDH-mRNA ein Mittelwert von 0,13. Dieser Wert wurde bei den Folgeversuchen als Referenzwert verwendet, um Aussagen über mögliche Verbesserungen treffen zu können. Die mit dem Adenylylcyclase-Stimulator Forskolin behandelten Zellen zeigten eine markante Stimulation, welche sich in einem Mittelwert von 1,0 widerspiegelte. Das Peptidhormon Endothelin hatte im Gegensatz dazu nur eine geringe Hemmwirkung auf die Renin-mRNA-Expression. Wie man in Abbildung 3.1 sieht, wurde die mRNA-Expression des Renins auf ca. 77% herab reguliert. Im Bezug auf die Kontrolle ist dieser Wert nicht signifikant ($p > 0,05$). Eine gleichzeitige Zugabe von Forskolin und Endothelin verdeutlicht die Hemmwirkung von Endothelin umso mehr. Die stimulierende Wirkung von Forskolin wird dabei signifikant um 40% abgeschwächt (Abb.3.1).

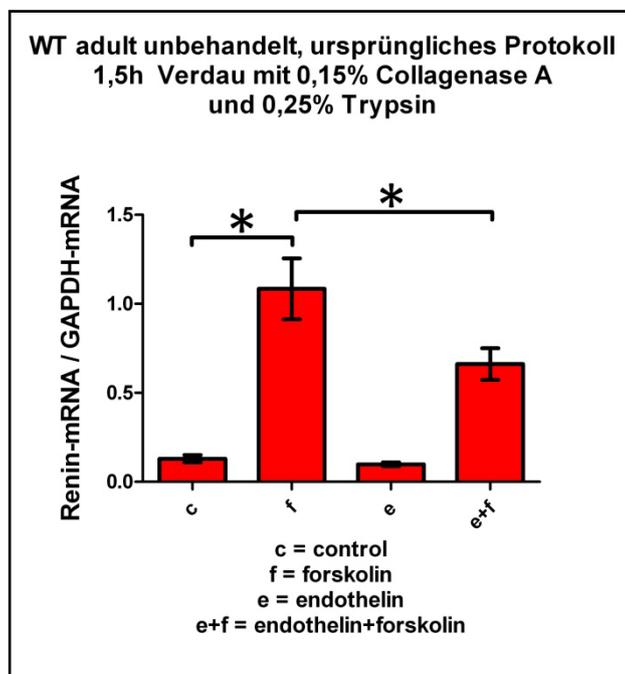


Abb. 3.1:
Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwerte dreier Ansätze exakt nach der JG-Zell-Präparation von Kurtz et al. (1986) an unbehandelten adulten Mäusen. Verdaulösung mit 0,15% Collagenase A (1,5mg/ml) und 0,25% Trypsin (2,1mg/ml).
* = signifikant $p < 0,05$.

3.1.2. Losartan stimulierter Wildtyp

Wie aus vorangegangenen Versuchen bekannt, vermag die Verabreichung des AT_1 -Antagonisten Losartan, über eine Entkopplung des RAAS, die Zahl der reninbildenden Zellen um ein Vielfaches zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde versucht, ob sich unter Verwendung derart vorstimulierter Mäuse bei der JG-Zell-Präparation eine bessere Anreicherung der Reninzellen erzielen lässt.

Die Durchführung des Standardprotokolls zeigt bei Wildtypmäusen, welche vom postpartalen Tag 1 (pp1) bis zum Alter von zwölf Tagen (pp12) mit Losartan behandelt wurden, einen mittleren Kontrollwert von 0,49 (Abb. 3.2). Im Vergleich zum Standardprotokoll mit unbehandelten Mäusen stellt dies eine Verbesserung um den Faktor 3,8 dar.

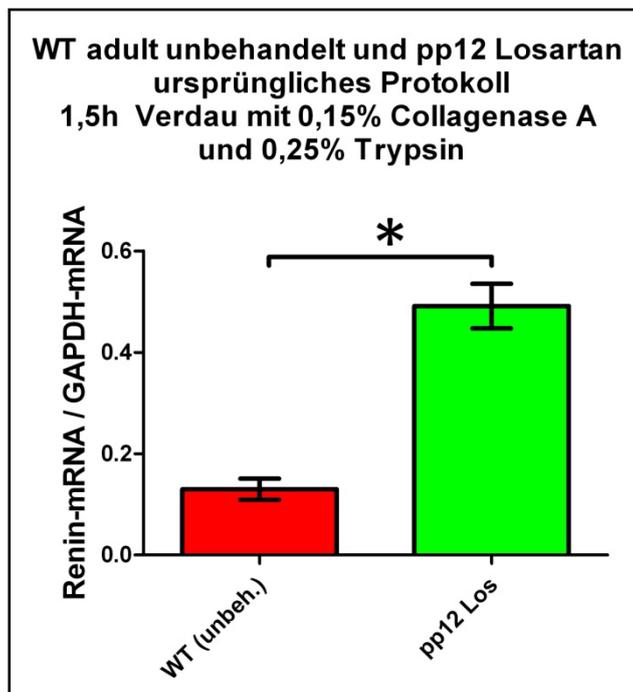


Abb. 3.2:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Ansätze exakt nach der JG-Zell-Präparation von Kurtz et al. (1986) an 12 Tage alten, mit Losartan behandelten, Mäusen. Verdauung mit 0,15% Collagenase A (1,5mg/ml) und 0,25% Trypsin (2,1mg/ml).

* = signifikant $p < 0.05$.

3.2. Modifikation der JG-Zell-Präparation

3.2.1. Variation der Verdaulösung

Zunächst wurde versucht, das ursprüngliche Protokoll im Hinblick auf den Verdau zu optimieren. Dabei wurde die Konzentration der verwendeten Verdauenzyme variiert. Unter der Annahme, dass Trypsin zu aggressiv für den Verdau sei, wurde dieses Enzym gänzlich aus der Verdaulösung herausgenommen und fortan nur noch Collagenase A in wechselnden Konzentrationen eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, erbrachte die Verwendung einer Verdaulösung mit 0,15% Collagenase A bei einer adulten unbehandelten Maus für das Renin- zu GAPDH-mRNA-Verhältnis einen Kontrollwert von 1,08 und überstieg somit die vorangehenden Ergebnisse unter Trypsinverwendung um den Faktor 8,3.

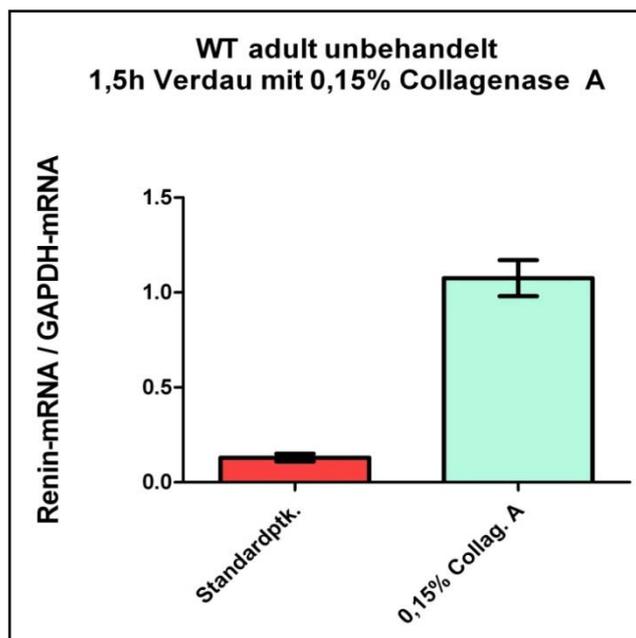
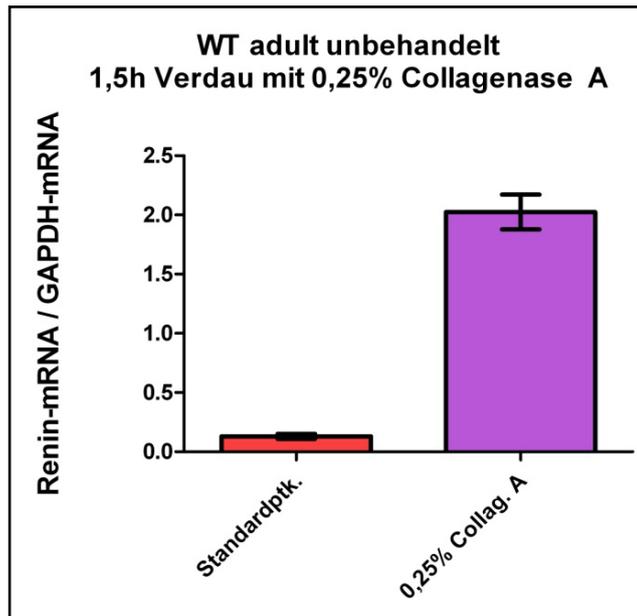


Abb. 3.3:

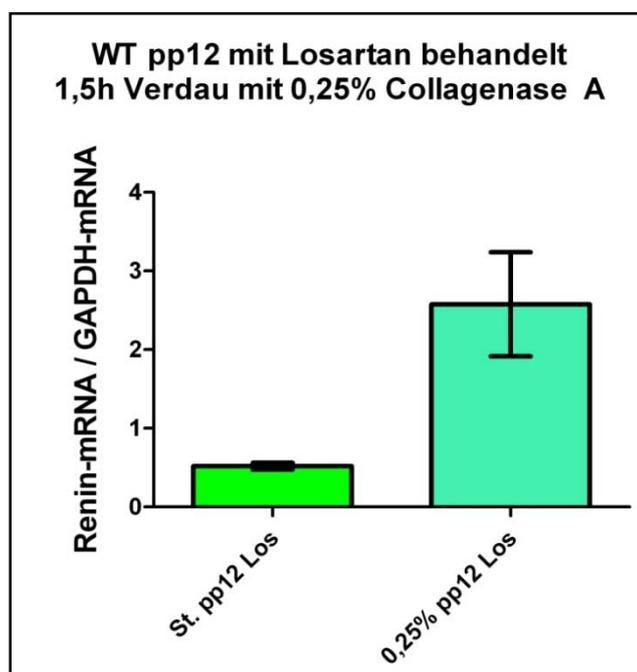
Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer unbehandelten adulten Maus nach JG-Zell-Präparation mit 0,15% Collagenase A im Vergleich zur Kontrolle des Standardprotokolls.

Unter alleiniger Verwendung von 0,25% Collagenase A in der Verdaulösung ergab sich bei einer unbehandelten adulten Maus ein Kontrollwert von 2,02 (Abb. 3.4). Im Vergleich zum Standardprotokoll stellt dies eine Steigerung um den Faktor 15,5 dar.

**Abb. 3.4:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer unbehandelten adulten Maus nach JG-Zell-Präparation mit 0,25% Collagenase A im Vergleich zur Kontrolle des Standardprotokolls.

Auch bei mit Losartan stimulierten 12 Tage alten Mäusen wurde ein Versuchsdurchgang mit 0,25% Collagenase A in der Verdaulösung durchgeführt. Nachdem sich bei den Versuchen mit unbehandelten Mäusen eine verbesserte Anreicherung abzeichnete, sollte dieser Versuch veranschaulichen, ob die Elimination von Trypsin aus der Verdaulösung auch bei stimulierten Mäusen von Vorteil ist. Es ergab sich ein Kontrollwert von 2,58 (Abb. 3.5). Im Bezug auf die Durchführung des Standardprotokolls bei entsprechend stimulierten Mäusen, ließ sich hierbei eine Steigerung um den Faktor 4,96 erzielen.

**Abb. 3.5:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan stimulierten Maus nach der JG-Zell-Präparation mit 0,25% Collagenase A in der Verdaulösung. Vergleich zur Kontrolle entsprechender Tiere nach dem Standardprotokoll.

3.2.2. Vorperfusion

Im Hinblick auf eine weitere Verbesserung des Enzymverdaus wurden die Versuchstiere beim folgenden Versuch vor der Nierenentnahme mit Verdaulösung perfundiert. Zum einen war es wesentliches Ziel Blutzellen, welche später wieder eine Verunreinigung der Zellsuspension darstellten, schon im Vorhinein aus der Niere zu spülen. Zum anderen, sollte so das gesamte Organ gleichmäßig verdaut werden. Das weitere Vorgehen entsprach, bis auf die Zusammensetzung der Verdaulösung, dem ursprünglichen Protokoll.

Ein Versuchsansatz mit vorangehender Perfusion einer Verdaulösung mit 0,15% Collagenase A und anschließendem 1,5 stündigen Verdau in der gleichen Lösung ergab für die Kontrolle einen Wert von 0,57 (Abb. 3.6). Im Vergleich zum Mittel des Ausgangsprotokolls von 0,13, bedeutet dies eine mehr als vierfache Steigerung. Stellt man jedoch einen Vergleich zu einem entsprechenden Ansatz ohne Vorperfusion her, so fällt dieses Ergebnis um den Faktor 1,9 kleiner aus (Abb. 3.6). Da dieser Versuch somit keinen Vorteil im Hinblick auf die Aufreinigung der Reninzellen versprach, wurde die aufwendige Methode der Vorperfusion nicht weiter verfolgt.

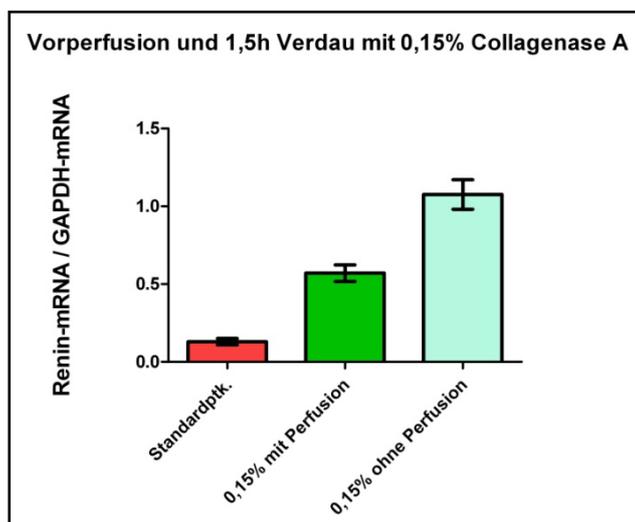


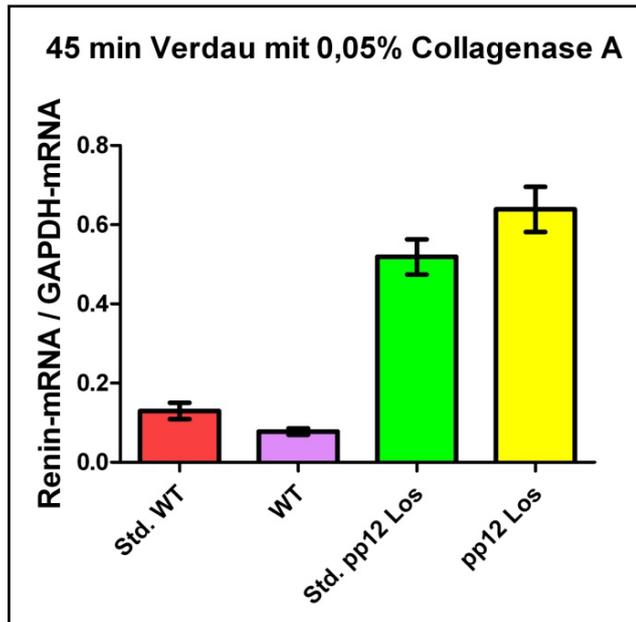
Abb. 3.6:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Versuchsansatz nach der JG-Zell-Präparation mit vorangehender Perfusion von Verdaulösung bei einer adulten unbehandelten Maus (grün). Die Verdaulösung enthält 0,15% Collagenase A. Aufgeführte Vergleichswerte: entsprechender Versuch ohne Vorperfusion (hellblau) und Standardprotokoll bei unbehandelten adulten Mäusen (rot).

3.2.3. Verkürzung der Verdauzeit

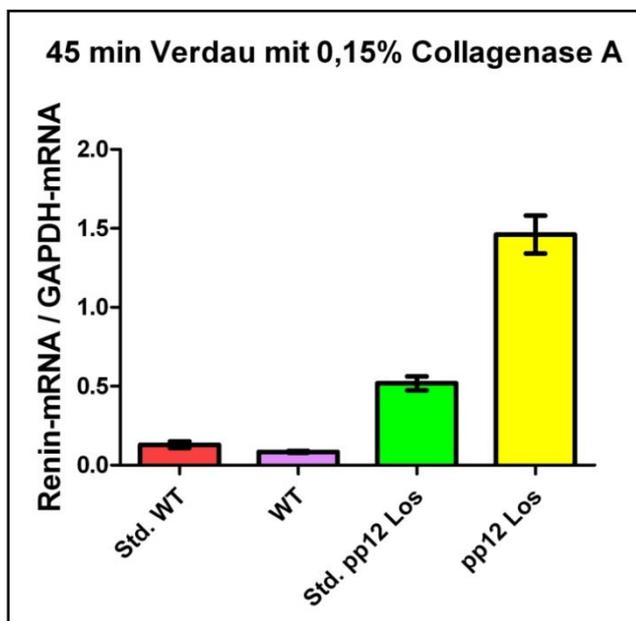
Im Folgenden wurde neben der Zusammensetzung der Verdaulösung, zusätzlich auch die Dauer des Verdaus in den Focus der Verbesserungsstrategie gerückt. Aufgrund der Annahme, dass ein langer Verdau, neben erhöhtem Zellverlust, in einer stressbedingten Entleerung der Reninspeichergranula resultieren könnte, wurde versucht, die Dauer des Verdaus erfolgversprechend zu verkürzen. Aus diesem Grund wurden drei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Verdaulösungen von 0,05%, 0,15% und 0,25% Collagenase A angelegt. Die Dauer des Verdaus wurde jeweils auf 45 min festgelegt, was der Hälfte der 90-minütigen Verdauzeit des Standardprotokolls entsprach. Obwohl bereits bekannt war, dass 0,25% Collagenase A das beste Ergebnis beim 90min-Verdau lieferte, wurde bei den 45min-Versuchen auch mit geringeren Konzentrationen des Verdauenzym gearbeitet, um mögliche Reninzellverluste während des längeren Verdaus ausschließen zu können und einen besseren Überblick über die Auswirkung ansteigender Konzentrationen an Collagenase A zu erhalten. Neben adulten unbehandelten Mäusen wurden auch 12 Tage alte mit Losartan behandelte Mäuse verwendet. Zur besseren Veranschaulichung wurden in den Abbildungen die anhand des Standardprotokolls ermittelten Referenzwerte nach 90min Verdau für die jeweiligen Tiere mit aufgeführt.

Abbildung 3.7 zeigt einen 45-minütigen Verdau mit 0,05-prozentiger Collagenase A-Lösung. Während man beim unbehandelten adulten Wildtypen eine Verringerung des Kontrollwertes um den Faktor 0,6 beobachtet, zeichnet sich bei den juvenilen Losartan behandelten Mäusen eine Erhöhung um den Faktor 1,2 ab.

**Abb. 3.7:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,05% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (gelb). Zum Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

Beim 45min Verdau ergibt sich bei einer unbehandelten adulten Maus mit einem Kontrollwert von 0,08 ein ähnliches Bild einer Verringerung um den Faktor 0,63. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der juvenilen mit Losartan behandelten Maus, mit einem Wert von 1,46, erneut eine Steigerung um den Faktor 2,8 (Abb. 3.8).

**Abb. 3.8:** Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,15% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (gelb). Zum Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

Unter Verwendung von 0,25% Collagenase A ergab sich nach 45min Verdau auch bei der unbehandelten adulten Maus eine Erhöhung im Vergleich zum Standardprotokoll. Diese Steigerung auf annähernd das Doppelte ergab einen Wert von 0,25. Auch bei der 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus ließ

sich der Wert des Standardprotokolls noch weiter übertreffen. Mit einem Steigerungsfaktor von 4,8 erreichte dieser Ansatz einen Wert von 2,45 (Abb. 3.9).

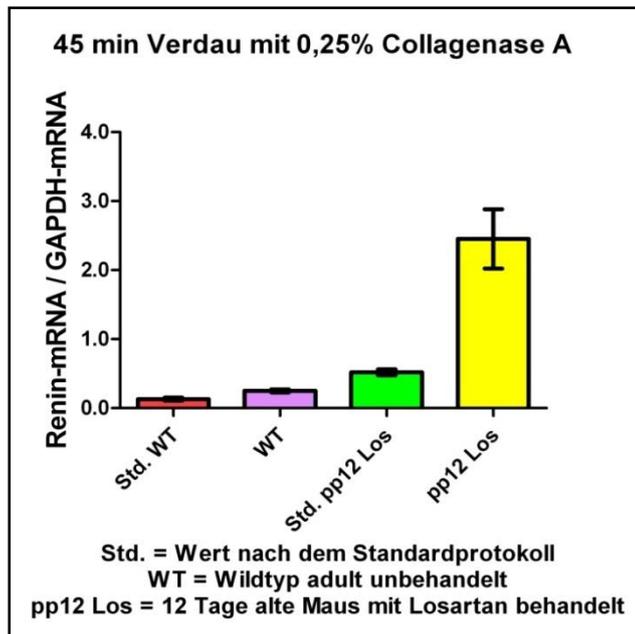


Abb. 3.9:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,25% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (=WT) (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (pp12 Los) (gelb).

Zum Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

3.3. Beadperfusion

Aufgrund der nicht allzu weitreichenden Verbesserungen bei den Ansätzen, denen das ursprüngliche JG-Zell-Protokoll zugrunde lag, wurden auch zahlreiche andere Verfahren in Erwägung gezogen, welche für die Isolierung der reninbildenden Zellen dienlich schienen. Dabei rückten Zellisolierungsverfahren mit Hilfe von magnetischen Partikeln, sogenannten Beads, immer weiter in den Vordergrund des Interesses. Die Perfusion von Beads definierter Größe, und eine diesbezügliche Aufreinigung anhand der gegebenen anatomischen Strukturen, schienen vielversprechend.

3.3.1. Beadperfusion an unbehandelten Mäusen

Ausgehend von einer bereits bestehenden Methode, Glomeruli mit Beads von 4,5µm Durchmesser zu isolieren, wurden nun Versuche mit größeren Beads von 6 bzw. 8µm Durchmesser angestrebt. Während sich die 4,5µm Beads nach Perfusion im Gefäßnetzwerk der Glomeruli festsetzten, war der Grundgedanke hinter den Ansätzen mit größeren Beads, dass sich diese aufgrund ihrer Größe

bereits in den afferenten Arteriolen festsetzen und so Gefäßfragmente mit den darin befindlichen Reninzellen isoliert werden können.

Bei den folgenden Experimenten wurde auf eine langwierige Zellkultur verzichtet und die RNA direkt aus dem Isolat separiert und vermessen. Aufgrund einer nicht zu verachtenden Zunahme des Reninzellgehaltes in Zellkultur, welche Kurtz et al. 1986 bereits in früheren Untersuchungen aufzeigten, konnte fortan kein direkter Vergleich zu den vorangehenden Versuchsansätzen hergestellt werden. Als neue Referenzgröße wurde deswegen das Renin-GAPDH-Verhältnis von kompletten Nieren unbehandelter adulter Mäuse ermittelt. Variierende Werte der ersten Beadansätze legten ferner eine mehrfache Durchführung der jeweiligen Ansätze nahe, um aussagekräftigere Mittelwerte zu erhalten. Da Reninzellen bei adulten Wildtypmäusen in der Regel am vaskulären Pol der Glomeruli, d.h. sehr nah am Glomerulus lokalisiert sind, wurde bewusst auch mit 4,5µm Beads gearbeitet, welche ohne Probleme bis in die Glomeruli gelangen. Vorangehende mikroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, dass einem Großteil der so isolierten Glomeruli Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen mit Reninzellen anhafteten (Abb. 3.10).

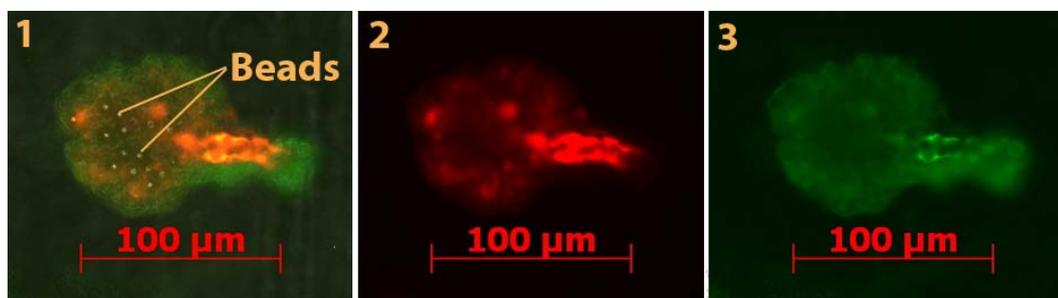


Abb. 3.10:

Immunhistochemie mit anti-Glattmuskelaktin (rot) und anti-Renin Antikörpern (grün) bei einem mit 4,5µm-Beads isolierten Glomerulus mit anhängender afferenter Arteriole einer unbehandelten adulten Maus.

1: Mischbild aus Durchlicht und Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün).
2: Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin. 3: Immunfluoreszenz von Renin.

Zur Schaffung einer geeigneten Bezugsgröße für die Zellaufreinigung ohne Zellkultur wurden komplette Nieren von drei adulten unbehandelten Wildtypmäusen kleingeschnitten und ohne jeglichen Aufreinigungsschritt die mRNA-Konzentration von Renin und GAPDH vermessen. Dies ergab einen Mittelwert von 3,29.

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, lieferte die Perfusion von Wildtypen mit 4,5µm-Beads bei sechs Versuchen einen Mittelwert von 13,7. Im Hinblick auf das Verhältnis Renin- zu GAPDH-mRNA ganzer Nieren kommt dies einer gesteigerten Aufreinigung um den Faktor 4,16 gleich. Der durch den Fehlerbalken angedeuteten Streuung liegen Einzelwerte von 3,04 bis 28,2 zugrunde.

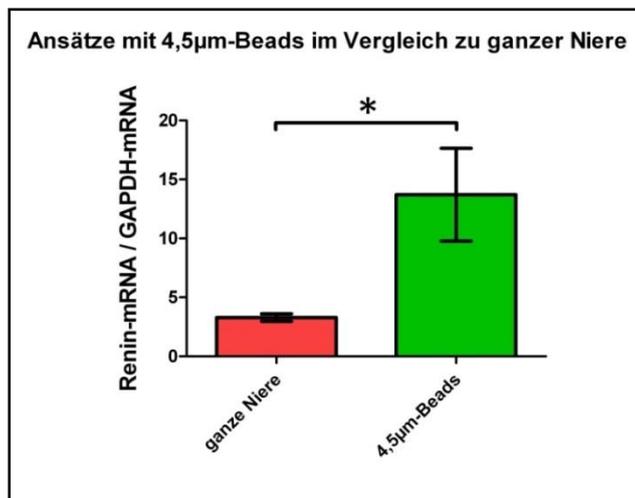
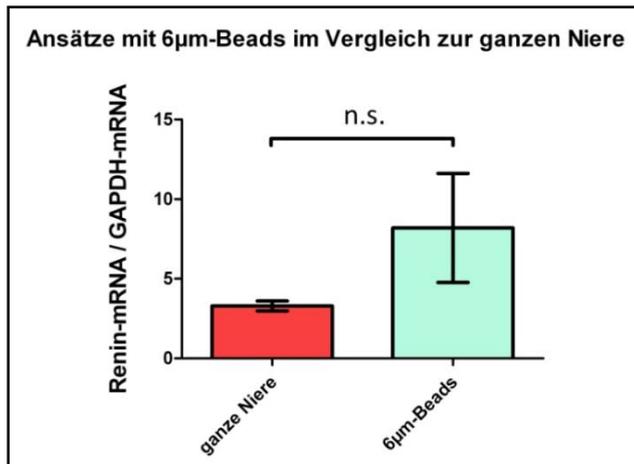


Abb. 3.11:

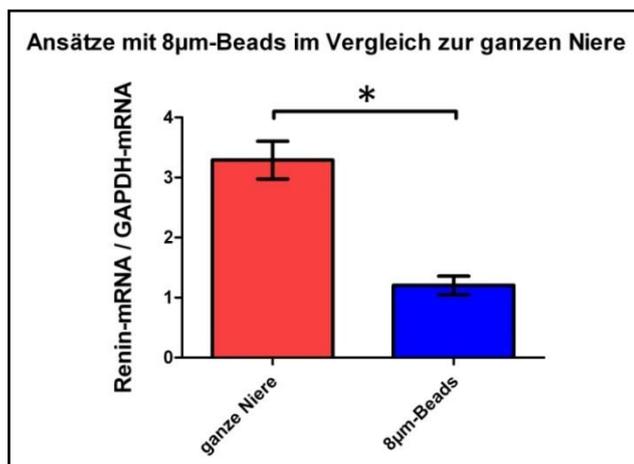
Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 4,5µm-Beads und Magnetisolierung bei sechs adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

Das mRNA-Verhältnis von Renin zu GAPDH beläuft sich nach einer Perfusion von adulten unbehandelten Wildtypen mit 6µm-Beads auf einen Mittelwert von 8,20 und liegt im Vergleich zum Mittel des 4,5µm-Bead-Ansatzes deutlich niedriger. Im Vergleich zu den ganzen Nieren ergibt sich jedoch auch hier eine Steigerung um den Faktor 2,5 (Abb. 3.12). Dem Mittelwert liegen Einzelwerte von 1,24 bis 19,9 zugrunde, wobei hier zwei der fünf Werte mit 1,24 und 2,70 unter dem Mittel der kompletten Nieren von 3,29 liegen. Bei einem der ermittelten Werte wurden zusätzlich zu den 6µm-Magnetbeads auch noch blaue 6µm-Latexbeads verwendet, um die Lage der Partikel nach der Perfusion und während des Siebeschrittes makroskopisch verfolgen zu können. Nach der Perfusion stellten sich die Nieren hierbei äußerlich blau gefärbt dar. Ein Segmentalschnitt durch die Niere zeigte eine deutliche Anhäufung der blauen Beads in der Zona juxtamedullaris und mittleren Anteilen des Nierenkortex. Bei der Passage des 100µm-Nylonsiebes, direkt nach dem Verdau, wurde ferner ersichtlich, dass einige blau gefärbte Anteile im Sieb zurückblieben. Ein Versuch, die blauen Latexpartikel einer Isolatprobe unter dem Mikroskop in Relation zur Lage der Reninzellen darzustellen, verlief leider erfolglos.

**Abb. 3.12:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA Mittelwert nach Perfusion von 6µm-Beads und Magnetisolation bei fünf adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. n.s. = nicht signifikant mit $p = 0,059$.

Bei den Ansätzen mit 8µm-Beads ergab sich aus den fünf Einzelwerten ein Mittel von 1,20, welches deutlich unter dem Referenzwert der kompletten Nieren liegt (Abb. 3.13). Die zugrundeliegenden Einzelwerte von 0,83 bis 1,52 zeigten, ersichtlich am Fehlerbalken des Mittelwertes, eine viel geringere Streuung als die vorangegangenen Versuche mit kleineren Beads. Ein Zusatz von 8µm-Latexbeads bei einer der fünf Proben, enthüllte ein ähnliches Bild der Anhäufung im Nierenkortex, wie der vergleichbare Ansatz mit den 6µm-Beads.

**Abb. 3.13:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 8µm-Beads und Magnetisolation bei fünf adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

3.3.2. Beadperfusion an Low Salt und Enalapril stimulierten Mäusen

Besonders im Hinblick auf die Isolierung von Gefäßfragmenten, schien im weiteren Vorgehen die Verwendung von Mäusen sinnvoll, welche, im Gegensatz zum unstimulierten Wildtypen, mehr Reninzellen entlang der afferenten

Arteriolen besitzen. Stimulierte Wildtypen, welche über drei Wochen eine Niedrigsalzdiät und eine Verabreichung des ACE-Hemmers Enalapril über das Trinkwasser erhielten (3Wo LS-Ena), schienen somit sehr geeignet für den nächsten Schritt in der Verbesserungsstrategie. Im direkten Vergleich zum unstimulierten Wildtypen, zeigen diese LS-Ena-Mäuse weitaus mehr reninbildende Zellen im juxtaglomerulären Bereich, wobei sich diese weiter nach proximal entlang der afferenten Arteriolen erstrecken.

Wie in Abb. 3.14 zu sehen, zeigten LS-Ena-Mäuse bei der Auswertung ganzer Nieren im Mittel einen Wert von 41,5, während man sich beim unbehandelten Wildtypen bei einem Wert von 3,29 bewegte. Auch hier verzeichnet die 4,5µm-Bead-Methode im Vergleich zu ganzen LS-Ena-Nieren eine Erhöhung um den Faktor 8, welche einen Mittelwert von 333 liefert (Abb. 3.14). Im Bezug auf die ganzen Nieren unbehandelter Mäuse lässt sich hier eine hundertfache Steigerung erkennen.

Dem erheblichen Fehlerbalken liegt eine breite Streuung der Einzelwerte von 28 bis 1235 zugrunde. Der Medianwert liegt bei 165.

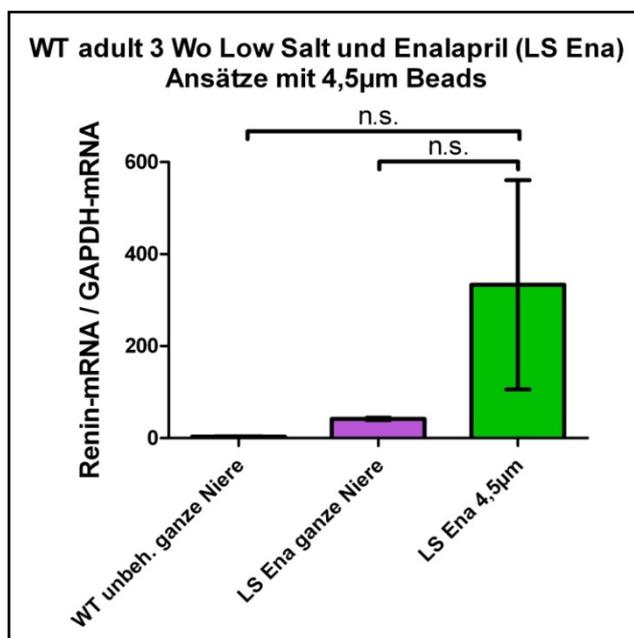


Abb. 3.14:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 4,5µm-Beads und Magnetisolation bei fünf adulten, drei Wochen mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelte und unbehandelte Tiere.

n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Unter Verwendung von 6µm-Beads erhält man bei LS-Ena-Mäusen Werte, die im Mittel 24 ergeben (Abb. 3.15). Im Bezug auf die ganzen LS-Ena-Nieren stellt

dieser Wert eine Verringerung um den Faktor 0,73 dar, liegt jedoch um den Faktor 7,3 höher als der Referenzwert der unbehandelten kompletten Nieren.

Die fünf Einzelwerte zeigen auch hier wieder eine markante Streuung und erstrecken sich von 1,24 bis 56,7. Bis auf einen Wert von 39,1 und einen noch höheren Wert von 56,7 reichen die Einzelwerte nicht an den Mittelwert der ganzen LS-Ena-Nieren von 41,5 heran.

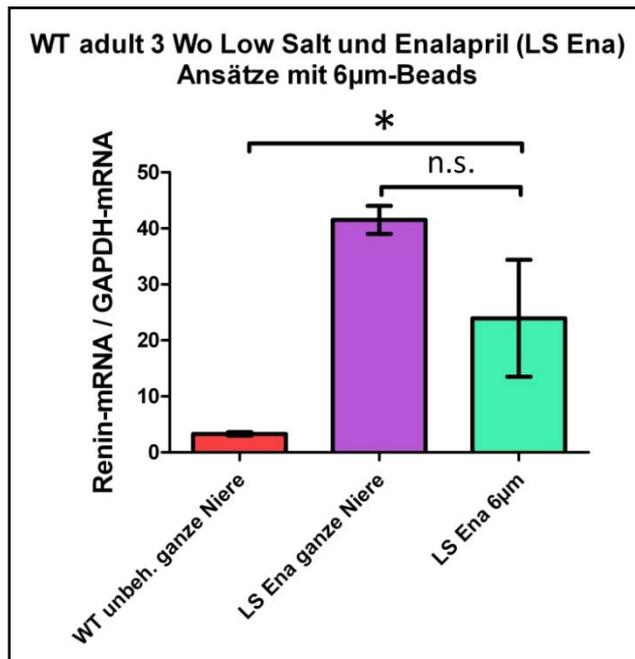
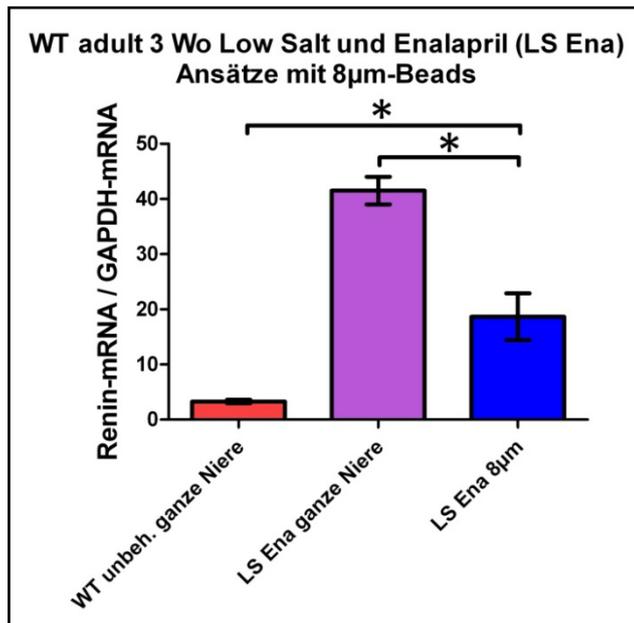


Abb. 3.15:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 6µm-Beads und Magnetisolation bei fünf adulten, drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelte und unbehandelte Tiere. * = signifikant $p < 0,05$. n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Bei der 8µm-Beadperfusion (Abb. 3.16) liegen die fünf Einzelwerte, bis auf eine Ausnahme von 2,65, alle um 20 (17,5 bis 25,2). Wie schon bei den Versuchen mit unbehandelten Mäusen, zeigt die 8µm-Bead-Methode auch bei den LS-Ena-Mäusen eine geringere Streuung als die Versuche mit 4,5µm- und 6µm-Beads. Der errechnete Mittelwert ergibt 18,7, was in etwa der Hälfte des Bezugswertes der ganzen LS-Ena-Nieren gleich kommt (Abb. 3.16). Im Vergleich zu den ganzen Nieren unbehauelter Mäuse liegt dieser Wert um den Faktor 5,7 höher.

**Abb. 3.16:**

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 8µm-Beads und Magnetisolation bei fünf adulten, drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelten und unbehandelten Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

3.3.3. Beadperfusion an Losartan stimulierten Mäusen

Eine weitere Strategie, welche auch bei den Abwandlungen des ursprünglichen Protokolls schon verfolgt wurde, war die Stimulation von Wildtypen mit Losartan (30mg/kg) ab dem postpartalen Tag 1 (pp1) bis zum Tag der Organentnahme.

Die so stimulierten Wildtypen zeigen eine beachtliche Vermehrung der reninbildenden Zellen, welche hier weitreichend proximal entlang der afferenten Arteriolen und auch in größeren Gefäßabschnitten rekrutiert sind. Dieser Umstand macht sie wiederum sehr interessant für die Isolation von Gefäßfragmenten mittels Beadperfusion.

Auch bei den Losartan-Mäusen wurden wieder drei Werte erstellt, welche das Verhältnis von Renin- zu GAPDH-mRNA in einer kompletten Niere widerspiegeln sollten. Während man beim unbehandelten Wildtypen in der ganzen Niere ein Verhältnis von 3,18 erhielt, lieferten über 12 Tage mit Losartan behandelte Tiere hier einen vielfach höheren Mittelwert von 210. Zwei Ansätze mit 6µm-Beads bei pp12-Los-Mäusen ergaben Werte von 256 und 765, welche um den Faktor 1,22 bzw. 3,64 höher als bei unaufgereinigten Nieren lagen. Einen viel höheren Wert von 2677, was einer Steigerung um den Faktor 12,7 gegenüber ganzen pp12-Los-Nieren entsprach, erbrachte die Durchführung der 8µm-Bead-Perfusion (Abb. 3.17).

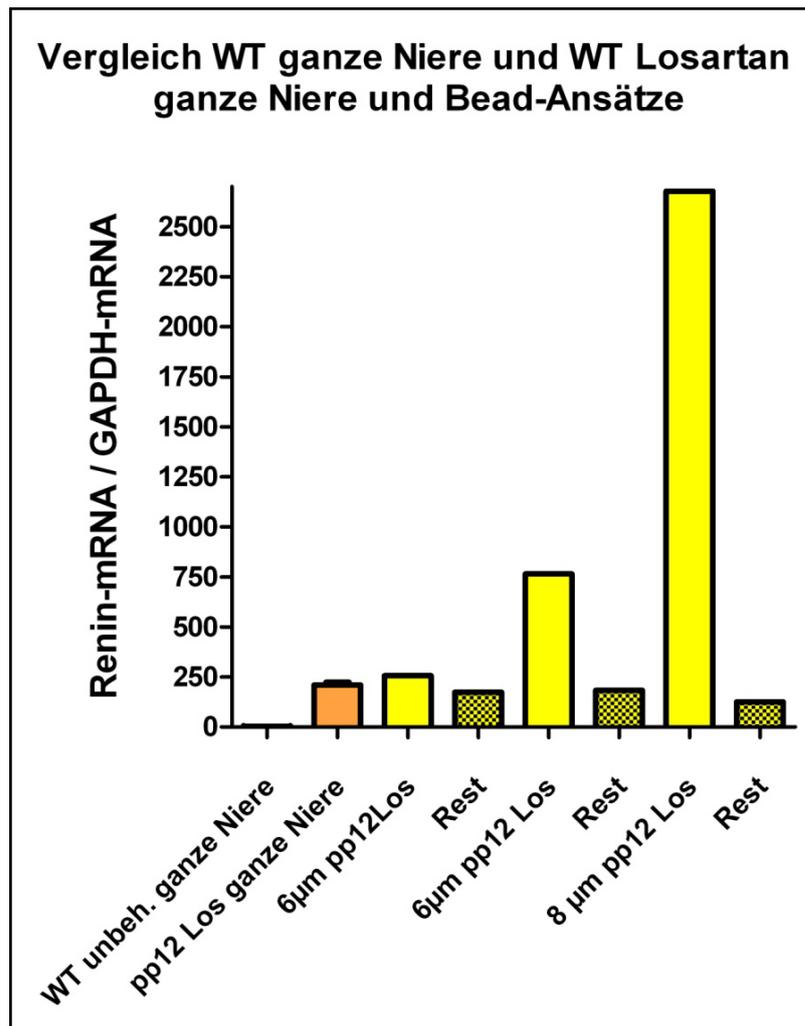


Abb. 3.17: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA nach Perfusion von 6µm- bzw. 8µm-Beads und Magnetisolierung bei drei 12 Tage alten, mit Losartan behandelten, Mäusen. Auf den jeweiligen Wert folgt eine Auswertung des restlichen Nierengewebes nach der Magnetisolierung (Rest). Im Vergleich dazu sind Mittelwerte dreier kompletter Nieren unbehandelter adulter Mäuse (WT unbeh.) und dreier kompletter Nieren von Losartan behandelten Mäusen im Alter von 12 Tagen (pp12 Los) aufgeführt.

3.3.4. Vitalitätskontrolle anhand Zellkultur

Um eine mögliche Toxizität des Verfahrens mit Beadperfusion und Magnetisolierung auszuschließen, wurden die Isolate in den folgenden Versuchen, entsprechend den Versuchen nach dem Standardprotokoll, in Zellkultur gegeben und durch Zugabe von Forskolin und Endothelin hinsichtlich der Vitalität der Reninzellen getestet. Jeweils drei adulte unbehandelte Mäuse wurden mit 6µm- und 8µm-Beads perfundiert, und die Zellfragmente nach dem Verdau mit einem Magneten isoliert. Die so gewonnenen Isolate wurden für 20h in Zellkultur

gegeben. Während die Kontrolle daraufhin unbehandelt blieb, wurde eine Fraktion mit Forskolin versehen, eine mit Endothelin und eine mit Forskolin und Endothelin zusammen. Nach weiteren 24h in Kultur wurde die RNA-Konzentration vermessen.

Bei der Perfusion von drei adulten unbehandelten Wildtypmäusen mit $6\mu\text{m}$ -Beads und anschließender Zellkultur ergab die Kontrolle für das Renin- zu GAPDH-mRNA-Verhältnis einen Mittelwert von 3,37 (Abb. 3.18). Eine Forskolinzugabe sorgte diesbezüglich für eine markante Erhöhung auf einen mittleren Wert von 12,5. Eine Endothelinzugabe hingegen vermochte den Mittelwert, im Vergleich zur Kontrolle, merklich auf 0,89 zu verkleinern. Auch der gleichzeitige Zusatz von Endothelin und Forskolin spiegelte die Hemmwirkung des Endothelins gegenüber dem Forskolin wieder (Abb. 3.18). Der so erhaltene Wert (e+f) zeigte sich mit 7,38 signifikant niedriger als der Wert nach alleiniger Forskolinstimulation (f).

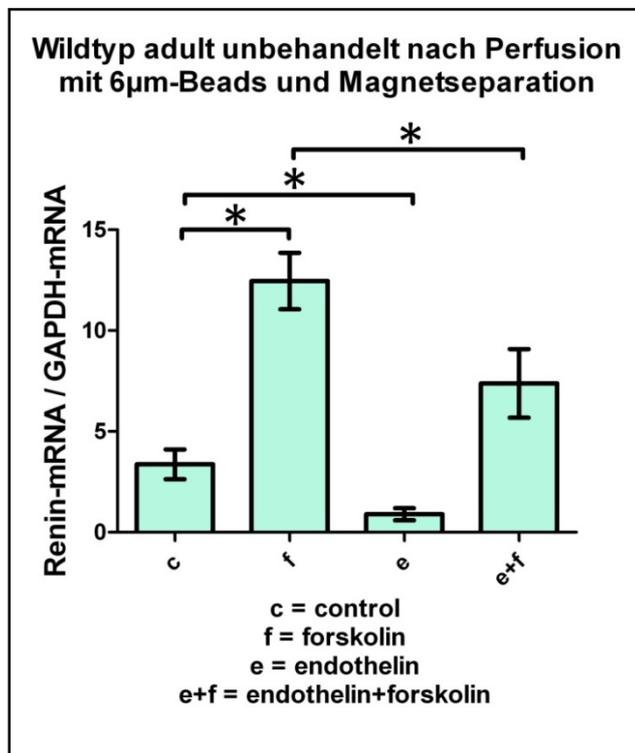


Abb. 3.18:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA nach Perfusion von $6\mu\text{m}$ -Beads, Magnetisolierung und 44h Zellkultur bei drei adulten unbehandelten Mäusen.

* = signifikant $p < 0,05$.

Eine $8\mu\text{m}$ -Beadperfusion bei drei adulten unbehandelten Wildtypen mit anschließender Zellkultur ergab für die Kontrolle einen Mittelwert von 37,5. Auch hier lieferte die Forskolinzugabe mit 102 einen deutlich höheren Wert als die Kontrolle. Eine Endothelinzugabe hingegen konnte den Wert der Kontrolle auf 13,2 verringern, wobei dies keine signifikante Änderung darstellt. Darüber hinaus konnte Endothelin, die stimulierende Wirkung von Forskolin nach kombinierter Zugabe beider Substanzen auch in diesem Fall signifikant eindämmen (Abb. 3.19).

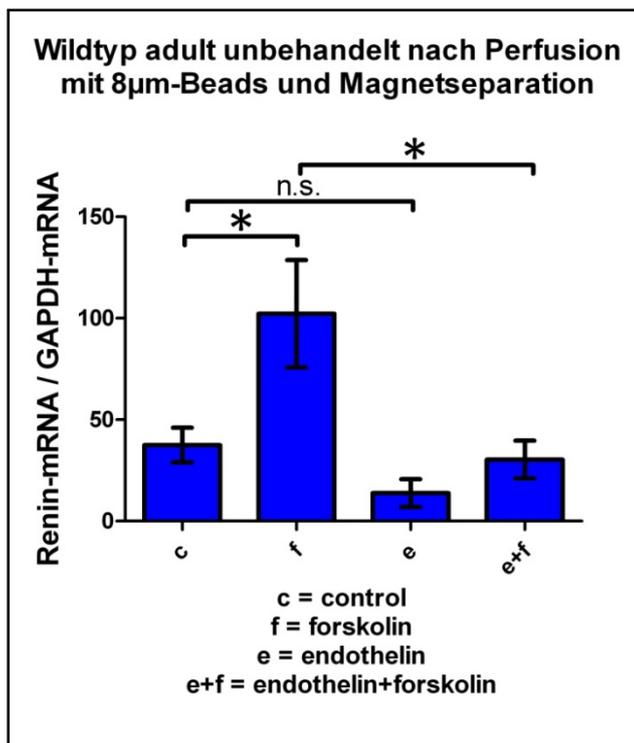


Abb. 3.19:

Verhältnis Renin-mRNA / GAPDH-mRNA nach Perfusion von $8\mu\text{m}$ -Beads, Magnetisolierung und 44h Zellkultur bei drei adulten unbehandelten Mäusen.

* = signifikant $p < 0,05$.

n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Die Reninzellen in Kultur erwiesen sich anhand der Wirkung von Forskolin und Endothelin auch nach Beadperfusion und anschließender Magnetaufreinigung als intakt. Aus diesem Grund scheint diese Methode als durchaus geeignet für die Erreichung des Ziels einer intakten Reninzellkultur von möglichst hohem Reinheitsgrad.

4. Diskussion

4.1. JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst die JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. von 1986 wiederholt, um neben der Feststellung der Reproduzierbarkeit auch einen Überblick über die einzelnen Verfahrensschritte zu erhalten. Dabei wurde sowohl auf Schwierigkeiten, als auch auf mögliche Verbesserungen einzelner Elemente dieser Standardmethode geachtet.

4.1.1. Schwierigkeiten und Verbesserungen

Der wesentliche Schritt der Dichtegradientenaufreinigung unter Sorvall-Zentrifugation in einem Percoll-Gemisch erwies sich von Anfang an als kritikwürdig, da sich die anschließende Entnahme einer bestimmten Phase mit hohem Gehalt an Reninzellen als äußerst schwierig und variabel darstellte. Von den vier Phasen, die von Kurtz et al. (1986) beschrieben wurden, konnten bei den Durchführungen stets nur drei beobachtet werden (Abb 4.1 / Phasen 1-3).



Abb. 4.1: Schichtung des Percollgradienten nach Zentrifugation im Sorvallbecher bei der Durchführung der JG-Zell-Präparation (nach Kurtz et al., 1986).

Am Grunde des Sorvall-Gefäßes setzten sich zwar eine Vielzahl von Zellen ab, die bei den ersten Versuchen, aufgrund der enthaltenen Erythrozyten, auch eine rote Färbung zeigten. Jedoch ließ die relativ breite mittlere Phase, die auch die Schicht mit dem hohen Anteil an reninbildenden Zellen enthalten sollte, mit bloßem Auge keine weitere Schichtung erkennen (Abb. 4.1/Phase 2). Die Entnahme von Zellen aus dem Gemisch leicht oberhalb der untersten zu erkennenden Phase stellte somit eher ein gefühlsmäßiges Vorgehen als einen genau definierten und reproduzierbaren Vorgang dar. Schwankende Ergebnisse bei der Auswertung der Versuche, denen die JG-Zell-Präparation zugrunde lag, könnten somit in direkter Beziehung zu diesem Entnahmeschritt stehen. Dies stellt nicht nur die Vergleichbarkeit der einzelnen Werte untereinander, sondern auch ihre Aussagekraft im Hinblick auf durch Veränderungen erwirkte Verbesserungen in Frage. Um hier aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, muss demnach auch die Versuchstierzahl sehr hoch angesetzt werden. Die Verbesserung dieses Aufreinigungsschrittes stellte sich somit als zentrales Ziel dieser Arbeit heraus. Als weiterer wichtiger Punkt fiel auch der Verdau des Nierengewebes ins Augenmerk. Ein zu intensiver Verdau kann zu Zellverlusten führen und auch die Vitalität der isolierten Zellen beeinträchtigen. Wichtige Angriffspunkte dabei schienen neben Konzentration und Zusammensetzung der Enzymlösung, auch die Dauer des Verdauvorganges zu sein. Ausgehend von der bereits vorhandenen Methode wurde versucht, diese Punkte jeweils in einzelnen Versuchen zu verbessern. Auftretende Scherkräfte während der Zentrifugation schienen auch einen möglichen Störfaktor im Hinblick auf eine stressbedingte Entleerung der Reninspeichergranula darzustellen. Als wichtiges Element der Standardmethode konnten diese zunächst jedoch keiner Reduktion unterzogen werden. Dieser Aspekt wurde erst bei Durchführung der Beadmethode beachtet, wobei zur Abzentrifugation der Isolatlösung möglichst geringe Rotationsgeschwindigkeiten gewählt wurden.

4.1.2. Standardprotokoll bei unbehandelten Mäusen

Anhand der ersten Versuche wurde die Reproduzierbarkeit der JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al. (1986) festgestellt. Die geringe Streuung bei dreimaliger Durchführung dieses Standardprotokolls ermöglichte es, den daraus errechneten Mittelwert als Bezugsgröße für die Folgeversuche zu verwenden. Die

Vitalität der reninbildenden Zellen in der Zellkultur wurde anhand einer Erhöhung des mRNA-Verhältnisses bei Forskolinzusatz und einer Erniedrigung bei Endothelinzugabe, im Vergleich zum Kontrollwert, eindeutig nachgewiesen (Abb. 3.1). Wären die Zellen tot, würden weder Forskolin- noch Endothelinzugaben eine Änderung hervorrufen (Kurtz et al., 1986; Moe et al., 1991). Im Gegensatz zur weitreichenden Stimulation durch Forskolinzugabe, fiel die Hemmwirkung bei alleiniger Endothelinzugabe eher gering aus. Dies kann auf eine eventuell verminderte Wirksamkeit des verwendeten Endothelins zurückgeführt werden. Jedoch verdeutlichte sich die Hemmwirkung von Endothelin bei gleichzeitiger Zugabe von Forskolin und Endothelin, wobei die Stimulation durch Forskolin deutlich abgeschwächt wurde (Abb. 3.1).

4.1.3. Standardprotokoll bei Losartan stimulierten Mäusen

Die Durchführung der JG-Zell-Präparation mit Mäusen, die durch eine Stimulation des RAAS erheblich mehr reninbildende Zellen exprimieren, sollte veranschaulichen, dass mit einem höheren Gehalt an Zielzellen im Ausgangsgewebe, bei äquivalenter Versuchsdurchführung, auch eine bessere Aufreinigung erzielt werden kann.

Die Verwendung von mit Losartan stimulierten 12 Tage alten Mäusen verdeutlichte, dass sich die Aufreinigung der reninbildenden Zellen nach dem Standardprotokoll von Kurtz et al.(1986) steigern ließ. Im Vergleich zu unbehandelten Nieren ermöglichte der gesteigerte Anteil an Reninzellen in stimulierten Nieren, bei gleichem Vorgehen, einen um den Faktor 3,8 besseren Reinheitsgrad. Die vermehrte Reninexpression in stimulierten Nieren führt zu einem erhöhten Anteil an Reninzellen in der entnommenen Phase des Dichtegradienten und ermöglicht so ein reineres Isolat. Wie die Auswertung von ganzen Nieren zeigt, besaßen unbehandelte adulte Mäuse mit 3,29 im Mittel viel kleinere Kontrollwerte als 12 Tage alte mit Losartan behandelte Mäuse, welche im Schnitt bei 210 lagen (Abb. 3.18). Der daraus errechnete Steigerungsfaktor von 64 lässt sich mit der JG-Zellpräparation folglich nicht erreichen. Grund dafür ist neben dem verbesserungswürdigen Verdau und den Scherkräften während der Zentrifugation, vor allem die ungenaue Phasenentnahme aus dem Dichtegradienten.

4.2. Modifikation der JG-Zell-Präparation

4.2.1. Variation der Verdaulösung

Die erste vorgenommene Veränderung am Ausgangsprotokoll nach Kurtz et al. von 1986 war die Abwandlung der Zusammensetzung der Verdaulösung. Da die Endopeptidase Trypsin sich, im Gegensatz zu Collagenase, beim Verdau nicht auf bestimmte Proteine beschränkt, sondern auf gewisse Merkmale in der Eiweißstruktur spezialisiert ist, wurde diese als ungeeignet erachtet und aus der Verdaulösung herausgenommen. Ansteigende Kontrollwerte nach der kompletten Elimination von Trypsin aus dem Verdau, lassen darauf schließen, dass Trypsin durch zu aggressiven Verdau zu Zellverlusten führte. Dies legte den Verzicht auf Trypsin während der sich anschließenden Versuche nahe. Unter alleiniger Verwendung von Collagenase A in der Verdaulösung schien eine Erhöhung der Konzentration von 0,15% auf 0,25% zunächst sehr dienlich für die Verbesserungsstrategie, da sich bei einer unbehandelten Maus ein Kontrollwert von 2,02 (Abb. 3.4) erzielen ließ, wohingegen ein entsprechender Ansatz mit 0,15% Collagenase A nur 1,08 (Abb. 3.3) erbrachte.

Die schlechtere Ausbeute an Reninzellen beim Verdau mit 0,15% Collagenase A ist auf einen geringeren Fortschritt des Verdau bis auf Einzelzellebene zu gründen. Beide Werte lagen jedoch höher als die Ergebnisse nach dem Ausgangsprotokoll mit 0,25% Trypsin und 0,15% Collagenase A.

4.2.2. Vorperfusion

Eine vorangehende Perfusion mit Verdaulösung sollte neben einem gleichmäßigen Verdau auch die Entfernung zellulärer Blutbestandteile aus dem Ausgangsgewebe gewährleisten. Doch dieses Vorgehen schien den Verdau nicht weitreichend zu verbessern. So ergab eine Perfusion von 0,15% Collagenase A-Lösung und sich anschließendem 90min-Verdau einen Kontrollwert von 0,57 (Abb. 3.6), der sogar leicht geringer war als die Kontrolle von 1,08 (Abb. 3.3) eines vergleichbaren Versuches ohne Perfusion. Bereits beim Perfusionsvorgang könnten die Reninzellen zur Ausschüttung von Renin bewegt worden sein. Auch ein vermehrter Zellverlust von reninbildenden Zellen durch einen zu früh einsetzenden Verdau wäre denkbar, da die Verdaulösung beim Perfusionsvorgang

in unmittelbare Nähe zur Lokalisation der Zielzellen gelangt. In der Folge würde dies auch kleinere Werte im Renin-GAPDH-mRNA-Verhältnis erklären.

4.2.3. Verkürzung der Verdauzeit

Eine Halbierung der Verdauzeit auf 45min sollte einem übermäßigen Zellverlust durch zu langen Verdau vorbeugen. Unter Verwendung Losartan stimulierter Mäuse erwies sich dieses Vorgehen bei allen drei verwendeten Collagenase A-Lösungen von 0,05%, 0,15% und 0,25% als vorteilhaft. Während sich die Reinheit der Reninzellen mit 0,05% und 0,15% Collagenase A nur um den Faktor 1,2 (Abb. 3.7) bzw. 2,8 (Abb. 3.8) steigern ließ, wurde mit 0,25% Collagenase A die beste Steigerung um den Faktor 4,8 erzielt (Abb. 3.9). Obwohl sich bei unbehandelten Mäusen die Ergebnisse nach dem Standardprotokoll bei den beiden niedrigeren Collagenase A-Konzentrationen nicht übertreffen ließen, zeichnete sich auch bei diesen Tieren mit 0,25% Collagenase A eine Verbesserung des Referenzwertes auf das Doppelte ab (Abb. 3.9). Auch hier zeigte sich ein Anstieg der Werte mit steigender Collagenase A Konzentration. Bei der verkürzten Verdauzeit von 45min reichen geringe Konzentrationen von 0,05% bzw. 0,15% Collagenase A nicht aus, um das kleingeschnittene Nierengewebe komplett bis auf Einzelzellebene zu verdauen. Nach dem Verdau noch im Zellverband befindliche Reninzellen bleiben beim Siebeschritt aufgrund ihrer Größe im Nylonnetz zurück, oder werden nach dem Schritt der Dichtegradientenaufreinigung aufgrund ihres Gewichtes mit der untersten Phase verworfen. Je mehr Zellen sich noch im Zellverband befanden, umso weniger Reninzellen konnten nach dieser Methode isoliert werden. Der beste Verdau bis auf Einzelzellebene erzielt somit auch das beste Ergebnis. Die Steigerung der Werte mit der Höhe der Konzentration an Collagenase A verdeutlicht daher, dass eine Konzentration von 0,25% Collagenase A unter den verwendeten Konzentrationen am besten geeignet ist, das Nierengewebe bei 45min Verdau bis auf Einzelzellebene zu verdauen. Neben der Konzentration der Verdaulösung ist natürlich auch die Dauer des Verdaus ausschlaggebend für den Fortschritt des Verdaus und somit für den Gehalt an separierten Einzelzellen. Da bei unbehandelten Mäusen mit einem 90min-Verdau von 0,15% bzw. 0,25% Collagenase A (Abb. 3.3 + 3.4) im Vergleich zum 45min Verdau (Abb. 3.8 + 3.9) jedoch deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, lässt sich daraus

schließen, dass bei diesen Konzentrationen der längere 90min-Verdau für das Erreichen von Einzelzellsuspensionen von Vorteil ist. Auch bei Losartan stimulierten Mäusen erwies sich bei einer Verdauung von 0,25% Collagenase A der 90min-Verdau vorteilhaft, da sich hierbei ein Ergebnis von 2,58 erzielen ließ (Abb. 3.5). Dieser Wert liegt zwar nur geringfügig höher als der Mittelwert von 2,45 des 45min-Verdaus, jedoch sollte hierbei die breite Streuung der Einzelwerte nach dem 90min-Verdau Beachtung finden, welcher wohl eine vorzeitige Entleerung der Reninspeichergranula bei Einzelproben zugrunde liegt. Unter diesem Aspekt ist darauf zu schließen, dass auch bei Losartan stimulierten Mäusen der 90min-Verdau geeigneter für den Fortschritt des Verdaus bis auf Einzelzellebene ist.

Die Verkürzung der Dauer des Verdaus scheint somit keine brauchbare Verbesserung bei Verwendung des Protokolls der JG-Zell-Präparation darzustellen.

4.2.4. Folgerungen anhand der Modifikationen

Das beste Ergebnis bei den durchgeführten Modifikationen des Standardprotokolls der JG-Zell-Präparation lieferte sowohl bei unbehandelten adulten, als auch bei 12 Tage alten, mit Losartan behandelten Mäusen ein 90-minütiger Verdau mit 0,25% Collagenase A. Dabei ergaben sich mittlere Kontrollwerte von 2,02 bei unbehandelten und 2,57 bei stimulierten Mäusen, wobei dies im Bezug auf das Standardprotokoll eine Verbesserung um den Faktor 15,5 bzw. 5,2 bedeutete. Die Aufreinigung der Reninzellen Losartan stimulierter Mäuse lässt sich demzufolge nicht in entsprechendem Maße zu den unbehandelten Mäusen verbessern. Dem liegt, wie bei den Schwierigkeiten des Standardprotokolls schon erwähnt, die Entnahmetechnik der Zellen zugrunde. Da sich aber unter Verwendung der JG-Zell-Präparation selbst mit den angedachten Veränderungen keine großen Fortschritte einstellten, schien es angebrachter, eine andere Strategie zur Isolierung reninbildender Zellen zu verfolgen.

4.3. Beadperfusion

Um eine weitreichendere Verbesserung beim Reinheitsgrad des Isolates zu erzielen, wurden einige molekularbiologische Verfahren ins Auge gefasst. Eine Verbesserung der Dichtegradientenauftrennung durch Zusatz von gefärbten Latexpartikeln, die in Form und Größe den Reninzellen entsprechen und so die entsprechende Phase markieren könnten, konnte aufgrund des Mangels an Wissen über die Zielzellen nicht näher verfolgt werden.

Ziemlich schnell rückten daraufhin magnetische Aufreinigungsverfahren in den Focus des Interesses.

Die wohl geeignetste Methode schien die magnetische Isolierung der Zellen über spezifische Oberflächenproteinstrukturen, anhand von Beads, gekoppelt mit den jeweiligen Antikörpern, zu sein. Aufgrund des Mangels an bekannten spezifischen Antigenstrukturen an der JG-Zell-Oberfläche konnte diese jedoch leider nicht in die Tat umgesetzt werden.

Auch die von Takemoto et al. im Jahr 2002 veröffentlichte Methode zur magnetischen Isolierung von Glomeruli über Vorperfusion von 4,5µm-Beads schien sehr dienlich für die Verfolgung des Ziels dieser Arbeit. Eingehende Überlegungen führten schließlich zu der Idee, anhand dieser Methode Gefäßfragmente der afferenten Nierenarteriolen zu isolieren. Die Verwendung größerer Beads mit 6 und 8µm Durchmesser sollte, durch deren Festsetzung in bestimmten Gefäßabschnitten, deren Magnetseparierung gewährleisten.

4.3.1. Vorüberlegungen zur Beadperfusion

Aufgrund der mit den Abwandlungen der JG-Zell-Präparation gewonnenen Erkenntnis, dass sich Trypsin zu aggressiv für einen angemessenen Verdau verhält, fand dieses Enzym auch bei den Versuchen mit Beadperfusion keine Anwendung. Da hier im Gegensatz zur Dichtegradientenauftrennung nicht ein Verdau bis auf Einzelzellebene erwünscht, sondern der Erhalt bestimmter Gewebsstrukturen sogar essenziell für die Durchführung der Methode war, wurde eine Verdauzeit von 30 min und ein Gehalt von 0,15% Collagenase A für die Verdaulösung gewählt.

Bereits erste Vorversuche mit Beadperfusion, die der Erprobung der Methode dienten, lieferten stets vielversprechend hohe Werte, und versprachen somit eine

bessere Aufreinigung, wenn man sie mit den JG-Zell-Präparations-Versuchen verglich. Eine breite Streuung der Einzelwerte bei nur wenigen identischen Ansätzen deutete darauf hin, dass zum Erhalt aussagekräftiger Mittelwerte die Versuchszahl bei der Beadmethode deutlich angehoben werden musste.

Die Größe der Beads wurde auf 6 und 8µm festgelegt, da dies die kommerziell erhältlichen Größen sind, die sich in der Varianzbreite der Durchmesser der afferenten Nierenarteriolen von Mäusen bewegen. Auch eingehende Recherchen ließen keine größeren Beads als 8µm finden.

Die ersten Versuche mit Beadperfusion ergaben zwar wertvolle Hinweise auf eine bessere Aufreinigung der Reninzellen, aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse konnte jedoch keine treffende Aussage bezüglich der Eignung der verwendeten Beadgrößen getroffen werden. Die sich anschließenden Versuche zur Beadperfusion an adulten Mäusen wurden deshalb mit Beads von 4,5µm, 6µm und 8µm Durchmesser in entsprechender Anzahl durchgeführt.

4.3.2. Beadperfusion an unbehandelten Mäusen

Da sich bei der Erstellung des Renin-GAPDH-mRNA-Verhältnisses aus kompletten Nieren dreier unbehandelter adulter Wildtypen keine größeren Divergenzen ergaben, lieferte der errechnete Mittelwert mit 3,29 eine angemessene Bezugsgröße für die nachfolgenden Versuche ohne Zellkultur.

Bei den Versuchen mit unbehandelten adulten Mäusen lieferte die magnetische Isolierung nach Perfusion von 4,5µm-Beads den höchsten Mittelwert von 13,7. Die Perfusion mit 4,5µm-Beads stellt somit die beste Methode bei unbehandelten adulten Mäusen dar. Wie nach Takemoto et al. (2002) bekannt, werden mit den 4,5µm Beads zum Großteil Glomeruli isoliert, da diese in aller Regel die afferenten Arteriolen ungehindert passieren und sich so erst in den glomerulären Kapillarschlingen festsetzen (Abb. 4.2 + Abb. 4.3).

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen, gelangen bei der 4,5µm-Bead-Methode auch einige Glomeruli mit anhängenden Teilen der afferenten Arteriolen ins Isolat. In unmittelbarer Nähe zum Glomerulus scheint es eine Art „Sollbruchstelle“ zu geben, an der nach dem durchgeführten Verdau ein Großteil der afferenten und auch efferenten Arteriolen vom Glomerulus getrennt wird.

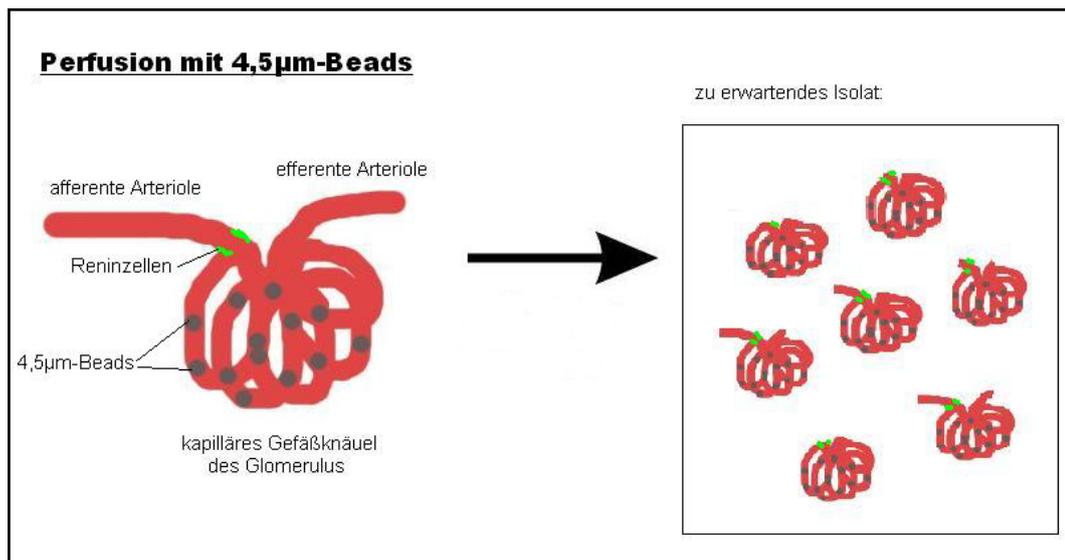


Abb. 4.2: Schema der 4,5µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelten adulten Maus. Das Isolat zeigt hier überwiegend Glomeruli mit zum Teil noch anhaftenden afferenten / efferenten Arteriolen.

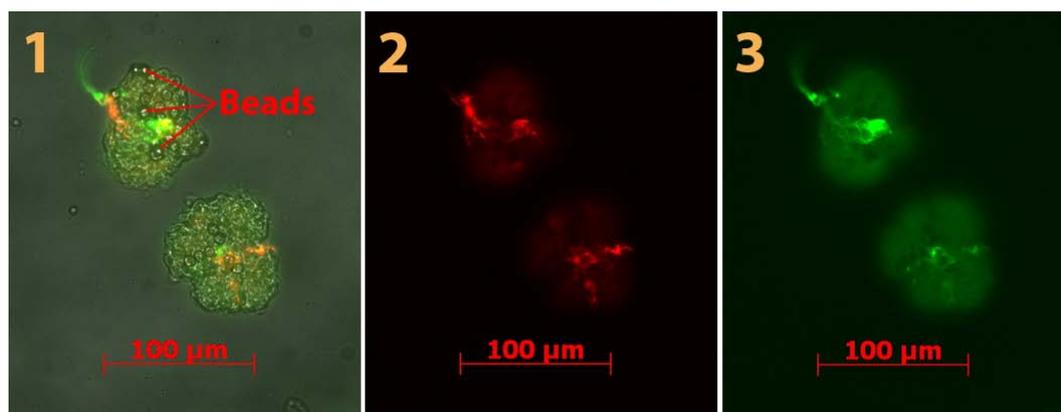


Abb. 4.3 : Immunhistochemie mit anti-Glattmuskelaktin (rot) und anti-Renin Antikörpern (grün) bei zwei mit 4,5µm-Beads isolierten Glomeruli einer unbehandelten adulten Maus.

1: Mischbild aus Durchlicht und Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün).
2: Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin. 3: Immunfluoreszenz von Renin.

Da die reninbildenden Zellen bei unbehandelten adulten Mäusen aufgrund ihrer juxtaglomerulären Lage eng mit dem Glomerulus assoziiert sind, wird auch mit derjenigen Methode der höchste Gehalt an Renin-mRNA vermessen, welche am meisten Glomeruli zu isolieren vermag. Da die größeren Beads mit zunehmendem Durchmesser auch immer kleinere Werte lieferten, lässt sich daraus schließen, dass mit zunehmender Beadgröße immer weniger Beads bis in die Glomeruli gelangen konnten und somit auch stets weniger Glomeruli mit anhaftenden Reninzellen isoliert wurden. Auf der anderen Seite spricht dies aber auch dafür,

dass sich die 6 und 8 μm Beads in immer größerem Maße in den präglomerulären Gefäßabschnitten festsetzen und somit Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen zu isolieren vermochten (Abb. 4.4 - 4.7).

Abbildung 4.4 veranschaulicht, wie bei der Perfusion von 6 μm -Beads vereinzelt einige Beads auch bis in die Kapillarschlingen der Glomeruli gelangen. Dies führt dazu, dass neben den Gefäßfragmenten der afferenten Arteriolen auch eine gewisse Anzahl an Glomeruli vom Magneten erfasst wird und so im Isolat zu finden ist.

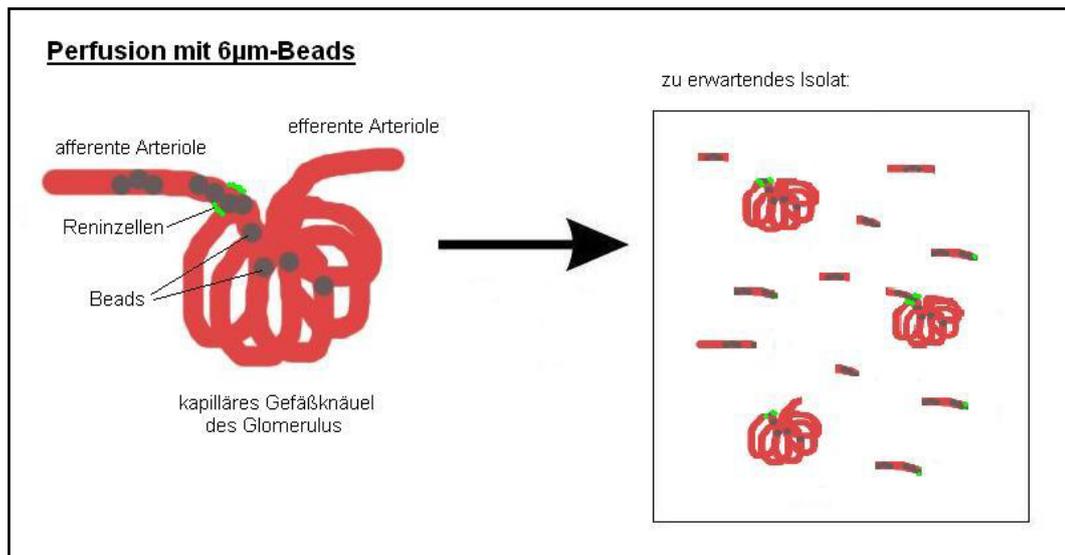


Abb. 4.4: Schema der 6 μm -Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelten adulten Maus. Das Isolat zeigt hier neben isolierten Gefäßfragmenten der afferenten Arteriolen auch einige Glomeruli.

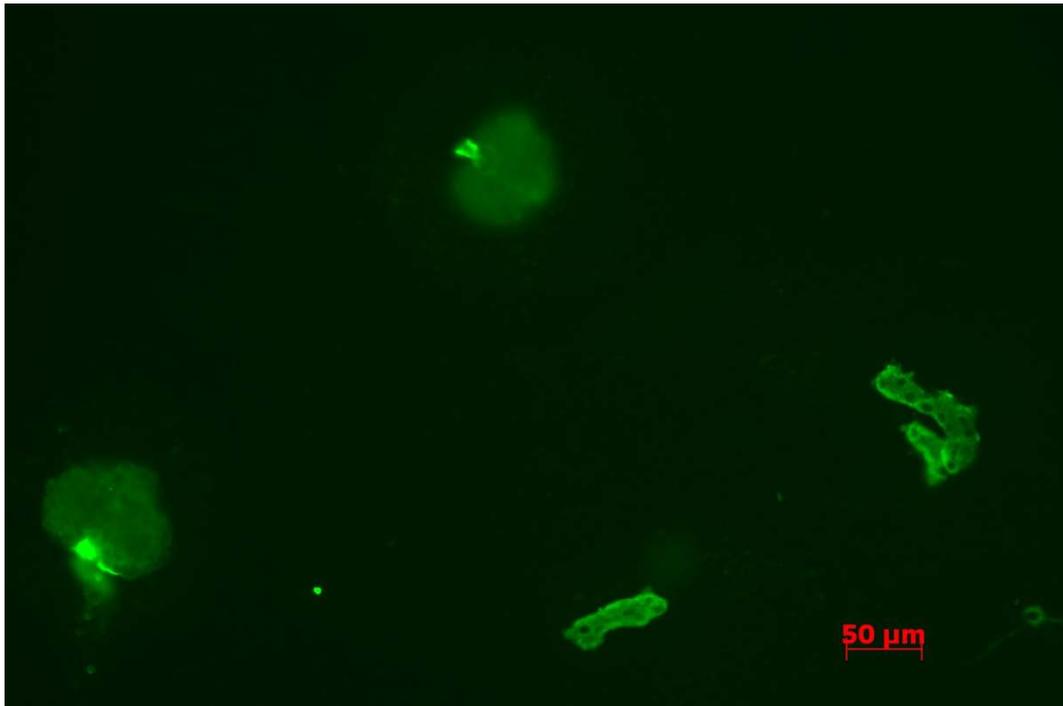


Abb. 4.5: Immunhistochemie mit anti-Renin Antikörpern (grün) bei zwei Glomeruli und zwei Gefäßfragmenten afferenter Arteriolen einer unbehandelten adulten Maus, welche mit 6µm-Beads isoliert wurden.

Abbildung 4.6 gibt das Festsetzen der größeren 8µm-Beads in präglomerulären Anteilen der afferenten Arteriole wieder. Da bei dieser Methode nur in Ausnahmefällen Beads bis in die Kapillaren der Glomeruli gelangen, werden hier zum Großteil nur Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen isoliert (Abb 4.7). Aufgrund der genannten „Sollbruchstelle“ werden bei dieser Methode nur wenige reninbildende Zellen isoliert, was auch den niedrigsten Mittelwert bei den durchgeführten Bead-Versuchen an unbehandelten Tieren erklärt (Abb. 3.13).

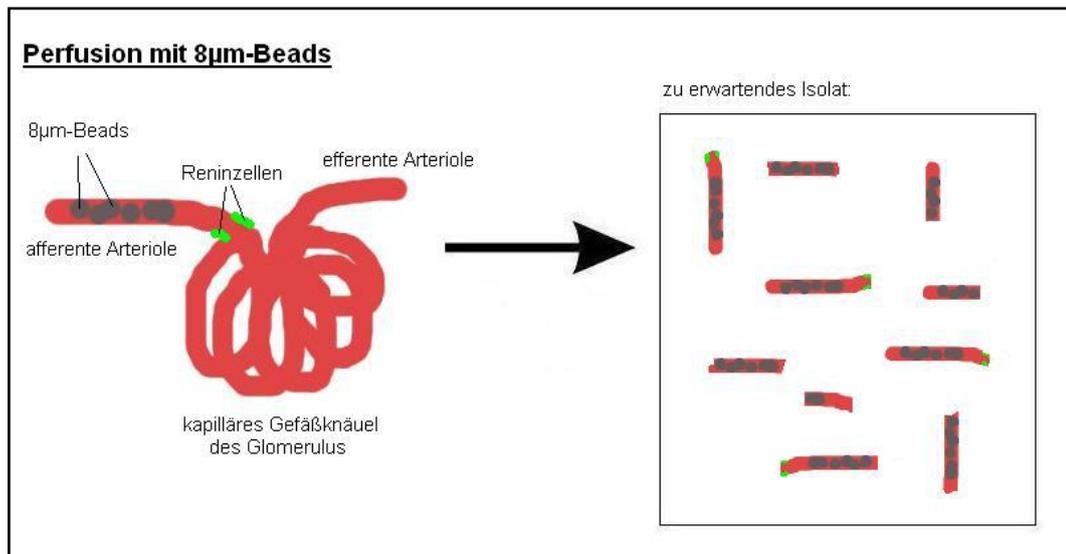


Abb. 4.6: Schema der 8µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelten adulten Maus. Das Isolat besteht hier nur aus Gefäßfragmenten. Nur wenige der isolierten Fragmente besitzen glomerulusnahe Gefäßanteile mit Reninzellen.

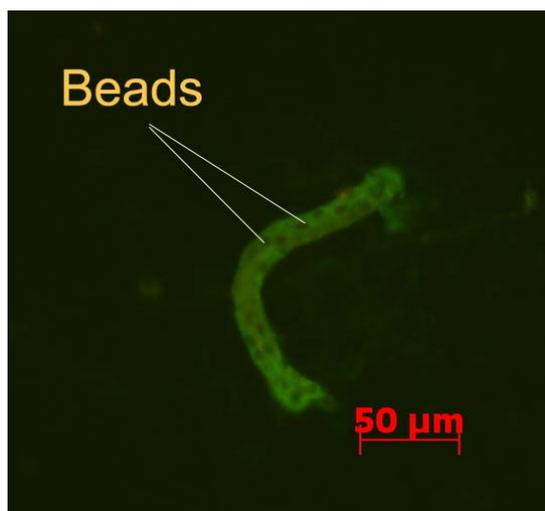


Abb. 4.7: Immunhistochemie mit anti-Renin Antikörpern (grün) bei einem mit 8µm-Beads isolierten Gefäßfragment einer afferenten Arteriole einer unbehandelten adulten Maus. Mischbild aus Durchlicht und Immunfluoreszenz von Renin (grün). Der Großteil des Gefäßfragments zeigt Eigenfluoreszenz. Nur im unteren Gefäßabschnitt zeigen wenige Reninzellen echte Fluoreszenz. Bar = 50µm.

4.3.3. Beadperfusion an Low Salt und Enalapril stimulierten Mäusen

Aufgrund der vielversprechenden Erfolgsaussichten einer Isolierung von Gefäßfragmenten mit einer Vielzahl von rekrutierten Reninzellen fiel der Entschluss, den Versuchen mit unbehandelten Mäusen, Versuche mit stimulierten Mäusen anzuschließen, welche über drei Wochen eine Niedrigsalzdiät und Enalapril erhalten hatten. Wie in der Einleitung erklärt, exprimieren derart stimulierte Mäuse größere Mengen an Renin, wobei die reninbildenden Zellen auch weiter präglomerulär an den afferenten Arteriolen rekrutiert werden (Abb. 1.8). Diese Tatsache ließ darauf schließen, dass durch die Isolierung von Gefäßfragmenten über größere Beads, bei den so stimulierten Tieren, auch mehr reninbildende Zellen isoliert werden können.

Betrachtet man zunächst die Bezugsgröße der kompletten Nieren, so wird anhand der Erhöhung des Mittelwertes von 3,29 auf 41,5 ersichtlich, dass die stimulierten Mäuse um den Faktor 12,6 mehr Renin exprimieren (Abb. 3.15). Nur anhand der 4,5µm-Bead-Methode ließ sich der Wert der kompletten LS-Ena-Nieren übertreffen. Mit 6 und 8 µm-Beads gelang dies nicht. Dies lässt sich damit erklären, dass die reninbildenden Zellen bei LS-Ena-Mäusen zum Großteil in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus exprimiert werden. Wie schon bei den unbehandelten Tieren eignet sich auch in diesem Fall eine Isolierung der Glomeruli anhand der 4,5µm-Bead-Methode am besten zur Erfassung des Großteils der Reninzellen (Abb. 4.8).

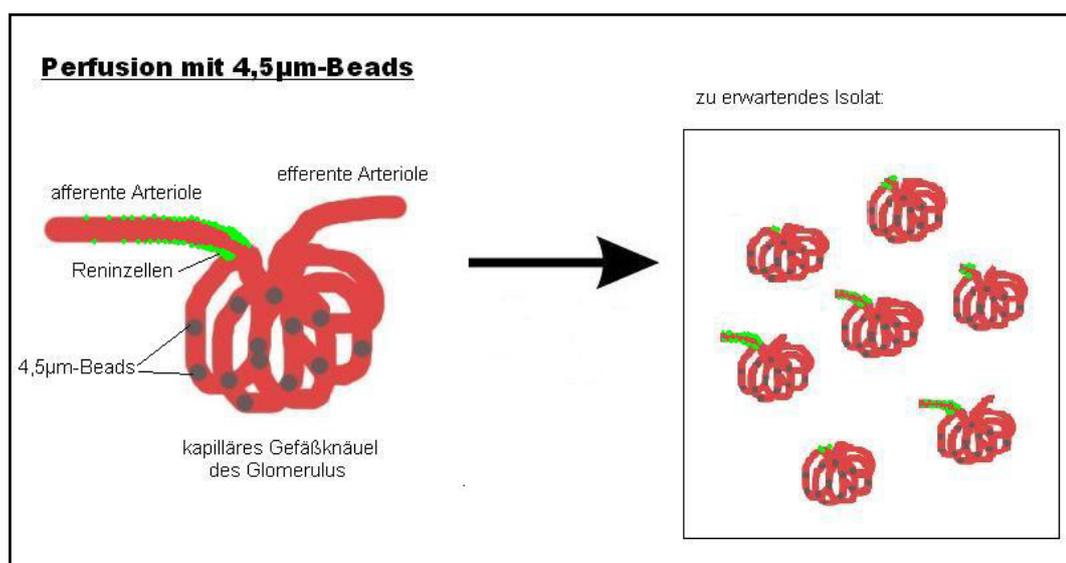


Abb. 4.8: Schema der 4,5µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten adulten Maus. Das Isolat zeigt hier überwiegend Glomeruli mit zum Teil noch anhaftenden afferenten / efferenten Arteriolen.

Eine gesteigerte Ausbeute an Reninzellen bei LS-Ena-Mäusen mit 6 und 8 μ m-Beads an den dabei isolierten Gefäßfragmenten verdeutlicht sich anhand der erheblichen Steigerung, die sie im Vergleich zu den ganzen Nieren unbehandelter Tiere an den Tag legten (Abb. 3.15 + 3.16).

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, besitzen mit der 6 μ m-Bead-Methode isolierte Gefäßfragmente der LS-Ena-Mäuse mehr reninbildende Zellen als diejenigen der unbehandelten Mäuse in Abbildung 4.4.

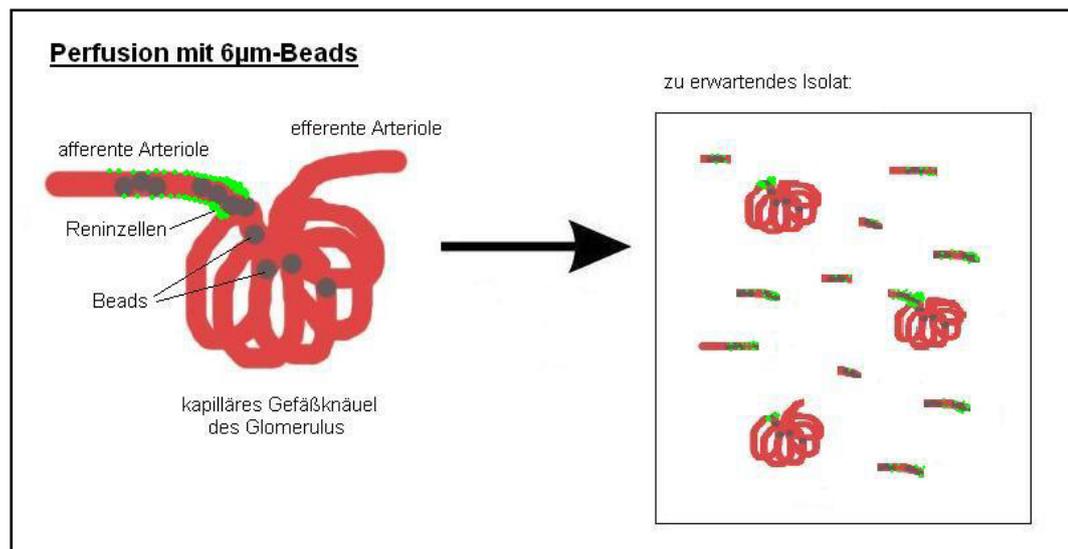


Abb. 4.9: Schema der 6 μ m-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Niedrigsalzdiät und Enalapril behandelten adulten Maus. Neben einigen Glomeruli zeigt das Isolat viele Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen.

Auch in direktem Vergleich zu den Versuchen mit unbehandelten Mäusen, ergab sich bei den LS-Ena-Mäusen bei jeder der drei verwendeten Beadgrößen eine Verbesserung. Unter Verwendung der 4,5 μ m-Beads kam es zu einer 24fachen Steigerung des Mittelwertes von 13,7 auf 333, bei den 6 μ m-Beads zu einer dreifachen Steigerung von 8,2 auf 24 und bei den 8 μ m-Beads zu einer fünffachen Steigerung von 3,64 auf 18,7 (Abb. 3.11- 3.16).

Das Erzielen einer höheren Steigerungsrate bei den 8 μ m-Beads, als bei 6 μ m-Beads, hängt damit zusammen, dass unbehandelte Tiere in den von 8 μ m-Beads isolierten Gefäßfragmenten viel weniger Reninzellen exprimieren (Abb. 4.6 + 4.7) als die mit Niedrigsalz und Enalapril stimulierten Mäuse (Abb. 4.10 + 4.11).

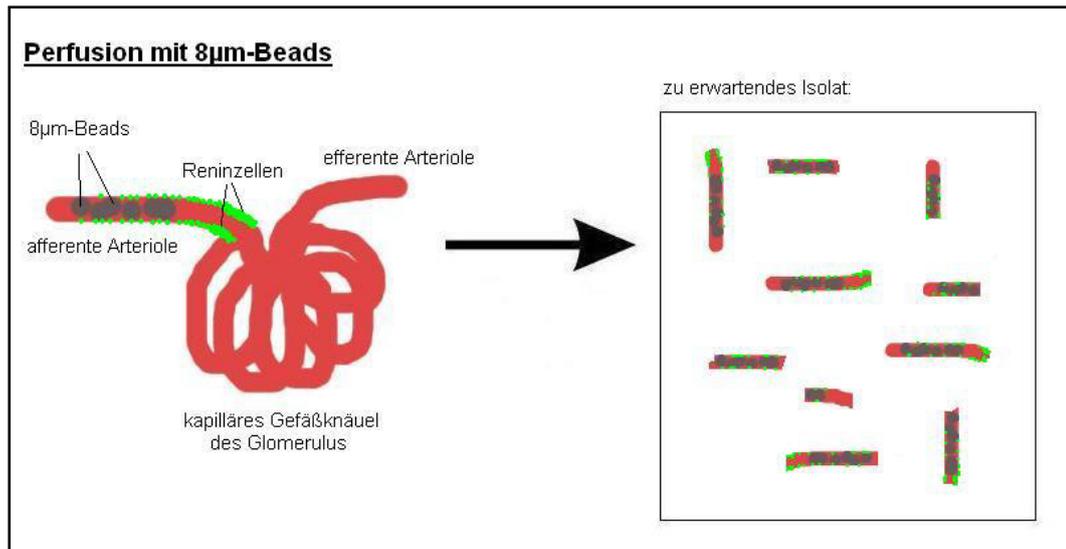


Abb. 4.10: Schema der 8 μ m-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten adulten Maus. Im Isolat befinden sich überwiegend nur Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen.

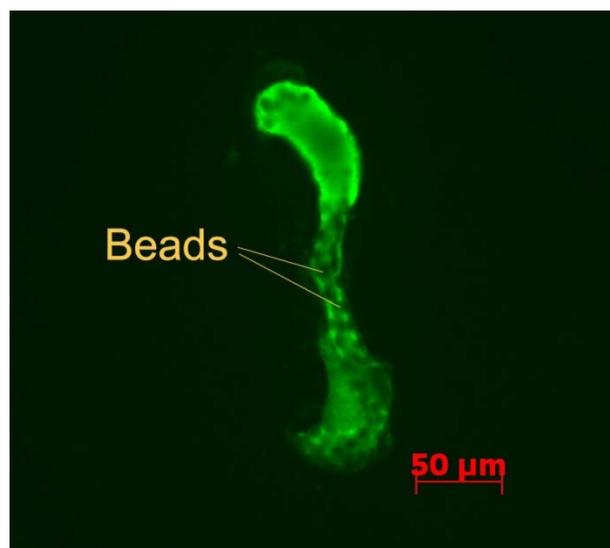


Abb. 4.11: Immunhistochemie mit anti-Renin Antikörpern (grün) bei einem mit 8 μ m-Beads isolierten Gefäßfragment einer afferenten Arteriole einer drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten adulten Maus. Bar=50 μ m.

Dem hingegen wurden bei den 6 μ m-Beads, aufgrund biologischer Varianz der Gefäßdurchmesser, neben glomerulusnahen Gefäßfragmenten auch einige Glomeruli mit anhängenden Reninzellen isoliert (Abb. 4.9). Zudem beinhalten die mit der 6 μ m-Bead-Methode isolierten Gefäßfragmente auch bei unbehandelten Tieren mehr Renin, da kleinere Beads sich näher am Glomerulus in den afferenten Arteriolen festsetzen, wo mehr Reninzellen in der Gefäßwand zu finden sind (Johns et al., 1990; Machura et al., 2009).

Zusammenfassend kann man folgern, dass sowohl bei unbehandelten, als auch bei drei Wochen mit Nidrigsalz und Enalapril stimulierten adulten Mäusen, die Methode der Perfusion von 4,5 μ m-Beads mit sich anschließender magnetischer Isolation den besten Weg darstellt, um Reninzellen in großer Menge und möglichst hohem Reinheitsgrad zu isolieren.

4.3.4. Schwierigkeiten bei der Beadperfusion adulter Mäuse

Im Zusammenhang mit den Ergebnisschwankungen, die während der gesamten Versuche mit Beadperfusion auftraten, sollten nicht nur gefäßspezifische Unterschiede bedacht werden, die einer gewissen biologischen Varianz unterliegen. Vielmehr sollten auch wechselhafte Bedingungen bei der Durchführung der Perfusion Beachtung finden, welche Einfluss auf das Ergebnis nehmen können. Mit am wichtigsten sind wohl die Vitalfunktionen des unter Narkose stehenden Versuchstieres. Stirbt das Tier noch vor Beginn der Perfusion, wird das Ergebnis durch die einsetzende Koagulation in nicht unerheblichem Maße verfälscht. Wichtige Komplikationen stellen hierbei eine Überdosierung der Narkose oder ein Verbluten aufgrund verletzter Gefäße dar. Weitere wichtige Faktoren stellen das Ausbinden eines Großteils des Körperkreislaufs und die richtige Befestigung der Perfusionskanüle in der Aorta dar, wie dies im Methodenteil beschrieben wird. Des Weiteren könnte ein zu hoch eingestellter Perfusionsfluss die größeren 6 bzw. 8 μ m-Beads von der angedachten Stelle in der afferenten Arteriole weiter bis ins Glomerulus spülen und so in ähnlichen Ergebnissen wie bei der 4,5 μ m-Beadperfusion resultieren.

Auffällig ist, dass insbesondere die Versuche mit 8 μ m-Beads einer recht geringen Streuung unterliegen. Dies hängt damit zusammen, dass mit dieser Methode ausschließlich Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen isoliert werden, und nicht wie bei den anderen Verfahren Glomeruli mit einer variierenden Anzahl von anhängenden Anteilen der afferenten und efferenten Arteriolen.

4.3.5. Beadperfusion an Losartan stimulierten Mäusen

Bei den Ergebnissen der mit Losartan behandelten juvenilen Tiere zeigt schon die ermittelte Bezugsgröße des Renin-GAPDH-mRNA-Verhältnisses kompletter Nieren eine extrem gesteigerte Reninexpression. Mit einem Mittelwert von 210

zeichnete sich hier ein um den Faktor 64 höherer Reningehalt gegenüber unbehandelten Mäusen ab. Während ein Versuch mit $6\mu\text{m}$ -Beads diesen mit einem Wert von 256 nur leicht zu steigern vermochte, erbrachte ein weiterer Ansatz mit $6\mu\text{m}$ -Beads einen weit höheren Wert von 765. Eine darüber hinaus, weitaus bessere Aufreinigung mit einem Wert von 2677 ließ sich mit der $8\mu\text{m}$ -Bead-Methode erzielen (Abb. 3.17). Dieser erhöhte Reinheitsgrad lässt sich wohl darauf begründen, dass $8\mu\text{m}$ -Beads zum Großteil nur Gefäßfragmente isolieren, welche bei den juvenilen Losartan behandelten Mäusen einen gesteigerten Anteil an reninbildenden Zellen haben (Abb. 4.12).

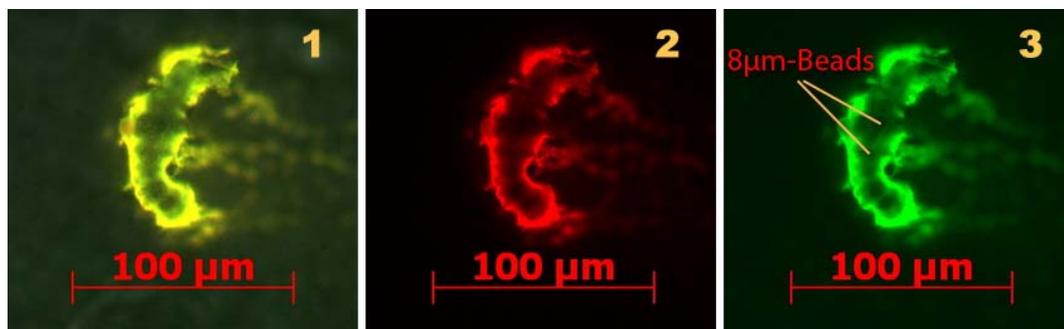


Abb. 4.12: Immunhistochemie mit anti-Glattmuskelaktin (rot) und anti-Renin Antikörpern (grün) bei einem mit $8\mu\text{m}$ -Beads isoliertem Gefäßfragment einer afferenten Arteriole einer mit Losartan behandelten juvenilen Maus.

1: Mischbild aus Durchlicht und Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün).
2: Immunfluoreszenz von Glattmuskelaktin. 3: Immunfluoreszenz von Renin.

Kleinere $6\mu\text{m}$ -Beads dürften aufgrund ihrer Größe auch gelegentlich in den Glomerulus gelangen, und so zu einer gewissen Anzahl an Glomeruli im Isolat führen. Die so isolierten Glomeruli bringen eine nicht unbeachtliche Anzahl an Fremdzellen in das Isolat ein, was sich wiederum negativ auf das Renin-GAPDH-mRNA-Verhältnis ausübt. Die bei diesen Versuchen zusätzlich vermessenen Reningehalte der Restlösungen, aus denen das Isolat stammte, spiegeln hier genau das zu erwartende Bild wider: Mit ansteigendem Gehalt an Renin im Isolat, verringert sich in gleicher Weise der Reningehalt in der jeweiligen Restlösung (Abb. 3.17). Diese Verringerung zeichnet sich in viel geringerem Maße als die Steigerung des Reningehaltes im Isolat ab, da die Zellzahl in der Restlösung um ein Vielfaches höher ist als im Isolat. Obwohl sich bei den Versuchen mit juvenilen Losartan behandelten Mäusen die besten und vielversprechendsten Einzelergebnisse ergaben, konnten diese Versuche wegen den folgenden erheblichen Schwierigkeiten nicht in aussagekräftiger Anzahl durchgeführt

werden. Weitreichende Probleme stellte die verkürzte Lebensdauer der ab dem ersten Lebenstag mit Losartan behandelten Mäuse, von etwa 14 Tagen, dar. Dies war auch dann der Fall, wenn die Injektionen von Losartan schon nach wenigen Tagen wieder eingestellt wurden. Schon im Vorfeld des Ablebens machten sich bei den Tieren ein Gewichtsverlust und Vitalitätseinbußen bemerkbar, sodass sich eine Perfusion nach dem postpartalen Tag 12 sowohl aus Tierschutzgründen, als auch im Hinblick auf das Gelingen der Perfusion, ausschloss. Aufgrund der geringen Nierengrößen von Mäusen um den postpartalen Tag 12 mussten zum Erhalt einer adäquaten Menge an Isolat nach der Magnetaufreinigung die Nieren von zwei bis drei Mäusen zusammengenommen werden. Da derart junge Tiere nicht über die noch zu kleine Aorta abdominalis perfundiert werden können, musste hier der Zugang zum Kreislaufsystem über die linke Herzkammer gewählt werden. Die Perfusion über das linke Herz zeigte, neben einer schweren Durchführbarkeit, auch extrem variierende Ergebnisse im Hinblick auf den Fortschritt der Perfusion. Dies ließ sich rein anhand des makroskopischen Bildes schon ablesen. Vielfach zeigten sich die Nieren unzureichend perfundiert, was sich umso mehr bei Betrachtung der Schnittfläche offenbarte. Somit war auch ein Poolen von mehreren Nieren nicht von Vorteil. Ursächlich dieser Probleme konnte dieser Versuchsansatz nicht in entsprechendem Umfang zu den Vorversuchen durchgeführt werden.

4.4. Ausblick

Die 4,5µm-Bead-Methode stellt zwar bei unbehandelten adulten Mäusen die beste Methode zur Aufreinigung von Reninzellen dar, jedoch bringen die auf diese Weise isolierten Glomeruli eine nicht außer acht zu lassende Anzahl von unerwünschten Zellen mit ins Isolat (Abb. 4.13).

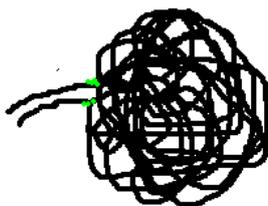


Abb. 4.13: Schema eines isolierten Glomerulus einer unbehandelten adulten Maus. Grün dargestellt sind die erwünschten Reninzellen. Schwarz dargestellt sind die mitisolierten unerwünschten Zellen (intraglomeruläre Mesangiumzellen, Podozyten, Gefäßzellen der Glomeruluskapillaren/ afferenten und efferenten Arteriolen).

Eine Isolation von Gefäßfragmenten mit einer Vielzahl rekrutierter Reninzellen in der Media wäre demnach sehr vielversprechend im Hinblick auf den Reinheitsgrad, da das Verhältnis von Zielzellen zu unerwünschten Zellen in diesem Fall um ein Vielfaches höher wäre. Auf der einen Seite gehen bei dieser Methode während der Isolation zwar die nah am Glomerulus gelegenen Reninzellen verloren, doch auch die große Zahl der in den Kapillarschlingen der Glomeruli enthaltenen Zellen gelangt hierbei nicht mit in das Isolat (Abb. 4.14).

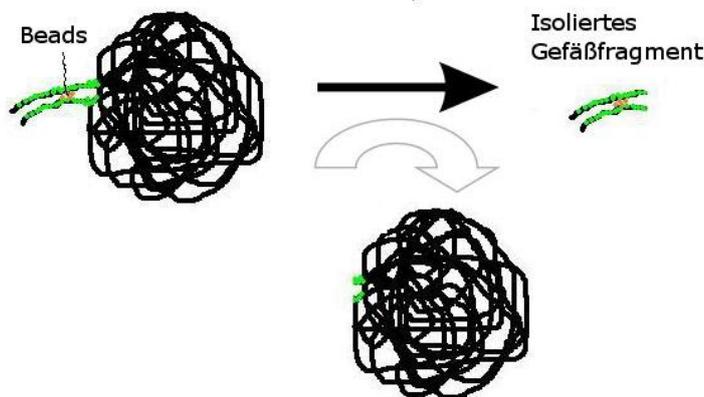


Abb. 4.14: Schema einer Isolierung eines Gefäßfragmentes einer afferenten Arteriole mit erhöhter Reninexpression (grün: erwünschte Reninzellen; schwarz: mitisolierte unerwünschte Zellen wie intraglomeruläre Mesangiumzellen, Podozyten, Gefäßzellen der Glomeruluskapillaren; bräunlich: Beads).

Eine derartige Isolierung von Gefäßfragmenten mit erhöhter Reninzellanzahl wäre etwa bei adulten AT_{1a} - bzw. Aldosynthese-Knockout-Mäusen denkbar, welche durch Deletion von Genen wichtiger Komponenten des RAAS eine sehr ausgeprägte Reninexpression entlang der afferenten Arteriolen zeigen. Dabei würden sich vor allem die größeren 6 und 8 μm -Beads anbieten, weil hier der zu erwartende Fremdzellgehalt durch isolierte Glomeruli viel geringer ausfällt als etwa bei kleineren 4,5 μm Beads.

Ein ganz anderes wichtiges Verfahren stellt die fluoreszenzbasierte Isolierung von Zellen bei der Durchflusszytometrie dar. Über die Einbringung eines Fluoreszenzlabels in die reninbildenden Zellen sollen diese anhand von Eigenfluoreszenz durch FAC-Sorting (=fluorescence activated cell sorting) isoliert werden. Dieses FAC-Sorting reninbildender Zellen der Niere auf der Basis transgener GFP-Expression wurde bislang von zwei amerikanischen Arbeitsgruppen beschrieben (Morris, 2008; Pentz et al., 2008) und sollte daher

prinzipiell auch funktionieren. Eine Zellsuspension ganzer Nieren einer AT_{1a}-Knockout-Maus, bei der zusätzlich das Gen für GFP (= green fluorescent protein) unter der Kontrolle des Reninpromotors stand, wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits einem FAC-Sorting zugeführt. Leider konnte das auf diese Weise generierte Fluoreszenzsignal der reninbildenden Zellen nicht in erhofftem Maße detektiert werden, um die Zielzellen eindeutig identifizieren und anschließend auch isolieren zu können. Grund dafür könnte zum einen die geringfügige Eigenfluoreszenz bestimmter Strukturen des Nierengewebes, wie etwa Tubuluszellen, sein, welche des Öfteren auch bei Anregung des GFP in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte. Zum anderen dürfte sich aber auch der hohe Gehalt an Fremdzellen als negativ erwiesen haben, da reninbildende Zellen nur einen geringen Anteil der Gesamtnierenzellpopulation darstellen. Eine Kombination aus vorangehender Beadperfusion mit Magnetisolierung und sich anschließendem FAC-Sorting könnte sich daher, durch Minimierung des Fremdzellgehalts, als durchaus vorteilhaft erweisen. Aus diesem Grund soll auch diese Strategie weiter verfolgt werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Isolierung von reninbildenden Zellen der Niere zu entwickeln. Entgegen der Limitationen früherer Verfahren sollten Reninzellen in hoher Anzahl und mit möglichst hohem Reinheitsgrad isoliert werden, um diese Zellen in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisieren zu können.

Zunächst wurde das 1986 von Kurtz et al. etablierte Verfahren der JG-Zell-Präparation herangezogen, welches sich in einen Verdau bis auf Einzelzellebene und anschließende Erstellung eines Percoll-Dichtegradienten gliedert. Durch Veränderung einiger wesentlicher Elemente des Protokolls wurde versucht, den Gewebeverdau und damit die JG-Zell-Aufreinigung zu optimieren. Die Elimination des zu aggressiven Enzyms Trypsin aus der Verdauung resultierte in einem merklich höheren Ertrag an reninbildenden Zellen. Eine darüber hinausgehende Vorperfusion mit Verdauung bzw. eine Verkürzung der Verdauzeit ermöglichten jedoch keine weitere Verbesserung der Standardmethode. Darüber hinaus veranschaulichte eine zusätzliche Durchführung der Versuche an Tieren mit einem durch Losartan-Verabreichung stimulierten RAAS sehr anschaulich, dass sich eine höhere Zahl von reninbildenden Zellen im Ausgangsgewebe auch in einem deutlich größeren Anteil dieser Zellen im Isolat widerspiegelt.

Aufgrund der nicht allzu weitreichenden Verbesserungen nach Modifikation der Standardmethode wurde daraufhin die Strategie der magnetischen Isolierung von Gefäßfragmenten der afferenten Nierenarteriolen nach Beadperfusion verfolgt. Dabei wurde auf ein von Takemoto et al. 2002 publiziertes Verfahren zur Isolierung von Glomeruli aufgebaut. Diese Methode sieht eine Perfusion mit 4,5µm-Magnetbeads vor, welche sich in den Kapillarschlingen der Glomeruli festsetzen und so deren magnetische Aufreinigung ermöglichen. Den derart isolierten Glomeruli hängen zum großen Teil auch Gefäßabschnitte der afferenten Arteriolen an. Da die reninbildenden Zellen an der Eintrittspforte zum Glomerulus in der Lamina Media der afferenten Arteriolen lokalisiert sind, stand die Isolierung dieser Gefäße im Focus der Aufreinigungsstrategie. Die Verwendung größerer Beads von 6 bzw. 8µm Durchmesser sollte deren Festsetzung in den afferenten Arteriolen und somit deren Isolierung bedingen. Bezogen auf die vorherrschende Renin-mRNA-Abundanz in Gesamtnieren unbehandelter Wildtypmäuse, ließ sich bei den drei verwendeten Beadgrößen mit den 4,5µm-

Beads der beste Reinheitsgrad erzielen. Diese Isolate zeigten im Vergleich zu Gesamtnieren eine vierfach höhere Renin-mRNA-Abundanz, was sich auf eine Anreicherung der reninbildenden Zellen im Isolat zurückführen ließ.

Um die Ausbeute von reninbildenden Zellen im Isolat noch weiter zu erhöhen, wurden in weiterführenden Versuchen Mäuse verwendet, welche für drei Wochen mit einer Niedrigsalzdiät in Kombination mit dem ACE-Hemmer Enalapril (LS-Ena) behandelt wurden. Durch Stimulation des RAAS werden bei diesen Tieren retrograd entlang der afferenten Arteriolen zusätzliche Zellen zur Reninsynthese rekrutiert. Da eine Isolierung von Gefäßfragmenten mit derart hoher Reninzell-Anzahl vorteilhaft schien, wurden diese stimulierten Tiere in entsprechender Weise mit den drei verschiedenen Beadgrößen perfundiert. Auch hierbei ließ sich mit den 4,5µm-Beads die beste Aufreinigung erzielen, wobei sich der Reinheitsgrad im Vergleich zu Gesamtnieren unbehandelter Mäuse um das hundertfache steigern ließ. Während sich bei den LS-Ena-Mäusen mit den größeren 6 bzw. 8µm-Beads keine weitere Anreicherung erzielen ließ, schien deren Perfusion bei Einzelversuchen mit Losartan behandelten Tieren durchaus von Vorteil zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit limitierte die auf etwa zwei Wochen verkürzte Lebensspanne Losartan behandelte Tiere jedoch eine Durchführung der Versuche in adäquater Anzahl. Eine Weiterführung der Arbeit mit Tieren, wie etwa Aldosteronsynthase-Knockout-Mäusen, die eine vergleichbar hohe Reninexpression zeigen, scheint daher vielversprechend.

6. Summary

The aim of this work was to develop a method for the isolation of renin-producing cells of the kidney. In opposition to the limitations of former procedures, renin-cells should be isolated in high number and with a purity-degree as high as possible in order to be able to characterize these cells more clearly in resuming investigations.

First the 1986 of Kurtz et al. established procedure of the JG-cell-preparation was consulted, which is grouped in a digestion up to single cell level and the following formation of a Percoll density gradient. By variation of some substantial elements of the protocol it was aimed to optimize tissue digestion and thus the purification of JG-cells. The elimination of the too aggressive enzyme trypsin from the digesting-solution resulted in a markedly higher yield of renin-producing cells. Beyond that, a preperfusion of digesting-solution and respectively a shortening of the digesting time, however, did not result in a further improvement of the standard method. Further on additional examinations on animals with a stimulated RAAS through Losartan application showed quite descriptive that a higher number of renin-producing cells in the initial tissue is also reflected by a clearly larger portion of these cells in the isolate.

Thereupon, due to the not too extensive improvements after modification of the standard method, the strategy of bead-perfusion followed by the magnetic isolation of vessel-fragments of the afferent kidney arterioles was pursued. The ongoing work based on the procedure for the isolation of Glomeruli published 2003 by Takemoto et al.. This method plans a perfusion with 4,5 μm magnetic beads, which settle in the capillary loops of the Glomeruli and enable their magnetic purification. Glomeruli isolated by this method are to a large extent attached to vessel sections of the afferent arterioles. Since the renin-producing cells are located in the lamina media of the afferent arterioles at the entrance to the glomerulus, the isolation of these vessels was in the focus of the purifying-strategy. The use of larger beads of 6 or 8 μm diameter should cause their settling in the afferent arterioles and thus their isolation. Related to the predominating Renin mRNA abundance in total kidneys of untreated mice, the 4,5 μm beads obtained the best degree of purity within the three different sizes of beads used. Those isolates showed a fourfold higher renin mRNA abundance compared to total kidneys. This effect could be attributed to an enrichment of the renin-producing cells in the isolate.

In order to further increase the yield of renin-producing cells in the isolate, mice, which were treated with a low-salt diet in combination with the ACE inhibitor Enalapril (LS-Ena) for three weeks, were used in resuming attempts. By stimulation of the RAAS additional cells are recruited for renin synthesis along the afferent arterioles of these animals in a

retrograde manner. Since an isolation of vessel fragments with such a high renin cell number seemed favorable, these stimulated animals were perfused in the appropriate way with the three different sizes of beads. Again, the best purification could be obtained with the 4,5 μ m-beads, at which the degree of purity was hundredfold increased compared to total kidneys of untreated mice. While no further enrichment could be gained with the LS-Ena-mice by using the larger 6 or 8 μ m-beads, their perfusion seemed to be quite beneficial throughout single attempts with Losartan treated animals. However, in the context of this work the shortened life-span of Losartan treated animals of approximately two weeks, however limited the carrying out of the attempts in adequate number. A continuation of the work with animals such as aldosteronsynthase knockout mice, which show a comparably high renin expression, seems advantageous.

7. Literaturverzeichnis

- Aukland K (1975): Intrarenal distribution of blood flow. Are reliable methods available for measurements in man? *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35: 481-486
- Blutke A, Block C, Kemter E, Wolf E, Herbach N, Wanke R (2005): Large scale isolation of glomeruli from murine kidneys: Comparison of different methods and solutions for methodological problems. *Proceedings of the 23rd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Naples, Italy*: 36 (ISBN 88-7893-004-0)
- Cantin M, Araujo-Nascimento MD, Benchimol S, Desormeaux Y (1977): Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am. J. Pathol.* 87: 581-602
- Celio MR, Groscurth P, Inagami T (1985): Ontogeny of renin immunoreactive cells in the human kidney. *Anat. Embryol.* 173: 149-55
- Churchill PC (1985): Second messengers in renin secretion. *Am. J. Physiol.* 249 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 18): F175-F184
- Churchill PC (1988): Cellular mechanisms of renin release. *Clin Exp Hypertens A* 10(6):1189-202
- Della Bruna R, Kurtz A, Corvol P, Pinet F (1993): Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. Short-term effects of cAMP on renin mRNA and secretion *Circ. Res.*;73: 639-648
- Della Bruna R, Kurtz A (1995): Juxtaglomerular Cells in Culture. *Exp. Nephrol* 3: 219-222
- Della Bruna R, Pinet F, Corvol P, Kurtz A (1991): Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 1: 98-110
- Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF (1986): Analysis by immunocyto-chemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7552-56
- Esther CR Jr, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE (1996): Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74: 953-965
- Fourman J, Moffat DB (1971): The blood vessels of the kidney. *Black Well Scientific Publications Oxford and Edinburgh*
- Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, Carey RM (1990): Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F660-F665

- Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, *et al.* (1988): Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol*, 254: F900-F906
- Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, *et al.* (1989): Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 257:850-58
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.* 70: 1067-1116
- Inokuchi S, Kimura K, Sugaya T, Inokuchi K, Murakami K, Sakai T (2001): Hyperplastic vascular smooth muscle cells of the intrarenal arteries in angiotensin II type 1a receptor null mutant mice. *Kidney Int.* 60: 722-731
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1995): Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3521-3525
- Ito S, Carretero OA (1991): Macula densa control of Glomerular hemodynamics. *Kidney Int.* 39 (Suppl.32): S83-S85
- Itskovitz J, Bruneval P, Soubrier F, Thaler I, Corvol P, Sealey JE (1992): Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1374-80
- Iwai N, Inagami T (1992): Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 298, 257-260
- Iwai N, Inagami T, Ohmichi N, Kinoshita M (1996): Renin is expressed in rat macrophage/ monocyte cells. *Hypertension* 27: 399-403
- Johns DW, Peach MJ, Gomez RA, Inagami T, Carey RM (1990): Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am. J. Physiol.* 259: F882-F887
- Jones CA, Petrovic N, Novak EK, Swank RT, Sigmund CD, Gross KW (1997): Biosynthesis of renin in mouse kidney tumor As4.1 cells. *Eur. J. Biochem.* 243: 181-190
- Jat PS, Sharp PA (1989): Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1672-1681
- Johns DW, Peach MJ, Gomez RA, Inagami T, Carey RM (1990): Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 259: F882-F887
- Keeton TK, Campbell WB (1981): The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 31: 81-227
- Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Haganan JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O (1995): Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2735-2739

- Kim S, Hosoi M, Hiruma M, Ikemoto F, Yamamoto K (1989):** Modification of glycosylation of renin in sodium-depleted and captopril-treated rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 256: 798-804
- König HE, Liebich H-G (2005):** Anatomie der Haussäugetiere. 3. Auflage: 389-399
- Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O (1995):** Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375: 146-148
- Kurtz A (1989):** Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* 113: 2-40
- Kurtz A (2011):** Renin Release: Sites, Mechanisms, and Control. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 9.1-9.23
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilshifter R, Taugner R, Bauer C (1986):** Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4769-4773
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal E, Bauer C (1986):** Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol Cell Physiol* 250: C563-C571
- Ludwig G, Ganten D, Murakami K, Fasching U, Hackenthal E (1987):** Relationship between renin mRNA, and renin secretion in adrenalectomized, salt depleted or converting enzyme inhibitor-treated rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 50: 223-229
- Matsusaka T, Nishimura H, Utsunomiya H, Kakuchi J, Niimura F, Inagami T, Fogo A, Ichikawa I (1996):** Chimeric mice carrying 'regional' targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene. Evidence against the role for local angiotensin in the in vivo feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J. Clin. Invest.* 98: 1867-1877
- Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL (1998):** Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett.* 422(3): 395-9
- Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R (1981):** Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat. Embryol.* 162: 173-81
- Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ, Henrich WL (1991):** Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 260: E521-E525
- Morris BJ (2008):** Fluorescence activated cell sorting of transiently transfected As4.1 cells shows renin enhancer directs on/off switching of renin promoter in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35: 367-371

- Müller MW, Todorov V, Kramer BK, Kurtz A (2002): Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* 444(4): 499-505
- Nagata M, Tanimoto K, Fukamizu A, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Watanabe T (1996): Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. *Lab. Invest.* 75: 745-753
- Nakamura A, Iwao H, Fukuki K, Kimura S, Tamaki T, Nakanishi S, *et al.* (1990): Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 258: E1-E6
- Naruse K, Murakoshi M, Osamura RY, Naruse M, Toma H, *et al.* (1985): Immunohistological evidence for renin in human endocrine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 172-77
- Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998): Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 274: F43-F50
- Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998): Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15496-15501
- Pentz ES, Lopez ML, Cordaillat M, Gomez RA (2008): Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294: H699-H707
- Peters JS, Clausmeyer S (2002): Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 1561-1568
- Pinet F, Corvol MT, Dench F, Bourguignon J, Feunteun J, Menard J, Corvol P (1985): Isolation of renin-producing human cells by transfection with three simian virus 40 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8503-8507
- Poisner AM, Poisner R (1987): The use of human chorionic membranes and isolated trophoblasts for studying renin secretion. In: *In vitro methods for studying secretion* (Poisner AM, Trifaro JM): 155-169
- Pratt RE, Flynn JA, Hobart PM, Paul M, Dzau VJ (1988): Different secretory pathways of renin secretion from mouse cells transfected with the human renin gene. *J. Biol. Chem.* 263: 3137-3141
- Rasch R, Jensen BL, Nyengaard JR, Skott O (1998): Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system. *Cell. Tissue. Res.* 292: 563-571
- Rayson BM (1992): Juxtaglomerular cells cultured on a reconstituted basement membrane. *Am. J. Physiol.* 262 (Cell Physiol. 31): C563-C568

- Richoux JP, Amsaguine S, Grignon G, Bouhnik J, Menard J, Corvol P (1987): Earliest renin containing cell differentiation during ontogenesis in the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 88: 41-46
- Rightsel WA, Okamura T, Inagami T, Pitcock JA, Takii Y, Brooks B, Brown B, Brown P, Muirhead EE (1982): Juxtaglomerular cells grown as a monolayer cell culture contain renin, angiotensin I-converting enzyme and angiotensins I and II/III. *Circ. Res.* 50: 822-829
- Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger GAJ, Kurtz A, Krämer BK (1995): Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 268: 39-45
- Ruyter JHC (1925): Über einen merkwürdigen Abschnitt der Vasa afferentia in der Mäuseniere. 2. *Zellforsch.* 2: 242-248
- Salomon FV, Geyer H, Gille U (2005): *Anatomie für die Tiermedizin. 1.Auflage:* 370-375
- Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C (2008): Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney International* 73: 43-51
- Schricker K, Hegyi I, Hamann M, Kaissling B, Kurtz A (1995): Tonic stimulation of renin gene expression by nitric oxide is counteracted by tonic inhibition through angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8006-8010
- Schunkert H, Ingelfinger JR, Jacob H, Jackson B, Bouyounes H, Dzau VJ (1992): Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expression by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 263: E863-E869
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA (2004): Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev. Cell.* 6: 719-728
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA (2001): Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 281: 345-56
- Sigmund CK, Okuyama J, Ingelfinger CA, Jones JJ, Mullins C, Kane U, Kim C, Wu L, Kenny Y, Rustum, Dzau VJ, Gross K (1990): Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing anin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.* 265: 19916-19922
- Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, et al. (2004): Mast cells: a unique source of renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13607-12
- Skott O, Briggs JP (1987): Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237: 1618-1620
- Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Iamizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukuta K, Fukamizu A, Murakami K (1995): Angiotensin II Type 1a receptor-deficient Mice with Hypotension and Hyperreninemia. *The J. Biol. Chem.* 270: 18719-18722

- Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C (2002): A New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice. *Am. J. Pathol.*, Vol. 161, No. 3: 799-805
- Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K (1994): Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 269: 31334-31337
- Taugner R, Bührle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R (1984): Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr. Nephrol.* 43: 76-101
- Timmermanns PBMWM, Wong PC, Chui AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD (1993): *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251
- Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I (1998): Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J. Clin. Invest.* 101: 755-760
- Wagner C, Kees F, Kramer BK, Kurtz A (1997): Role of sympathetic nerves for the stimulation of the renin system by angiotensin II receptor blockade. *J. Hypertens.* 15: 1463-1469

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Vaskularisation der Niere (nach König und Liebich, 2005).

Abb. 1.3: 3D-Rekonstruktion des Reninexpressionsmusters (grün) am pp1 a) im arteriellen Gefäßsystem (rot); b) in einer isolierten A. arcuata (rot) mit Glomeruli (gelb).

Abb. 1.4: Schematischer Aufbau des Nierenkörperchens nach Michał Komorniczak (2009).

Abb. 1.5: D-Rekonstruktion einer juxtaglomerulären Zelle nach Kurtz et al.; grün: Renin in vesikulären Strukturen, gelb: Zellkern. Bar=100nm. (Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

Abb. 1.6: Rekonstruktion ganzer Mausnieren während der Entwicklung mit den immunreaktiven Bereichen für α -Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Bar = 300 μ m für Embryonalstadien (a-h) und 500 μ m für postnatale Stadien (i-o). (a) Tag E13, (b) Tag E14, (c) Tag E15, (d) früher Tag E16, (e) später Tag E16, (f) früher Tag E17, (g) später Tag E17, (h) Tag E18, (i) postnataler Tag 1 (pp1), (k) pp3, (l) pp5, (m) pp7, (n) pp10 und (o) (adult) Tag 90 (Sauter et al., 2008).

Abb. 1.7: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immun-reaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten Wildtypmaus. Bar=100 μ m. (Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

Abb. 1.8: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immun-reaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten Wildtypmaus nach dreiwöchiger Stimulation mit einer Nidrigsalzdiät und Enalapril. Bar=100 μ m. (Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

Abb. 1.9: 3D-Rekonstruktion der Renin (grün) und der Glattmuskelaktin (rot) Immun-reaktivität in einem isolierten arcuaten Seitenast einer adulten AT_{1a}-Rezeptor-Knockout-Maus. Bar=100 μ m. (Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katharina Machura, Institut für Physiologie der Uni Regensburg).

Abb. 2.1: Bestückung einer 96-Wellplatte mit Zellen in Medium.

Abb. 2.2: Schema der Überführung der Zellen aus der 96-Well-Platte in ein RNeasy Mini Spin Column.

Abb. 2.3: Einfüllen der Zellen in RNeasy Mini Spin Columns.

Abb. 2.5: Schema der Perfusion über die Aorta abdominalis bei adulten Mäusen; grün: Ligatur um Vena cava caudalis und Aorta abdominalis unmittelbar kaudal der Arteria mesenterica cranialis.

Abb. 2.6: Perfusion einer adulten Maus über die Aorta abdominalis.

Abb. 2.7: Schema der Magnetseparation. **A:** Lösung mit Nierengewebsfragmenten nach Verdau und 100µm-Siebesechritt; **B:** 7min Magnetseparation, perfundierte Anteile werden durch den Magneten an den Rand des Gefäßes gezogen und in Position gehalten; **C:** magnetfernes Einführen der Pipette zur Entfernung der Lösung und nicht vom Magneten erfasster Nierengewebsanteile.

Abb. 2.8 : Isolierte Mausglomeruli nach Perfusion mit 4,5µm-Dynabeads (Takemoto et al. 2003).

Abb. 2.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines isolierten Glomerulus. GBM: Glomeruläre Basalmembran, CI: Kapillarlumen, Po: Podocyten-Fußfortsätze (Takemoto et al., 2002).

Abb. 3.1: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwerte dreier Ansätze exakt nach der JG-Zell-Präparation von Kurtz et al. (1986) an unbehandelten adulten Mäusen. Verdauung mit 0,15% Collagenase A (1,5mg/ml) und 0,25% Trypsin (2,1mg/ml). * = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.2: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Ansätze exakt nach der JG-Zell-Präparation von Kurtz et al. (1986) an 12 Tage alten, mit Losartan behandelten, Mäusen. Verdauung mit 0,15% Collagenase A (1,5mg/ml) und 0,25% Trypsin (2,1mg/ml). * = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.3: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer unbehandelten adulten Maus nach JG-Zell-Präparation mit 0,15% Collagenase A im Vergleich zur Kontrolle des Standardprotokolls.

Abb. 3.4: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer unbehandelten adulten Maus nach JG-Zell-Präparation mit 0,25% Collagenase A im Vergleich zur Kontrolle des Standardprotokolls.

Abb. 3.5: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert zweier Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan stimulierten Maus nach der JG-Zell-Präparation mit 0,25% Collagenase A in der Verdauung. Vergleich zur Kontrolle entsprechender Tiere nach dem Standardprotokoll.

Abb. 3.6: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Versuchsansatz nach der JG-Zell-Präparation mit vorangehender Perfusion von Verdauung bei einer adulten unbehandelten Maus (grün). Die Verdauung enthält 0,15% Collagenase A. Aufgeführte Vergleichswerte: entsprechender Versuch ohne Vorperfusion (hellblau) und Standardprotokoll bei unbehandelten adulten Mäusen (rot).

Abb. 3.7: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,05% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (gelb). Zum

Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

Abb. 3.8: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,15% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (gelb). Zum Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

Abb. 3.9: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Versuch mit 45min Verdau in 0,25% Collagenase A, bei zwei Nieren einer adulten unbehandelten Maus (=WT) (lila) und zwei Nieren einer 12 Tage alten mit Losartan behandelten Maus (pp12 Los) (gelb). Zum Vergleich aufgeführt sind Werte nach dem Standardprotokoll (Std.) bei entsprechend unbehandelten adulten (rot) bzw. behandelten 12 Tage alten Mäusen (grün).

Abb. 3.10: Immunhistochemie mit anti- α -Aktin (rot) und anti-Renin (grün) bei einem mit 4,5 μ m-Beads isolierten Glomerulus mit anhängender afferenter Arteriole einer unbehandelten adulten Maus. 1: Mischbild aus Durchlicht und Immunfluoreszenz von α -Aktin (rot) und Renin (grün). 2: Immunfluoreszenz von α -Aktin. 3: Immunfluoreszenz von Renin.

Abb. 3.11: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 4,5 μ m-Beads und Magnetisolierung bei sechs adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.12: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 6 μ m-Beads und Magnetisolierung bei fünf adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. n.s. = nicht signifikant mit $p = 0,059$.

Abb. 3.13: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 8 μ m-Beads und Magnetisolierung bei fünf adulten unbehandelten Wildtypmäusen (WT) im Vergleich zu kompletten Nieren dreier entsprechender Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.14: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 4,5 μ m-Beads und Magnetisolierung bei fünf adulten, drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelte und unbehandelte Tiere. n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Abb. 3.15: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 6 μ m-Beads und Magnetisolierung bei fünf adulten, drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelte und unbehandelte Tiere. * = signifikant $p < 0,05$. n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Abb. 3.16: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA. Mittelwert nach Perfusion von 8µm-Beads und Magnetisolierung bei fünf adulten, drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelten (LS Ena), Mäusen, im Vergleich zu den Referenzwerten von kompletten Nieren entsprechend mit LS Ena behandelte und unbehandelte Tiere. * = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.17: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA nach Perfusion von 6µm- bzw. 8µm-Beads und Magnetisolierung bei drei 12 Tage alten, mit Losartan behandelten, Mäusen. Auf den jeweiligen Wert folgt eine Auswertung des restlichen Nierengewebes nach der Magnetisolierung (Rest). Im Vergleich dazu sind Mittelwerte dreier kompletter Nieren unbehandelte adulte Mäuse (WT unbeh.) und dreier kompletter Nieren von Losartan behandelten Mäusen im Alter von 12 Tagen (pp12 Los) aufgeführt.

Abb. 3.18: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA nach Perfusion von 6µm-Beads, Magnetisolierung und 44h Zellkultur bei drei adulten unbehandelten Mäusen.* = signifikant $p < 0,05$.

Abb. 3.19: Verhältnis Renin-mRNA/GAPDH-mRNA nach Perfusion von 8µm-Beads, Magnetisolierung und 44h Zellkultur bei drei adulten unbehandelten Mäusen. * = signifikant $p < 0,05$. n.s. = nicht signifikant $p > 0,05$.

Abb. 4.1: Schichtung des Percollgradienten nach Zentrifugation im Sorvallbecher bei der Durchführung der JG-Zell-Präparation nach Kurtz et al..

Abb. 4.2: Schema der 6µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelte adulte Maus. Das Isolat zeigt hier überwiegend Glomeruli mit zum Teil noch anhaftenden afferenten / efferenten Arteriolen.

Abb. 4.3: Schema der 6µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelte adulte Maus. Das Isolat zeigt hier neben isolierten Gefäßfragmenten der afferenten Arteriolen auch einige Glomeruli.

Abb. 4.4: Schema der 8µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer unbehandelte adulte Maus. Das Isolat besteht hier nur aus Gefäßfragmenten. Nur wenige der isolierten Fragmente besitzen glomerulusnahe Gefäßanteile mit Reninzellen.

Abb. 4.5: Schema der 4,5µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelte adulte Maus. Das Isolat zeigt hier überwiegend Glomeruli mit zum Teil noch anhaftenden afferenten / efferenten Arteriolen.

Abb. 4.6: Schema der 6µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelte adulte Maus. Neben einigen Glomeruli zeigt das Isolat viele Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen.

Abb. 4.7: Schema der 8µm-Beadperfusion eines Glomerulus einer drei Wochen mit Nidrigsalzdiät und Enalapril behandelte adulte Maus. Im Isolat befinden sich überwiegend nur Gefäßfragmente der afferenten Arteriolen.

Abb. 4.8: Schema eines isolierten Glomerulus einer unbehandelten adulten Maus. Grün dargestellt sind die erwünschten Reninzellen. Schwarz dargestellt sind die mitisolierten unerwünschten Zellen (intraglomeruläre Mesangiumzellen, Podozyten, Gefäßzellen der Glomeruluskapillaren).

Abb. 4.9: : Schema einer Isolierung eines Gefäßfragmentes einer afferenten Arteriole mit erhöhter Reninexpression (grün: erwünschte Reninzellen; schwarz: mitisolierte unerwünschte Zellen wie intraglomeruläre Mesangiumzellen, Podozyten, Gefäßzellen der Glomeruluskapillaren; bräunlich: Beads).

8.2. Abkürzungsverzeichnis

Chemische und biologische Größen und Einheiten	
bp	Basenpaare
I.E.	internationale Einheit
M	molar
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
U	enzymatische Einheit (Unit)

Physikalische Größen und Einheiten	
°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (gravity)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde(n)
V	Volumen

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten	
k	kilo (1×10^3)
m	milli (1×10^{-3})
μ	micro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})
p	pico (1×10^{-12})

Sonstige	
3D	dreidimensional
%	Prozent
α SMA	α smooth muscle actin
A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy desoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy2	Carbocyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)

EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- dehydrogenase
H ₂ O bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Pferdeserum (horse serum)
Ig	Immunglobulin
i.p.	intra peritoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JGE-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LS-Ena-Maus	3 Wochen mit Lowsalt und Enalapril behandelte Maus
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pp	postpartal

pp12 Los Maus	12 Tage alte mit Losartan behandelte Maus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)amino-methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
unbeh.	unbehandelt
üN	über Nacht
V.	Vena(e)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

8.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner Arbeit in Rat und Tat unterstützt haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Armin Kurtz für die Ermöglichung meiner Arbeit an seinem Lehrstuhl und die Vergabe dieses interessanten Themas. Durch sein ständiges Feedback trug er wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Zudem möchte ich Herrn Professor Fred Sinowatz für die Betreuung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München herzlich danken.

Danken möchte ich Katharina Machura für die fachliche Betreuung dieser Arbeit und für die Einweisung und ständige Unterstützung bei molekularbiologischen und histologischen Verfahren. Danke für die Bemühungen zur Bereitstellung geeigneter Versuchstiere und auch für die zur Verfügung gestellten 3D-Rekonstruktionen. Danke auch für das Korrekturlesen dieses Manuskriptes.

Großen Dank möchte ich auch an Björn Neubauer richten, der mich mit großem Wissen in fachlichen und technischen Belangen nahezu täglich tatkräftig unterstützte. Vielen Dank für die Einweisung an der Perfuse und die vielen hilfreichen Tipps im Umgang mit verschiedensten Gerätschaften und Softwareprogrammen. Einen besseren „Hausmeister“ könnte sich dieser Lehrstuhl gar nicht wünschen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Michael Desch für die Einarbeitung in die Methode der JG-Zell-Präparation und die Weitergabe seiner Erfahrungen.

Mein Dank gilt ferner Birgül Kurt für die Einweisung bei der magnetischen Separation von Glomeruli und das Teilen der dafür benötigten Materialien. Vielen Dank auch für das ständige Interesse und die vielen hilfreichen Tipps zur praktischen Durchführung molekularbiologischer Methoden. Danke Dir auch für das stetige Korrekturlesen.

Vielen Dank auch an Melanie Gerl, die mich des Öfteren beim Perfundieren unterstützte und mir stets mit Anregungen und Tipps zur Seite stand. Danke Dir auch für Dein organisatorisches Talent, mit dem Du viele schöne Zusammenkünfte auch außerhalb der Arbeitszeit ermöglicht hast.

Herzlichen Dank auch an Dominik Steppan für die Einführung bei der RNA-Isolierung und Reverser Transkription. Danke Dir auch für die Hilfe beim Einstellen des Mikroskopes und die Tipps bei der Anwendung.

Weiterhin möchte ich mich bei Anna M'Bangui für die freundliche Unterstützung und Anleitung im Histolabor bedanken.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für das freundliche Arbeitsklima und die angenehme Atmosphäre bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, für die Ermöglichung meines Studiums und darüber hinaus auch der Anfertigung dieser Arbeit.