

***In vivo* Regulation
der Reninsekretion und Genexpression
durch den Protease-aktivierten Rezeptor 2**

von Lena Ruth Thurner

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität
München

***In vivo* Regulation**
der Reninsekretion und Genexpression
durch den Protease-aktivierten Rezeptor 2

von Lena Ruth Thurner
aus Rückersdorf
München, 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg
(Mentor: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Höcherl)

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhardt K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Die Niere	2
1.1.	Aufgaben der Niere	2
1.2.	Struktur der Niere	2
1.3.	Das Malpighi-Körperchen	2
1.4.	Die Juxtaglomeruläre Zelle	3
2.	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	4
2.1.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	4
2.2.	Renin-Synthese und Sekretion.....	5
2.3.	Regulatorische Faktoren der Reninsynthese und –sekretion.....	6
2.3.1.	Angiotensin II	6
2.3.2.	Blutdruck	6
2.3.3.	Sympathisches Nervensystem	7
2.3.4.	Salzaufnahme.....	7
2.3.5.	Weitere regulierende Faktoren	8
2.4.	Zelluläre Regulation der Reninsynthese und –sekretion.....	9
3.	Protease-aktivierte Rezeptoren	10
3.1.	Serinproteasen.....	10
3.2.	Protease-aktivierte Rezeptoren	11
3.3.	Aufgaben der Protease-aktivierten Rezeptoren	13
3.3.1.	Blutgerinnung	13
3.3.2.	Kardiorenale Funktion.....	14
III.	ZIELSETZUNG.....	17
IV.	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN.....	18
1.	Versuchstiere.....	18
1.1.	Generierung und Phänotyp der PAR2-knockout-Mäuse.....	18

1.2.	Zucht und Haltung	18
1.3.	Genotypisierung.....	19
2.	Material	20
2.1.	Geräte	20
2.2.	Verbrauchsmaterialien	21
2.3.	Chemikalien und Pharmazeutika	22
2.4.	Primer	23
2.5.	Antikörper.....	24
2.6.	Futtermittel	24
2.7.	Software.....	25
3.	Methoden.....	26
3.1.	Versuchsdesign	26
3.1.1.	PAR1- und PAR2-Agonisten Versuch.....	26
3.1.2.	Akute Reninstimulationsversuche	26
3.1.3.	Chronische Reninstimulationsversuche	26
3.1.4.	Stoffwechselläufigexperimente	27
3.1.5.	Osmotische Minipumpen	28
3.2.	Plasma- und Urinanalyse.....	28
3.2.1.	Plasmareninkonzentration	28
3.2.2.	Plasmaaldosteronkonzentration	30
3.2.3.	Plasma- und Urinelektrolyte.....	30
3.2.4.	Osmolarität von Plasma und Urin.....	31
3.2.5.	Hämatokrit	31
3.3.	Glomeruläre Filtration.....	31
3.3.1.	Ureakonzentration.....	31
3.3.2.	Kreatininkonzentration Plasma.....	32
3.3.3.	Kreatininkonzentration Urin.....	32
3.3.4.	Berechnung der Kreatininclearance	32
3.4.	Blutdruckmessung.....	33
3.5.	Immunhistochemie.....	33
3.6.	RT-PCR.....	35
3.7.	Statistik.....	37
V.	ERGEBNISSE	38

1.	Agonistenversuche	38
1.1.	Plasmareninkonzentration	38
2.	Charakterisierung von PAR2-KO-Mäusen.....	38
2.1.	Renin	38
2.1.1.	Plasmareninkonzentration	39
2.1.2.	Renin mRNA	39
2.1.3.	Immunhistochemie.....	40
2.2.	Kardiovaskulär.....	40
2.2.1.	Systolischer Blutdruck	40
2.2.2.	Herzfrequenz.....	41
2.3.	Nierenfunktion.....	42
2.3.1.	Kreatininkonzentration.....	42
2.3.2.	Ureakonzentration.....	42
2.4.	Urinexkretion und Trinkverhalten	43
2.4.1.	Urinvolumen	43
2.4.2.	Trinkvolumen	43
2.4.3.	Osmolarität	44
2.4.3.1.	Plasmaosmolarität	44
2.4.3.2.	Urin-osmolarität	44
2.4.4.	Hämatokrit	45
2.5.	Elektrolyte	45
2.5.1.	Plasmaelektrolyte.....	46
2.5.2.	Elektrolytausscheidung im Urin	46
2.6.	Zusammenfassung.....	46
3.	Akute Reninstimulation	47
3.1.	Plasmareninkonzentration	47
3.2.	Hämatokrit	49
4.	Chronische Reninstimulation durch Diuretika.....	50
4.1.	Renin	50
4.1.1.	Plasmareninkonzentration	50
4.1.2.	Renin mRNA	51
4.2.	Nierenfunktion.....	52
4.2.1.	Kreatininkonzentration und -clearance	52
4.2.2.	Ureakonzentration.....	53

4.3.	Urinexkretion und Trinkverhalten	53
4.3.1.	Urinvolumen.....	53
4.3.2.	Trinkvolumen	54
4.3.3.	Osmolarität	55
4.3.3.1.	Plasmaosmolarität	55
4.3.3.2.	Urinosmolarität	55
4.3.4.	Hämatokrit	56
4.4.	Elektrolyte	56
4.4.1.	Plasmaelektrolyte.....	56
4.4.2.	Natriumausscheidung im Urin.....	57
4.4.3.	Kaliumausscheidung im Urin	58
4.5.	Zusammenfassung.....	58
5.	Chronische Salzdiäten.....	58
5.1.	Renin	59
5.1.1.	Plasmareninkonzentration	59
5.1.2.	Renin mRNA	59
5.2.	Kardiovaskulär.....	60
5.2.1.	Systolischer Blutdruck	60
5.2.2.	Herzfrequenz.....	60
5.3.	Nierenfunktion.....	61
5.3.1.	Kreatininkonzentration und -clearance	61
5.3.2.	Ureakonzentration.....	62
5.4.	Urinexkretion und Trinkverhalten	62
5.4.1.	Urinvolumen.....	62
5.4.2.	Trinkvolumen	62
5.4.3.	Osmolarität	63
5.4.3.1.	Plasmaosmolarität	63
5.4.3.2.	Urinosmolarität	63
5.4.4.	Hämatokrit	64
5.5.	Elektrolyte	64
5.5.1.	Plasmaelektrolyte.....	64
5.5.2.	Natriumausscheidung im Urin.....	65
5.5.3.	Kaliumausscheidung im Urin	65
5.6.	Zusammenfassung.....	65

6.	Chronische Reninstimulation durch AT₁-Antagonisten.....	65
6.1.	Renin	66
6.1.1.	Plasmareninkonzentration	66
6.1.2.	Renin mRNA	67
6.1.3.	Immunhistochemie.....	67
6.2.	Kardiovaskulär.....	69
6.2.1.	Systolischer Blutdruck	69
6.2.2.	Herzfrequenz.....	70
6.3.	Nierenfunktion.....	70
6.3.1.	Kreatininkonzentration und -clearance	70
6.3.2.	Ureakonzentration.....	71
6.4.	Urinexkretion und Trinkverhalten	72
6.4.1.	Urinvolumen.....	72
6.4.2.	Trinkvolumen	72
6.4.3.	Osmolarität	72
6.4.3.1.	Plasmaosmolarität	72
6.4.3.2.	Urinosmolarität	73
6.4.4.	Hämatokrit	73
6.5.	Elektrolyte	74
6.5.1.	Plasmaelektrolyte.....	74
6.5.2.	Elektrolytausscheidung im Urin	75
6.6.	Endothelialer Natriumkanal (ENaC) mRNA.....	75
6.7.	Zusammenfassung.....	76
7.	Plasmaaldosteronkonzentration	76
8.	PAR1- und PAR2-Expression in Nieren von WT-Mäusen.....	77
8.1.	PAR1	77
8.2.	PAR2	77
VI.	DISKUSSION.....	79
1.	PAR1 und PAR2 <i>in vitro</i>	79
2.	Charakterisierung der PAR2-KO-Maus.....	80
2.1.	Reninsynthese und -sekretion	80
2.2.	Kardiovaskulär.....	81
2.3.	Nierenfunktion.....	81

I.	EINLEITUNG	XI
3.	Akute Stimulation der Reninsekretion.....	83
3.1.	PAR1 und PAR2-Agonisten.....	83
3.2.	Akute Stimuli.....	84
4.	Chronische Stimulation der Reninsynthese und -sekretion	84
4.1.	Reninsynthese und -sekretion	85
4.2.	Kardiovaskulär.....	86
4.3.	Nierenfunktion.....	87
4.6.	Aldosteronkonzentration	89
4.7.	PAR1- und PAR2-Expression	90
5.	Ausblick.....	90
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VIII.	SUMMARY	92
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	93
X.	ANHANG	107
1.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	107
2.	Abkürzungsverzeichnis.....	113
XI.	DANKSAGUNG.....	117

I. EINLEITUNG

Arterielle Hypertonie ist, besonders in den Industrieländern, ein weit verbreitetes Leiden. Etwa 20-30 % aller Erwachsenen sind davon betroffen. Bei den über 60 Jährigen haben bereits über 40 %, einen dauerhaften Blutdruck von mehr als 140/90 mmHg. Die genaue Ursache des Bluthochdrucks ist häufig nicht eindeutig zu ermitteln, neben einer genetischen Komponente können unter anderem Übergewicht, Bewegungsmangel, erhöhter Salzkonsum, Stress, Vorerkrankung wie Diabetes mellitus, Störungen des Hormonsystems und Anomalien des Herzkreislaufsystems dazu führen. Auch eine Störung der Nierenfunktion kann auf Grund der maßgeblichen Beteiligung der Niere an der Regulation des Blutdrucks und des Salz- und Wasserhaushaltes durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zu einer Hypertonie führen. Ein dauerhaft erhöhter Blutdruck ist ein Risikofaktor für das Auftreten von kongestivem Herzversagen, eines Schlaganfalls oder Herzinfarktes und von Nierenfunktionsstörungen. Neben einer Vermeidung beziehungsweise Therapie möglicher Ursachen gelten als pharmakologische Therapie erster Wahl ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorblocker, niedrig dosierte Diuretika, Betablocker und Kalziumantagonisten, um den Blutdruck zu reduzieren.

Ein frühzeitigeres Eingreifen in die Kaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kann unter Umständen zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führen. Da die Regulationsmechanismen der Reninsekretion jedoch noch nicht vollends erforscht sind, könnte eine Aufklärung weiterer regulierender Faktoren der Reninsynthese und -freisetzung zur Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen beitragen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Niere

1.1. Aufgaben der Niere

Die Niere ist für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Salz- und Wasserhaushaltes und für die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte und Substanzen verantwortlich. Hierfür wird in den Glomeruli der Primärharn aus dem Blut filtriert und anschließend entlang des Tubulussystems durch verschiedene Sekretions- und Resorptionsprozesse von Wasser und Elektrolyten konzentriert, um einen möglichst konstanten Elektrolyt- und Wasserhaushalt zu erhalten. Dadurch und durch die Synthese der Aspartyl-Protease Renin in der Niere ist sie außerdem ein wichtiger Regulator des systemischen Blutdrucks. Des Weiteren werden Hormone wie beispielsweise Erythropoetin (Erythropoese) und Calcitriol (Calciumhaushalt) in den Nieren (Klinke et al. 2010; von Engelhardt et al. 2005) gebildet.

1.2. Struktur der Niere

Das Nierenparenchym ist von einer Bindegewebskapsel umgeben (Capsula fibrosa) und in die äußere Nierenrinde (Cortex renalis) und das innenliegende Nierenmark (Medulla renalis) unterteilt. Im Zentrum befindet sich das Nierenbecken (Pelvis renalis), welches in den Harnleiter mündet. Die funktionelle Einheit bildet das Nephron. Es besteht aus dem Malpighi-Körperchen und dem Tubulussystem. Im Malpighi-Körperchen wird der Primärharn aus dem Blut filtriert und anschließend im Tubulussystem durch Rückresorption und Exkretion von Wasser und Elektrolyten konzentriert. Der Nierentubulus unterteilt sich in die folgenden Abschnitte: ausgehend vom Glomerulus gelangt der Primärharn in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und anschließend über den Verbindungstubulus in das Sammelrohr. Dieses mündet in den Nierenkelch und dieser wiederum in das Nierenbecken (Hees et al. 2000; Nickel et al. 2004).

1.3. Das Malpighi-Körperchen

Das Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen) setzt sich aus der Bowman-Kapsel und den Glomeruluskapillaren zusammen. Die Bowman-Kapsel besteht aus zwei Schichten, einem parietalen und einem visceralen Blatt. Das parietale Blatt ist von einer Basalmembran umgeben und bildet die äußere Abgrenzung des Nierenkörperchens. Das viszerale Blatt liegt

den Glomeruluskapillaren direkt an und wird von Podozyten gebildet, zwischen deren Fußfortsätzen ein Schlitzdiaphragma ausgebildet ist. Zwischen den Blättern befindet sich ein Lumen, in welchem der Primärharn gesammelt wird und in den proximalen Tubulus abfließt. Die Glomeruluskapillaren sind ein knäuelartiges Kapillargeflecht mit einem fenestrierten Epithel, welches jedoch nicht von einem Diaphragma verschlossen ist. Diese Endothelform ermöglicht eine Abgabe von harnpflichtigen Substanzen bis zu einer Größe von ca 70 kDa, Wasser und Elektrolyten. Negativ geladene Proteine, welche kleiner 70 kDa sind, können die Blut-Harn-Schrank jedoch auf Grund der stark negative geladenen Glykokalix nur sehr schwer passieren.

Dem Vas afferens (zum Glomerulus hinführende Ateriole) anliegend befinden sich die juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen), in welchen Renin synthetisiert und bei Bedarf sezerniert wird. Die Zellen der Macula densa sind hochprismatische Zellen des distalen Tubulus, welche dem Vas afferens des Nierenkörperchens anliegen. Sie detektieren den Natrium- und Chlorid-Ionen-Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Sekundärharn (Chemorezeptoren). Gemeinsam mit den JG-Zellen und extraglomerulären Mesangialzellen bilden sie den Juxtaglomerulären Apparat (Hees et al. 2000; Nickel et al. 2004).

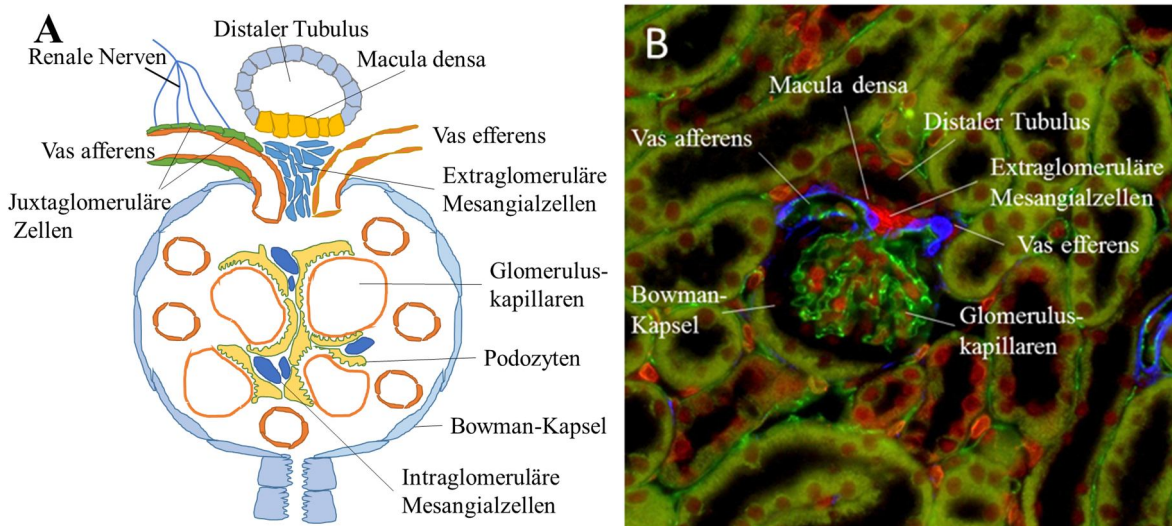


Abb. 1: A: Schematische Darstellung eines Malpighi-Körperchens und des Juxtaglomerulären Apparates; B: Immunhistochemische Darstellung eines Malpighi-Körperchens und des Juxtaglomerulären Apparates, rot: COX1, blau: Glattmuskelaktin, grün: PECAM (Endothelzelle). (Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Klaus Höcherl)

1.4. Die Juxtaglomeruläre Zelle

In der Tunica media der afferenten Ateriole, direkt am Übergang in das glomeruläre Kapillargeflecht, befinden sich die sogenannten Juxtaglomerulären Zellen. In diesen Zellen findet die Reninsynthese und –sekretion statt (Barajas et al. 1986; Deschepper et al. 1986).

Sie weisen eine kuboide Form auf und sind durchschnittlich ca. $500 \mu\text{m}^3$ groß. Ihr charakteristisches Erscheinungsbild ist durch die Vielzahl an reninhaltigen Vesikeln mit einem durchschnittlichen Volumen von etwa $0,63 \mu\text{m}^3$ geprägt (Jensen et al. 1997b). Die Vesikel können in größere, elektronendichtere, reife und kleinere, weniger dichte Vesikel unterschieden werden. Während die reifen Vesikel aktives Renin enthalten, befindet sich in den kleineren Granula Prorenin (Hunt et al. 1992). Weitere Merkmale der JG-Zelle sind ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat, ein vergleichsweise großes raues endoplasmatisches Retikulum, sowie wenige Mitochondrien (Hackenthal et al. 1990).

Es gibt Hinweise, dass die JG-Zellen und die glatten Muskelzellen aus gleichen Vorläuferzellen entstehen (Sequeira Lopez et al. 2004; Sequeira Lopez et al. 2001). So ist es möglich, dass bei einer länger andauernden Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) neue JG-Zellen aus anliegenden glatten Muskelzellen rekrutiert werden, obwohl die Reninkapazität der bestehenden JG-Zellen noch bei weitem nicht ausgeschöpft ist (Chen et al. 2007b; Gomez et al. 1990a; Sequeira Lopez et al. 2004; Taugner et al. 1984). Vermutlich wird durch den Verzicht auf eine deutlich verstärkte Reninsekretionsrate bei längerfristiger Stimulation des RAAS die Gefahr der unkontrollierten Sezernierung verringert und die Möglichkeit einer akuten Freisetzung bei Bedarf erhalten (Friis et al. 2013; Taugner et al. 1984).

2. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

2.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das RAAS ist maßgeblich an der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes im Organismus beteiligt und wirkt damit sowohl indirekt als auch direkt regulierend auf den Blutdruck. Das RAAS besteht aus einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren (s. Abb. 2).

Die Aspartyl-Protease Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und in die Blutbahn mittels Exozytose freigesetzt. Renin spaltet zunächst das Dekapeptid Angiotensin I (ANGI) von dem in der Leber gebildeten Oligopeptid Angiotensinogen ab. Anschließend wandelt das Angiotensin Converting Enzym (ACE) das ANGI in das biologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II (ANGII) um. Angiotensin II wirkt über AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren (Unger et al. 1996), wobei in der Niere vor allem der AT_1 -Rezeptor exprimiert ist. Zu den durch ANGII stimulierten renalen Effekten gehören die Aktivierung von Na^+/H^+ -Austauschern, Na^+ -Bicarbonat-Transportern und Na^+/K^+ -ATPasen (Timmermans et al. 1993). Zudem bedingt ANGII einen vasokonstriktorischen Effekt, eine

Stimulation des Durstgefühls und die Freisetzung des in der Nebenniere gebildeten Steroidhormons Aldosteron. Dieses führt über die Stimulation der Neusynthese und des Einbaus von präformierten epithelialen Natriumkanälen (ENaC), Kaliumkanälen (ROMK) und der Na^+/K^+ -ATPase im Verbindungstubulus und Sammelrohr zu einer vermehrten Natriumrückresorption (Achara et al. 2006). Alle Effekte führen zu einem Anstieg des Blutdrucks. (Bernardi et al. 2016)

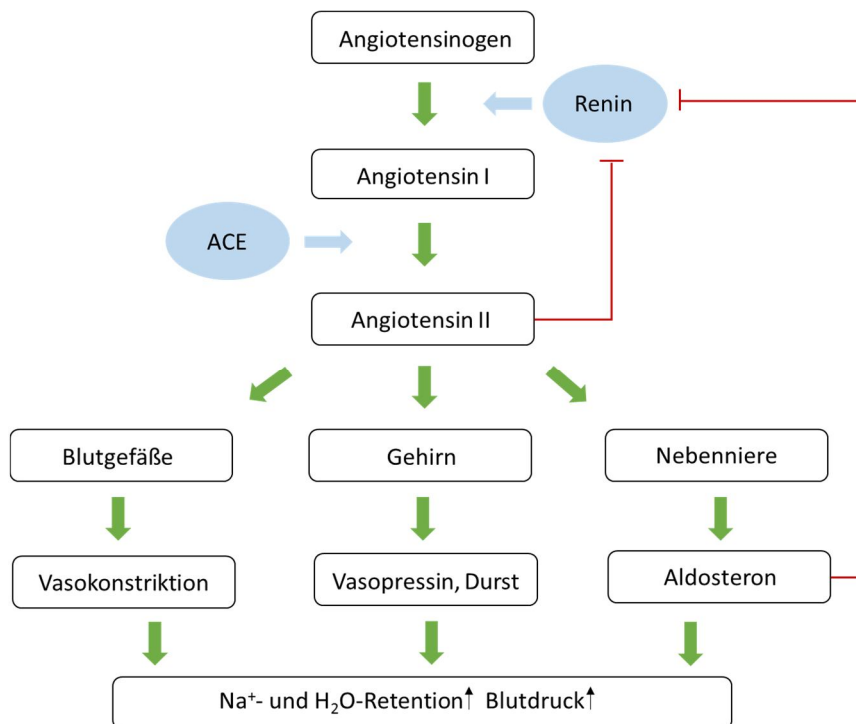


Abb. 2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

2.2. Renin-Synthese und Sekretion

Die Aspartyl-Protease Renin wird in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen gebildet, welche in den Nieren entlang der Vas afferens der Glomeruli zu finden sind. Renin wird als Präprorenin translatiert und zunächst in das endoplasmatische Retikulum transferiert, wo es, durch Abspaltung der Präsequenz, in das enzymatisch inaktive Prorenin umgewandelt wird (Hackenthal et al. 1990; Morris 1992). Das Prorenin wird in den Golgi-Apparat transportiert und in Granula gespeichert (Taugner et al. 1987), wo es durch die Abspaltung der N-terminalen Pro-Sequenz (46 Aminosäuren) in aktives Renin umgewandelt wird. Die Abspaltung der Prosequenz geschieht dabei wahrscheinlich entweder durch Cathepsin B (Jutras et al. 1999; Neves et al. 1996) oder Prohormon-Konvertasen (Laframboise et al. 1997) in den Vesikeln, die genaue Reaktion ist jedoch bis heute noch nicht bekannt.

Bei Bedarf wird das aktive Renin über eine regulierte Exozytose aus den Vesikeln sezerniert (Taugner et al. 1987), wobei auch hier der genaue Prozess der Exozytose noch nicht genau bekannt ist (Friis et al. 2013; Peti-Peterdi et al. 2004; Schweda et al. 2007).

2.3. Regulatorische Faktoren der Reninsynthese und –sekretion

Renin ist in der Kaskade des RAAS der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und somit für die Regulation der Effekte des RAAS entscheidend. Die Kontrolle der Reninsekretion erfolgt durch verschiedene voneinander unabhängige Mechanismen, wodurch eine angemessene Reaktion auf Änderungen des Blutdrucks und des Salz- und Wasserhaushaltes gewährleistet werden kann (Castrop et al. 2010).

2.3.1. Angiotensin II

Angiotensin II per se wirkt über einen negativen Rückkopplungseffekt inhibierend auf die Reninfreisetzung (Hackenthal et al. 1990; Kurtz et al. 1999).

Es handelt sich dabei um einen von AT₁-Rezeptoren vermittelten Effekt, die an der Oberfläche der Renin bildenden JG-Zellen exprimiert sind (Castrop et al. 2010). Wenn ANGIOTENSIN II daran bindet führt dies zu einer Aktivierung der Phospholipase C, welche die Proteinkinase C aktiviert, wodurch vermehrt Kalziumkanäle geöffnet werden (Kurtz et al. 1986b). Außerdem wird durch eine direkte Kopplung der AT₁-Rezeptoren und Kalziumkanäle der Kalzium-Einstrom in die JG-Zellen zusätzlich erhöht und intrazelluläres Kalzium durch eine Inositoltriphosphat vermittelte Freisetzung aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Der Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration bewirkt eine Inhibierung der Reninsekretion (Kurtz et al. 1989; Kurtz et al. 1999)

2.3.2. Blutdruck

Ein weiterer wichtiger Regulator des RAAS ist der systemische Blutdruck. Über einen negativen Feedback führt ein erhöhter Blutdruck und der damit verbundene erhöhte Perfusionsdruck in der Niere zu einer Inhibierung der Reninsekretion. Wo hingegen ein niedriger Perfusionsdruck in der Niere, durch einen niedrigen Blutdruck bedingt, eine Stimulation der Reninfreisetzung nach sich zieht (Davis et al. 1976; Nafz et al. 1997). Der genaue Mechanismus dieses Effekts ist bisher nicht bekannt. Man vermutet jedoch, dass der intraluminale Druck in den Nierengefäßen, und die damit verbundene Zu- beziehungsweise Abnahme der Wandspannung, von Mechanorezeptoren in den JG-Zellen detektiert wird (Carey et al. 1997; Fray 1976; Ryan et al. 2000; Scholz et al. 1994).

2.3.3. Sympathisches Nervensystem

Das sympathische Nervensystem übt einen stimulierenden Effekt auf die Reninfreisetzung aus. Bei Aktivierung des sympathischen Nervensystems werden an den Nervenenden Katecholamine freigesetzt, welche an β_1 -adrenerge Rezeptoren (G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) binden. Diese Rezeptoren sind auch an der Oberflächen der JG-Zellen exprimiert und lösen bei einer Aktivierung eine durch G-Proteine vermittelte Kaskade aus. Diese führt zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP und dadurch zu einer vermehrten Reninsynthese und Sekretion (Boivin et al. 2001; Hackenthal et al. 1990; Schweda et al. 2004).

2.3.4. Salzaufnahme

Die Salzaufnahme ist ein weiterer Faktor, der zur Regulation des RAAS beiträgt. Eine vermehrte Kochsalzaufnahme führt zu einer Hemmung der Reninsekretion, wo hingegen eine verminderte NaCl-Aufnahme zu einer gesteigerten Freisetzung führt (Wagner et al. 1998). In wie weit dieser Effekt durch den direkten Mechanismus über die Macula densa-Zellen (MD-Zellen) beeinflusst wird und in wie weit eine indirekte Beeinflussung über die Änderung des Blutdrucks eine Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt (Castrop et al. 2004).

Die akuten Veränderungen werden vor allem über den Macula densa-Mechanismus vermittelt. MD-Zellen sind spezialisierte Tubuluszellen in den distalen Tubuli, welche in Nachbarschaft zur Vas afferens der Glomeruli und den JG-Zellen lokalisiert sind. Sie registrieren Schwankungen in der NaCl-Konzentration des Sekundärharns im distalen Tubulus. Hierfür wird NaCl über den NKCC2-Transporter in die MD-Zelle transportiert. Dabei scheint die Cl⁻-Konzentration der ausschlaggebende Faktor für die Regulation der Reninsekretion zu sein (Lorenz et al. 1991).

Die MD-Zellen können die Reninsekretion sowohl direkt, als auch indirekt modulieren. Der direkte Effekt wird wahrscheinlich über Prostaglandin (PG) E₂ und ATP vermittelt (Kim et al. 2006; Peti-Peterdi et al. 2010). Eine hohe Cl⁻-Konzentration führt dabei zur Synthese von ATP, welches über Adenosin-A1-Rezeptoren eine Inhibition der Reninsekretion bewirkt. Bei einer niedrigen Cl⁻-Konzentration wird durch eine gesteigerte PGE₂-Synthese die Reninproduktion und -abgabe stimuliert (Kim et al. 2006; Lorenz et al. 1990; Schweda et al. 2009; Skott et al. 1987). Bei einer hohen Cl⁻-Konzentration im Tubulussystem wird außerdem lokal die Blutzufuhr zum glomerularen Kapillargeflecht über die afferenten Arteriolen reduziert und dadurch die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) verringert (Castrop

2007; Schnermann et al. 2003). Durch diesen, als „tubulo-glomerulärer Feedback“ bezeichneten Effekt führt eine Änderung der Cl-Konzentration zusätzlich zu einer Beeinflussung des Perfusionsdrucks und damit indirekt auch der Reninfreisetzung.

Da eine vermehrte beziehungsweise verminderte NaCl-Aufnahme auch einen Anstieg beziehungsweise Abfall des systemischen Blutdrucks bewirkt, wird die Reninsekretion dadurch sekundär ebenfalls reguliert (O'Shaughnessy et al. 2006).

2.3.5. Weitere regulierende Faktoren

Zusätzlich zu den systemischen Faktoren spielen auch einige lokale Mediatoren eine Rolle in der Reninregulation. Die wichtigsten vermittelnden Substanzen in der Reninregulation sind Stickstoffmonoxid (NO) und PGE₂ für die Stimulation und Adenosin für die Inhibition.

NO wirkt stimulierend auf die Reninsekretion. Es wird in den MD-Zellen von der neuronalen NO-Synthase (nNOS) (Wilcox et al. 1992) und in den Endothelzellen der afferenten Arteriolen von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Mundel et al. 1992) gebildet.

Das PGE₂ bewirkt ebenfalls eine vermehrte Reninfreisetzung. Es wird, abhängig von der NaCl-Konzentration im distalen Tubulus, von den MD-Zellen gebildet. Dieser Mechanismus ermöglicht eine Kompensation akuter NaCl-Konzentrationsschwankungen durch eine vermehrte Exozytose von Renin (Campean et al. 2003; Peti-Peterdi et al. 2003). Durch Adenosin wird zum einen die Reninfreisetzung, abhängig vom renalen Perfusionsdruck, inhibiert (Kurtz et al. 1988a; Schweda et al. 2005). Zum anderen führt es zu einer druckabhängigen Vasokonstriktion der Vas afferens (Castrop et al. 2004; Oppermann et al. 2008). Dieser Effekt gewährleistet einen, vom systemischen Blutdruck weitgehend unabhängigen, renalen Blutdruck von 80-180 mmHg und dient als Schutz vor einer akuten Schädigung des Glomerulums und zur Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen GFR (Inscho 2001; Inscho et al. 1996; Majid et al. 1999). Adenosin entsteht als Reaktion auf eine erhöhte NaCl-Konzentration beziehungsweise einen erhöhten renalen Perfusionsdruck in den MD-Zellen bei der Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat und in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Arteriolen. (Bodin et al. 2001; Komlosi et al. 2004).

Weitere Stimulantien der Synthese und Sekretion von Renin sind Prostazyklin (PGI₂), Adrenomedullin, Bradykinin, Calcitonin Gene related Peptide (CGRP), Histamin, Thyroxin und Triiodthyronin (Castrop et al. 2010; Chen et al. 2007a; Jensen et al. 1997a; Keeton et al. 1980; Kurtz et al. 1988c; Schwertschlag et al. 1982a; Schwertschlag et al. 1982b;

Schwertschlag et al. 1982c). Inhibierend wirken neben Adenosin auch der Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), Interleukin 1 und 6, Platelet activated factor (PAF), TGF- β II, Vasopressin und Endothelin (Kageyama et al. 1990; Keeton et al. 1980; Kurtz et al. 1988c; Petrovic et al. 1997; Pfeilschifter et al. 1985; Pietri et al. 2002; Todorov et al. 2002).

2.4. Zelluläre Regulation der Reninsynthese und –sekretion

Die Reninsynthese und -sekretion wird durch second messenger kontrolliert. Hier spielen Kalzium, cAMP und cGMP eine entscheidende Rolle (Grunberger et al. 2006; Kurtz 2011; Schweda et al. 2007).

Der Mechanismus, wie Kalzium die Reninsekretion beeinflusst ist noch nicht genau bekannt. Auffallend ist, dass eine hohe intrazelluläre Kalzium-Konzentration zu einer Reduktion der Reninfreisetzung aus den JG-Zellen führt, wo hingegen es in anderen sekretorischen Zellen die Freisetzung von Vesikeln stimuliert. Dieser Effekt wird als das so genannte „Kalzium-Paradoxon“ bezeichnet (Cohen et al. 1997; Hackenthal et al. 1990; Ichihara et al. 1995; Kurtz et al. 1986a; Takagi et al. 1988). Als mögliche Signalwege für diesen Effekt werden zum einen die Proteinkinase C, Myofilamente, kalziumbindende Moleküle wie Calmodulin und Calcineurin oder Calcium-aktivierte Chloridkanäle beschrieben (Hano et al. 1990; Kurtz et al. 1989; Kurtz et al. 1986b; Madsen et al. 2010; Schrickler et al. 1995). Zum anderen gibt es Hinweise auf einen direkten Einfluss von Kalzium auf die cAMP-Konzentration über eine Hemmung der Adenylylzyklasen (AC) 5 und 6 (Grunberger et al. 2006; Ortiz-Capisano et al. 2007).

Wie cAMP zu einer vermehrten Reninsekretion führt, ist noch unzureichend bekannt. Vermutlich wird durch cAMP die Proteinkinase A aktiviert, welche über, noch unbekannt, Zielmoleküle die Synthese und Sezernierung von Renin beeinflusst (Schweda et al. 2007). Bekannt ist hingegen, dass die cAMP-Konzentration durch die AC (Synthese) und Phosphodiesterasen (PD) (Abbau) gesteuert wird. So führt eine Aktivierung der AC durch Hormone wie Dopamin, PGE₂ und PGI₂, durch die Neurohormone CGRP, PACAP und Adrenomedullin (Friis et al. 2005; Hautmann et al. 2007; Jensen et al. 1997a; Kurtz et al. 1988b; Kurtz et al. 1988c) oder direkt durch Forskolin (Kurtz et al. 1984) zu einer vermehrten Reninfreisetzung.

Die Rolle von cGMP lässt sich noch nicht eindeutig einordnen (Kurtz et al. 1989). Es scheint eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Reninfreisetzung zu haben. So ist bei geringer cGMP-Konzentration die PDE-3 ein mögliches Zielmolekül, da diese eine hohe

Affinität zu cGMP besitzt. Die Inhibition der PDE-3 führt zu einem Anstieg des cAMP und dadurch zu einem Anstieg der Renin-Synthese und –Sekretion (Beavo 1995; Chiu et al. 1996; Friis et al. 2002). Ein hoher cGMP-Gehalt in der Zelle führt zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase II (cGKII), welche einen hemmenden Effekt auf die Reninsekretion ausübt. Da die cGKII eine geringe Affinität zu cGMP besitzt, wird diese erst bei hohen Konzentrationen aktiviert (Gambaryan et al. 1998; Kurtz et al. 1998; Wagner et al. 1998).

3. Protease-aktivierte Rezeptoren

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) stellen eine Subgruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar. G-Protein gekoppelte Rezeptoren bestehen aus sieben, über sogenannte Schleifen miteinander verbundene, Transmembrandomänen und enden intrazellulär mit einem Aminosäureschwanz mit einer Carboxygruppe (C-Terminus) und extrazellulär mit einer Aminogruppe (N-Terminus) (Baldwin 1994; Kobilka 2007). PAR werden durch die Wirkung von Serinproteasen aktiviert. Diese spalten den extrazellulären N-Terminus des Rezeptors ab. Die daraus neu entstandene Peptidsequenz am extrazellulären Terminus wirkt als rezeptoreigener Ligand und führt zur Selbstaktivierung des Rezeptors (Dery et al. 1998; Steinhoff et al. 2005).

3.1. Serinproteasen

Serinproteasen sind in der Lage, als proteolytische Enzyme Peptidbindungen zu hydrolysieren. Sie besitzen drei Aminosäurereste (Serin, Histidin, Asparaginsäure), welche als katalytische Triade zusammengefasst werden und das charakteristische Merkmal der Serinproteasen darstellen (Steinhoff et al. 2005). Die Serinproteasen spielen bei der Homöostase, Blutgerinnung, Fibrinolyse und beim Proteinverdau eine wichtige Rolle. Sie können nicht nur über Spaltung von extrazellulären Proteinen wirken, sondern können auch, über Auslösung intrazellulärer Signale an entsprechenden Rezeptoren, Signale vermitteln. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die durch Proteolyse aktiviert werden, werden als Protease-aktivierte Rezeptoren bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt, indem die Serinproteasen einen Teils des extrazellulären N-Terminus proteolytisch abspalten (Dery et al. 1998). Der extrazelluläre N-Terminus wird an einer spezifischen Stelle abgespalten. Dadurch entsteht ein neuer extrazellulärer Terminus, welcher als gebundener Ligand (tethered ligand) für ein rezeptoreigenes aktives Zentrum an der zweiten extrazellulären

Schleife dient. Wenn der spezifische Ligand nun an das aktive Zentrum bindet, führt das zu einer Konformationsänderung des GPCR, wodurch dieser aktiviert wird (Dery et al. 1998).

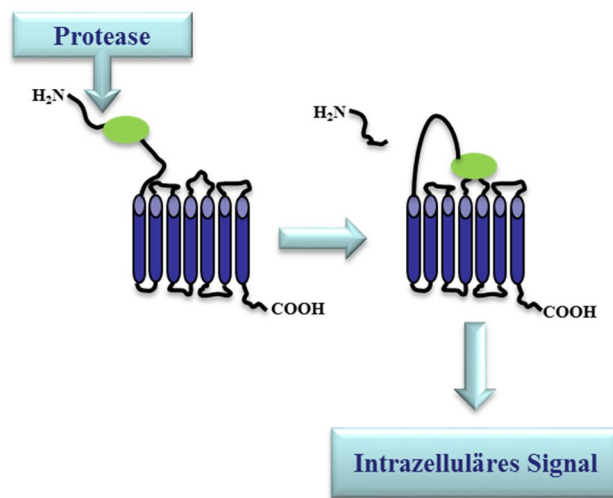


Abb. 3: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch eine Serinprotease

3.2. Protease-aktivierte Rezeptoren

In Säugetieren werden vier verschiedene PAR (PAR1, 2, 3 und 4) unterschieden. Der erste beschriebene PAR war der PAR1 (früher auch Thrombin-Rezeptor genannt), welcher durch Thrombin aktiviert wird und eine Rolle in der Blutgerinnung spielt (Vu et al. 1991). Der Aktivierungsmechanismus entspricht nicht dem eines klassischen Rezeptors, da der spezifische Ligand bereits im N-Terminus des Rezeptors enthalten ist und durch eher unspezifische Agonisten (Serinproteasen) freigelegt wird (Coughlin 2005; Dery et al. 1998; Steinhoff et al. 2005). Mögliche Agonisten für die PAR1, 3 und 4 Subtypen sind Thrombin, der Faktor Xa und Trypsin, außerdem kann PAR3 durch aktiviertes Protein C aktiviert werden (Coughlin 2005; Klarenbach et al. 2003; Nystedt et al. 1995; Steinhoff et al. 2005; Xu et al. 1998). Der PAR2 Subtyp wird als einziger PAR nicht durch Thrombin, sondern durch Mastzelltryptase, Faktor Xa, Trypsin, Acrosin und neuronale Serinproteasen aktiviert (siehe Tabelle 1) (Camerer et al. 2000; Klarenbach et al. 2003; Molino et al. 1997; Nystedt et al. 1994; Steinhoff et al. 2005). Nach Aktivierung werden PAR mittels Endozytose internalisiert und nachfolgend in Lysosomen abgebaut. Deshalb ist die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren irreversibel. Es ist auch möglich, die PAR selektiv durch synthetische Peptide zu aktivieren. Deren Sequenzen sind identisch zu der rezeptoreigenen Ligandensequenz und binden ebenfalls an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors, wodurch dieser aktiviert wird (siehe Tabelle 1) (al-Ani et al. 1995; Cheung et al. 1998; Henriksen et al. 2002; Hollenberg et al. 1997).

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Mögliche aktivierende Serinproteasen	Thrombin Faktor Xa Trypsin Aktiviertes Protein C Urokinase	Trypsin Tryptase Faktor Xa Kallikreine	Thrombin Faktor Xa Trypsin	Thrombin Faktor Xa Trypsin
Aktivierende Peptide	TFLLR	SLIGRL	Keine	AYPGKF

Tab. 1: Auflistung der wichtigsten aktivierenden Faktoren der PAR und möglichen synthetischen Aktivierungspeptiden

Wichtige Mediatoren in der Signalübertragungskaskade der G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind die G-Proteine. Werden die Rezeptoren aktiviert, so führt dies zu einer Konformationsänderung dergleichen. Dadurch werden die, am C-Terminus gebundenen, G-Proteine in einen aktiven Zustand versetzt und abgespalten. Die Untereinheiten der G-Proteine können so als spezifische Effektoren in der Signalkaskade wirken (Clapham et al. 1997). In Tabelle 2 ist eine Übersicht über die G-Proteine zu sehen, welche an den jeweiligen PAR binden (Coughlin 2005; Nakanishi-Matsui et al. 2000; Russo et al. 2009; Soh et al. 2010).

PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
G _q G _i G _{12/13}	G _q G _i G _{12/13}	G _q	G _q G _{12/13}

Tab. 2: Auflistung der wichtigsten G-Proteine, die durch die PAR aktiviert werden

Die PAR sind in verschiedenen Geweben exprimiert, alle vier sind in Endothelien und in Myo- und Astrozyten zu finden, weitere Lokalisationen sind in Tabelle 3 aufgelistet (Barnes et al. 2004; Barrett et al. 1998; Bono et al. 1997; Connolly et al. 1996; Coughlin 2000; D'Andrea et al. 1998; Dery et al. 1998; Ishihara et al. 1997; Molino et al. 1998; Ossovskaya et al. 2004). Die PAR1 und 2 sind auch in der Niere exprimiert (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011; Molino et al. 1997; Rondeau et al. 1999).

PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Thrombozyten	Endothelzellen	Thrombozyten	Thrombozyten
Endothelzellen	VSMC	Endothelzellen	Endothelzellen
VSMC	Epithelzellen	Kardiomyozyten	Kardiomyozyten
Epithelzellen	Fibroblasten	Astrozyten	Astrozyten
Fibroblasten	Kardiomyozyten	Neuronen	
Kardiomyozyten	Astrozyten	Monozyten	
Astrozyten	Neuronen	Makrophagen	
Neuronen	Mastzellen	T-Lymphozyten	
Mastzellen	Makrophagen		
Monozyten	T-Lymphozyten		
Makrophagen	Eosinophile		
T-Lymphozyten	Granulozyten		

Tab. 3: Lokalisationen der einzelnen Protease-aktivierten Rezeptoren

3.3. Aufgaben der Protease-aktivierten Rezeptoren

Die Protease-aktivierten Rezeptoren sind in verschiedensten Geweben lokalisiert (siehe Tabelle 3) und dadurch an zahlreichen verschiedenen Prozessen beteiligt. Dazu gehören unter anderen die Thrombozytenaggregation, atherosklerotische und proinflammatorische Prozesse, die Zellproliferation und -migration und die Zellmatrixsynthese (Hollenberg et al. 2016; Morley et al. 2015a; Morley et al. 2015b; Morley et al. 2015c)

3.3.1. Blutgerinnung

Protease-aktivierte Rezeptoren sind auch bei der Thrombozytenaggregation von großer Bedeutung. Es gibt speziesspezifische Unterschiede, welche PAR hier beteiligt sind. Beim Menschen ist der PAR1 und PAR4 auf den Thrombozyten exprimiert (Kataoka et al. 2003; Shapiro et al. 2000), wo hingegen z.B. Nagerthrombozyten PAR3 und PAR4 tragen (Connolly et al. 1996; Khan et al. 2005; Nakanishi-Matsui et al. 2000). Allen drei PAR gemein ist, dass sie durch die Serinprotease Thrombin aktiviert werden und nachfolgend Thrombozyten aktivieren, was zu einer Thrombozytenaggregation führt. Während PAR1 eine sehr hohe Affinität zu Thrombin aufweist, ist die zu PAR4 deutlich geringer. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die PAR4 induzierte Thrombozytenaktivierung erst bei

hohen Thrombinkonzentrationen ins Gewicht fällt (Kataoka et al. 2003; Lee et al. 2012; Shapiro et al. 2000).

Dieser Effekt des PAR1 führte 2015 zur EU-Zulassung eines PAR1-Antagonisten als Thrombozytenaggregationshemmer (Vorapaxar) (Wang 2015).

3.3.2. Kardiorenale Funktion

Bei der Modulation des Gefäßtonus wirken Protease-aktivierte Rezeptoren ebenfalls mit. Alle vier PAR sind in venösen und arteriellen Endothelzellen exprimiert, wobei über die Funktion von PAR3 und PAR4 bisher noch sehr wenig bekannt ist (Shah 2009).

Eine PAR1-Stimulation führt nach einem kurzen Abfall des Blutdrucks zu einer andauernden Hypertonie und einer verringerten Herzfrequenz. PAR1 bewirkt dabei zum einen eine Vasodilatation an der Aorta und den Herzkranzgefäßen und zum anderen eine Vasokonstriktion im restlichen Organismus. Die vasokonstriktorischen Effekte sind durch eine PAR1 abhängige Kontraktion der Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) bedingt (Gui et al. 2003; Shah 2009), welche über einen Kalzium/Calmodulin-regulierten Mechanismus vermittelt werden (El-Daly et al. 2014). Der direkte kontraktile Effekt auf die VSMC scheint jedoch eher unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. Arteriosklerose, eine Rolle zu spielen (Ku et al. 1997). Durch die endotheliale Kontraktion wird zudem die Permeabilität der Gefäßwand reduziert, was ebenfalls zu einem Blutdruckanstieg beiträgt (Vouret-Craviari et al. 2002).

Im Gegensatz zum PAR1 hat eine Stimulation des PAR2 einen überwiegend vasodilatatorischen Effekt, indem es die Kontraktion der Endothelzellen und VSMC aufhebt. Basal scheint PAR2 allerdings keine Auswirkung auf den Gefäßtonus zu haben, da PAR2-knockout-Mäuse (PAR2-KO) einen normalen Blutdruck haben. Der Mechanismus dieses Effekts ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch kann er durch eine kombinierte Inhibition der NO-Synthase und Cyclooxygenase aufgehoben werden. Dies führt zu dem Schluss dass der Mechanismus von NO und Prostaglandinen abhängig zu sein scheint (Cheung et al. 1998; Gui et al. 2003; Robin et al. 2003; Shah 2009).

In den Endothel- und Epithelzellen der Nieren von Menschen und Nagetieren können die Protease-aktivierten Rezeptoren 1, 2 und 4 mittels RT-PCR nachgewiesen werden, wobei die Funktion des PAR4 noch weitestgehend unbekannt ist (D'Andrea et al. 1998; Gui et al. 2003). Die spezifische Aktivierung des Rezeptors mittels Agonistenpeptiden zeigt, dass eine Stimulation von PAR1 eine Vasokonstriktion der Blutgefäße in den Nieren bewirkt. Dadurch

kommt es zu einem Abfall des renalen Blutflusses (RBF) und der GFR. PAR1 scheint colokalisiert zu den reninbildenden JG-Zellen exprimiert zu sein und inhibiert die Reninfreisetzung über einen PAR1-induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den JG-Zellen (Kalzium-Paradoxon) (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011).

Der PAR2 stellt den Gegenspieler des PAR1 dar. In der isoliert perfundierten Niere wird nach einer Stimulation von PAR2 basal kein Effekt beobachtet. Doch hat es bei einer durch ANGII vermittelten Vasokonstriktion einen vasodilatorischen Effekt in den Nieren. Diese PAR2 vermittelten Effekte bringen einen Anstieg des renalen Blutflusses und der GFR mit sich. Des weiteren stimuliert der PAR2 die Synthese und Sekretion von Renin. Da der Rezeptor jedoch nicht colokalisiert, sondern in benachbarten Zellen der JG-Zellen exprimiert wird, geht man hier von einem indirekten Mechanismus aus. Es wird vermutet, dass PAR2 die NO-Konzentration in den afferenten Arteriolen erhöht und dies anschließend zu einer vermehrten Reninfreisetzung führt. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig bekannt (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011).

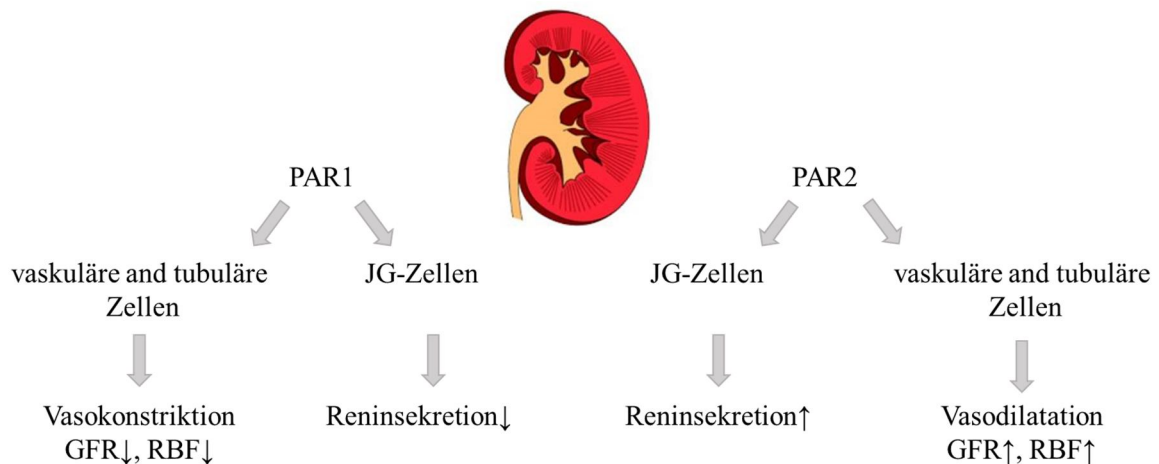


Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktion von PAR1 und PAR2 in der Hämodynamik der Niere

Im Tubulussystem der Niere sind PAR1 und PAR2 ebenfalls exprimiert. Sie scheinen dort einen modulierenden Effekt auf den Elektrolyttransport und somit auf den Salz- und Wasserhaushalt zu haben. So kann die Natriumresorption durch epitheliale Natriumkanäle (ENaC) im distalen Tubulus, Verbindungstubulus und Sammelrohr unter anderem durch Serinproteasen reguliert werden (Chraïbi et al. 1998; Ray et al. 2015; Vallet et al. 1997). Des weiteren wird beschrieben, dass PAR2 an der kalziumabhängigen Chloridsekretion im

renalen Sammelrohr beteiligt ist, indem es einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt (Bertog et al. 1999).

III. ZIELSETZUNG

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein wichtiger Faktor in der Regulation des Blutdrucks und des Salz- und Wasserhaushaltes im Organismus. Eine Dysfunktion des RAAS kann unter anderem Bluthochdruck oder kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben. Die Aktivität des RAAS wird maßgeblich durch die Freisetzung von Renin beeinflusst, da die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I durch die Protease Renin den limitierenden Schritt im RAAS darstellt.

Die Bildung und Freisetzung von Renin in den juxtaglomerulären Zellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen systemischen und lokalen Faktoren reguliert, wie zum Beispiel dem Blutdruck, dem Salz- und Wasserhaushalt und dem sympathischen Nervensystem. *Ex vivo* Untersuchungen an der isoliert perfundierten Niere haben gezeigt, dass eine Aktivierung des PAR1 die Reninsekretion hemmt, wo hingegen eine Aktivierung des PAR2 die Reninfreisetzung stimuliert (Höcherl et al. 2011). Protease-aktivierte Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche durch Proteasen (PAR1, 3 und 4 vorwiegend durch Thrombin, PAR2 unter anderem durch Trypsin und Kallikreine) aktiviert werden. Es sind vier PAR bekannt, wobei PAR3 und PAR4 vorwiegend an den Thrombozyten exprimiert zu sein scheinen (Shah 2009). PAR1 und PAR2 sind in den Nieren exprimiert. Sie scheinen an der Nierendurchblutung, der glomerulären Filtration und dem tubulären Ionenaustausch beteiligt zu sein (Bertog et al. 1999; Gui et al. 2003). Da diese Faktoren wichtige Regulatoren der Reninbildung und -sekretion sind und *ex vivo* bereits ein Zusammenhang von PAR1 und PAR2 mit der Reninfreisetzung gezeigt werden konnte, lässt dies die Vermutung zu, dass die physiologische Reninfreisetzung *in vivo* auch über PAR moduliert werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, an Hand eines Knockout-Modells, die Bedeutung des Protease-aktivierten Rezeptors 2 für die physiologische Regulation der Reninbildung und -sekretion zu evaluieren. Die hierfür durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken im Tierversuchsantrag Az. 54-2532.1- 38/14 genehmigt.

IV. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

1.1. Generierung und Phänotyp der PAR2-knockout-Mäuse

Die PAR2-defizienten Zuchtpärchen wurden über „Jackson Laboratory“ bezogen.

Die PAR2-KO Mauslinie wurde generiert, indem das Zielallel durch die Integration eines Vektors, nach dem Standardprotokoll des Gene-Trapping, unterbrochen wurde. Der Vektor wurde in embryonale Stammzellen (Stamm: 129X1/SvJ) integriert und diese, sofern der Vektor korrekt eingefügt wurde, in Wildtyp-Blastozysten (Stamm: C57BL/6) injiziert. Die daraus entstehenden chimären Mäuse wurden mit 129X1/SvJ-Mäusen gekreuzt, bevor sie homozygot gezüchtet wurden. Die homozygoten Mäuse wurden anschließend mit transgenen Mäusen verpaart, welche das humane F2RL1-Gen tragen, um eine Doppelmutante mit gemischtem genetischen Hintergrund (FVB/N, C57BL/6, 129X1/SvJ) zu erhalten. Diese Doppelmutanten wurden über mindestens fünf Generationen mit C57BL/6-Wildtypen gekreuzt und parallel auf das Zielallel und gegen das humane F2RL1-Gen selektiert. Somit trägt die generierte PAR2-KO Mauslinie (Stamm: B6.Cg-F2rl1tm1Mslb/J) homozygot das ausgeknockte F2RL1-Gen mit einem C57BL/6 Background.

Die PAR2-defizienten Mäuse sind überlebensfähig und fertil. Phänotypisch sind keine spontanen Anomalien festzustellen. Ovalbumin induzierte allergische Reaktionen der Atemwege sind bei den Mutanten signifikant geringer ausgeprägt.

1.2. Zucht und Haltung

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg unter den, von FELASA empfohlenen, Standardbedingungen (Gruppenhaltung; Wasser und Futter ad libitum; Hell-Dunkel-Rhythmus: 12 Stunden; Temperatur: $22 \pm 2^\circ\text{C}$; relative Luftfeuchte: $55 \pm 5\%$). Für die Durchführung der Experimente wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet.

1.3. Genotypisierung

Zur Bestätigung des Genotyps wurden bei den Zuchttieren regelmäßig Genotypisierungen anhand von Schwanzbiopsien durchgeführt.

Der Verdau der Biopsien erfolgte über Nacht bei 56°C in 100 µl Verdaulösung (88 µl H₂O, 10 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl Proteinase K). Anschließend wurden die betreffenden Abschnitte der DNA mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und fotografiert.

Reaktionsansatz für die PCR	
5 µl	5x Go Taq Buffer
0,4 µl	dNTPs
0,5 µl	Primer forward
0,5 µl	Primer reverse
0,2 µl	5U/µl Taq Polymerase
3,0 µl	dd H ₂ O
0,5 µl	DNA

Amplifizierungsprotokoll	
Initiale Denaturierung	
95°C	30 Sek
30 Zyklen	
95°C	30 Sek
59°C	60 Sek
65°C	60 Sek
Final Hold	
65°C	5 Min
10°C	halten

Verwendete Primer für die Genotypisierung:

- WT forward: 5`-TCGTCGGAATGACAACCTGG-3`
- WT reverse: 5`-TCAAAGACTGCTGGTGGTTG-3`
- PAR2-KO forward: 5`-TCTGTTAGCCGACGAGACTA -3`
- PAR2-KO reverse: 5`-GCAGCCAATATGGGATCG-3`

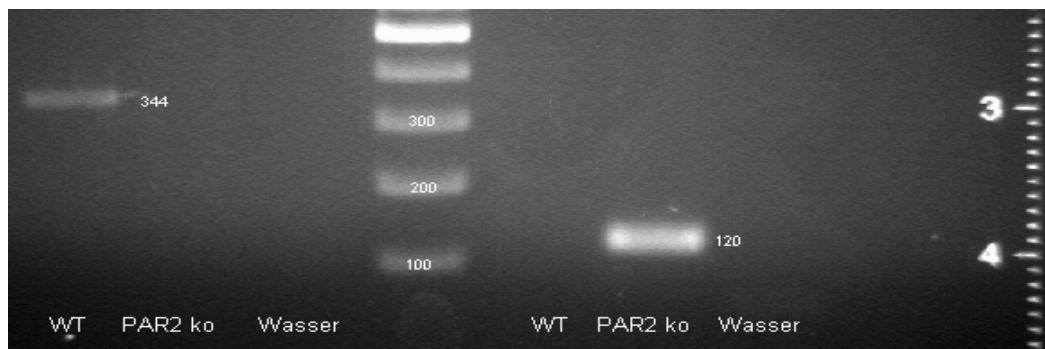


Abb. 5: Genotypisierungs-PCR von PAR2-KO-Mäusen (120 bp) und Wildtyp-Mäusen (344 bp)

2. Material

2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	HV 25, HMC-Europe, Tüßlingen
Blockcycler	Mastercycler, Eppendorf, Hamburg
Blotapparat	Trans Blot SD, Bio Rad Laboratories, München
Computer	ESPRIMO P720, Fujitsu Technology, München
Elektrolytanalysegerät	EasyLyte Na ⁺ /K ⁺ , DiaSys-Greiner, Flacht
Filtersets: Cy2-Filter Cy5 Filter	Filter Set 38, Zeiss, Jena Filter Set 50, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Gel Dokumentation	Gel Doc 2000, Bio Rad Laboratories, München
Gel-Elektrophorese-System	Compact M, Biometra, Göttingen
Homogenisator	Polytron PT 2100, Kinematica, Eschbach
Isofluran-Verdampfer	Groppler Medizintechnik, Deggendorf
Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Labornetzgeräte	Power Pac, Bio Rad Laboratories, München
Lightcycler System	LC480, Roche, Mannheim
Magnetrührer	MR 80, Heidolph Instruments, Schwabach
Mäuse Restrainer	Softron Beijing Biotechnology, Peking, China
Microtom	Rotationsmikrotom, Leica, Wetzlar
Mikroskope	LSM 5 Exciter, Zeiss, Jena

	DMRB, Leica, Wetzlar
Narkosegas Absorber	Fluovac, Harvard Apparatus, Holliston, USA
OP-Besteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin
pH Meter	Education Line, Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	Bio Rad Laboratories, München
Pipettboy	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
Rollschüttler	Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön
Stoffwechselkäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Tail Cuff System	BP-98A, Softron Beijing Biotechnology, Peking, China
Thermoschüttler	Thermomixer, Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA

2.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Butterflykanüle	Becton Dickinson, Heidelberg
Clear bottom 96 well plates	Sigma Aldrich, München
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Eppendorf Reaktionsgefäß	0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf, Hamburg
Falcon Tube	15 ml, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Gewebe- Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaskapillaren, heparinisiert	Brand, Wertheim
Glaswaren	Carl Roth, Karlsruhe

	Schott, Mainz
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Küvette	Hellma Analytics, Müllheim
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Lithiumheparinröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Osmotische Minipumpen	Alzet, Cupertino, CA
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Spritzen	Einmalspritzen 1 ml, Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Sprühpflaster	Johnson & Johnson Medical, Norderstedt
Stabpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Wundklammern	Centre d'Affaires Medical, Montreuil, FR

2.3. Chemikalien und Pharmazeutika

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Aldosteron-ELISA Kit	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Amastatin	Sigma Aldrich, München
ANGI-ELISA Kit	IBL International, Hamburg
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Dimazon (Furosemid)	MSD Sharp & Dohme, Haar
dNTP Mix	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Furosemid	Sigma Aldrich, München
HCl	Sigma Aldrich, München
Hydralazin	Sigma Aldrich, München
Isofluran	Forene, Abbott, Wiesbaden
Isoprobanol	Carl Roth, Karlsruhe

Isoproterenol	Sigma Aldrich, München
Ketamin	Ketavet, Zoetis, Berlin
Kreatinin Assay Kits	BioAssay Systems, Hayward, USA
Losartan	LKT Laboratories, Minnesota, USA
Malleinsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Bio Rad Laboratories, München
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Sigma Aldrich, München
Oligo dT Primer	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
One Taq Quick Load	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, München
PBS	PBS-Puffer (10X Dulbecco's)-Pulver, AppliChem, Darmstadt
Peq Gold TriFast	Peqlab, Darmstadt
Protease und Phosphataseinhibitor	Roche, Mannheim
Sacharose	Sigma Aldrich, München
SLIGRL-NH ₂	Sigma Aldrich, München
SYBR Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TFLLR-NH ₂	Sigma Aldrich, München
Tris Base	Roche, Mannheim
Triton X-100	Sigma Aldrich, München
Urea Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, USA
Xylazin	Rompun, Bayer Health Care, Leverkusen
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

2.4. Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurfins MWG Synthesis, in Ebersberg, bezogen, durch welche sie synthetisiert und lyophilisiert wurden. Durch Rekonstitution mit nucleaserefreiem Wasser wurde eine Primerlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl erstellt.

Folgende Primer wurden verwendet:

ENaC γ forward	5'-TGCAAGCAATCCTGCAGCTTTAAG-3'
ENaC γ reverse	5'-GAAGCCTCAGATGGCCACTGT-3'
GAPDH forward	5'-TTCATTGACCTCAACTACAT-3'
GAPDH reverse	5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTT-3'
PAR1 forward	5'-GTCTTCCC GCGTCCCTAT-3'
PAR1 reverse	5'-GGGTTACCGTAGCATCTGT -3'
PAR2 forward	5'-GGGGATGCGAAGTCTCAG-3'
PAR2 reverse	5'-AGACTTCTTCCTTTACTGTTGTTGC-3'
Renin forward	5'-ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC-3'
Renin reverse	5'-ATGTCGGGGAGGGTGGGCACCTG-3'

2.5. Antikörper

Name	Hersteller
Primärantikörper Westernblot	
Anti- β Aktin	Abcam plc, Cambridge, USA
Mouse Renin 1 AK	R&D Systems Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt
Sekundärantikörper Westernblot	
Donkey-anti-goat	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
Goat-anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
Primärantikörper Immunhistochemie	
Chicken-anti-Renin IgG	Dauids Biotechnologie, Regensburg
Mouse-anti- α -smooth muscle actin	Abcam, Cambridge, USA
Sekundärantikörper Immunhistochemie	
Cy2-conjugated donkey anti-chicken IgG	Dianova, Hamburg
Cy5-conjugated donkey anti-mouse IgG	Dianova, Hamburg

2.6. Futtermittel

Futter	Hersteller
Sniff R/M-H Kontrolle (0,6 %)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Sniff EF R/M Na-arm (0,02 %)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Sniff EF R/M Na-reich (4 %)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

2.7. Software

Software	Hersteller
Office 2013	Microsoft, Redmond, USA
AxioVision	Zeiss, Jena
Photoshop CS5	Adobe, San José, USA
Revelation (Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät)	Dynex Technologies, Denkendorf
Software Tail Cuff System BP-98A	Softron Beijing Biotechnology, Peking, China
Quantity One	Bio Rad Laboratories, München
Graph Pad Prism 6	Graph Pad Software

3. Methoden

3.1. Versuchsdesign

3.1.1. PAR1- und PAR2-Agonisten Versuch

Um die Wirkung der Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 bezüglich der akuten Reninsekretion *in vivo* zu untersuchen, wurden Versuche mit PAR1- und PAR2- Agonisten zur spezifischen Aktivierung der Rezeptoren durchgeführt. Hierfür wurde 8 C57BL/6-Wildtypmäusen einmalig der PAR1-Agonist TFLLR (5 $\mu\text{mol/kg}$ KGW) beziehungsweise 7 Tieren der PAR2-Agonist SLIGRL (5 $\mu\text{mol/kg}$ KGW) in 100 μl isotoner Kochsalzlösung i.p. injiziert. Um den Abbau der Agonisten zu hemmen, wurde der Injektionslösung 25 $\mu\text{mol/kg}$ KG Amastatin, ein Aminopeptidase-Inhibitor, zugefügt (Kawao et al. 2004). Den 8 Kontrolltieren wurde 100 μl reine isotope Kochsalzlösung injiziert. Dropouts waren bei diesem Versuchsaufbau nicht zu erwarten.

Eine Stunde nach Injektion wurde den Tieren bukkal an der Vena facialis Blut entnommen, welches in Heparin benetzten Glaskapillaren aufgefangen und anschließend zentrifugiert wurde, um die Plasmareninkonzentration mit Hilfe eines ELISAs zu bestimmen.

3.1.2. Akute Reninstimulationsversuche

Ob der PAR2 Rezeptor *in vivo* einen Einfluss auf die akute Regulation der Freisetzung von Renin hat, wurde durch eine akute Stimulation der Reninsekretion und anschließende Bestimmung der Plasmareninkonzentration an 26 Wildtypmäusen und 26 PAR2-KO Mäusen im Vergleich evaluiert. Hierfür wurde je Genotyp 5 Tieren Hydralazin (2 mg/kg KG), 4 Tieren Isoproterenol (10 mg/kg KG), 5 Tieren Losartan (3 mg/kg KG) beziehungsweise 4 Tieren Furosemid (40 mg/kg KG) (Kim et al. 2007b) in 100 μl isotoner Kochsalzlösung i.p. injiziert. Eine Kontrollgruppe von 8 Tieren pro Genotyp wurde mit reiner isotoner Kochsalzlösung behandelt. Dropouts waren auch bei diesem Versuchsaufbau nicht zu erwarten.

Die Blutabnahme zur Bestimmung der Plasmareninkonzentration über die Vena facialis erfolgte 60 Minuten nach der Injektion.

3.1.3. Chronische Reninstimulationsversuche

Der Einfluss des PAR2-Rezeptors auf die chronische Regulation der Reninsekretion wurde ebenfalls an Wildtypen und PAR2-defizienten Mäusen im Vergleich untersucht. Dazu wurde

die Reninbildung und -freisetzung auf verschiedene Weise über fünf bis sieben Tage beeinflusst.

Je eine Gruppe von Wildtyp- und Knockout-Mäusen wurde folgenden Therapien unterzogen:

- Normale Salzdiät (0,6 % NaCl) , 49 Wildtyp- und 49 Knockout-Mäuse (Kontrollgruppe)
- Salzarme Diät (0,02 % NaCl) für 7 Tage, 18 Wildtyp- und 17 Knockout-Mäuse (Kim et al. 2007a; Matzdorf et al. 2007)
- Salzreiche Diät (4 % NaCl) für 7 Tage, 10 Wildtyp- und 10 Knockout-Mäuse (Kim et al. 2007a; Matzdorf et al. 2007)
- Furosemid (1,2 mg/Tier*d) über subkutane osmotische Minipumpen für 5 Tage, 6 Wildtyp- und 6 Knockout-Mäuse (Matzdorf et al. 2007)
- Normale Salzdiät und Losartan (30 mg/kg*d) für 7 Tage, 18 Wildtyp- und 18 Knockout-Mäuse (Wolf et al. 1999)
- Salzarme Diät (0,02 % NaCl) und Losartan (30 mg/kg*d) für 7 Tage, 8 Wildtyp- und 8 Knockout-Mäuse (Kim et al. 2007a; Schmid et al. 2013)

Anschließend erfolgte die Bestimmung von Urin- und Trinkmenge mittels Stoffwechselkäfigen und die Analyse von Plasma, Urin und Nierengewebe bezüglich der Reninbildung und -freisetzung und Nierenfunktion. Das Furosemid wurde nur über 5 Tage verabreicht, da bei einer längere Gabe mit erhöhten Dropouts, auf Grund der massiven Wasserausscheidung, zu rechnen gewesen wäre und bereits nach 5 Tagen ein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar war. Während der anderen Versuche waren keine Dropouts zu erwarten.

3.1.4. Stoffwechselkäfigexperimente

Zur Ermittlung der Trink- und Urinvolumina verbrachten die Tiere 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig, welcher das selektive Auffangen von Urin und Kot ermöglicht. Zur Stressreduktion auf Grund der sozialen Isolierung und ungewohnten Umgebung wurden die Tiere zuvor 48 Stunden an die Käfige gewöhnt. Futter und Wasser standen zur freien Verfügung und die Tiere unterstanden einer täglichen Verfassungs- und Gewichtskontrolle.



Abb. 6: Stoffwechselkäfig für einzelne Mäuse

3.1.5. Osmotische Minipumpen

Um einen kontinuierlichen Plasmaspiegel zu gewährleisten, erfolgte die chronische Furosemidgabe über osmotische Minipumpen, welche subkutan eingesetzt wurden. Dazu wurden die osmotischen Minipumpen mit Furosemid (50 mg/ml) befüllt und in isotone Kochsalzlösung eingelegt, bis sich eine gleichmäßige Abgabe des Wirkstoffs von 1 $\mu\text{l/h}$ eingestellt hatte. Unter Isoflurannarkose wurde auf Höhe des ersten Halswirbels die Haut mit einer ca. 1 cm langen Incision eröffnet und mit einem Spatel subkutan stumpf ein Hohlraum präpariert, in welchem die osmotische Minipumpe platziert wurde. Anschließend wurde der Hautschnitt mittels Wundklammern und Sprühpflaster verschlossen.

3.2. Plasma- und Urinanalyse

3.2.1. Plasmareninkonzentration

Zur Bestimmung der Plasmareninkonzentration wurde den Tieren bukkal an der Vena facialis Blut entnommen. Mit Hilfe eines Fixiergriffs im Nacken der Mäuse wurden diese fixiert und gleichzeitig die Vene gestaut. Diese wurde mit einer 20 G Kanüle ca. 1 mm kaudodorsal des Haarwirbels am Unterkiefer der Maus punktiert, das Blut mit heparinisierten 75 μl Glaskapillaren aufgefangen und in diesen 10 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde 1:250 mit Maleatpuffer (Tris 2,03 g, Malleinsäure 2,9 g, EDTA 1,48 g, H_2O ad 0,5 l, NaOH auf pH 6 eingestellt) verdünnt.

Die Plasmareninaktivität wurde bestimmt, indem die Menge an Angiotensin I gemessen wurde, welche innerhalb 90 Minuten von dem im Plasma befindlichem Renin umgesetzt wurde. Hierzu wurde je Probe ein Ansatz bei 37 °C und ein weiterer identischer Ansatz bei

0°C für 90 Minuten inkubiert und anschließend die ANGI-Konzentration mittels eines ELISA quantitativ bestimmt.

Versuchsschritt ELISA	Pipettierschema
Probenvorbereitung	99 µl Probe + 2 µl PMSF+ 15 µl Generation Buffer+ 42 µl Reninsubstrat (Angiotensinogen)
Inkubation	Je Probe 1x 37°C und 1x 0°C für 90 Min
Auftragen auf Mikrotiterplatte	50 µl Standard bzw. Probenansatz + 100 µl ANGI-Biotin-Konjugat in je ein Well, 60 Min im Dunkeln inkubieren
Waschen	Mikrotiterplatte 5x mit Waschpuffer waschen
Sekundären konjugierten AK zugeben	150µl Streptavidin-HRP je Well, 30 Min im Dunkeln inkubieren
Waschen	Wellplate 5x mit Waschpuffer waschen
Farbreaktion eines Substrats	150 µl TMB-Suorat je Well, 15 Min im Dunkeln inkubieren
Reaktionsabbruch, Messen	+50µl Stopping Solution pro Well, OD bei 450 nm messen

Die Angiotensin I-Konzentration der Probenansätze konnte anhand der Standardkurve abgelesen werden. Der 0°C-Wert wird als Nullwert vom 37°C-Wert subtrahiert und durch die Inkubationszeit in Stunden dividiert. Mit dem von der Firma vorgegebenen Faktor 1,11 multipliziert, erhält man die Plasmareninaktivität.

$$PRA = \left[\frac{\text{AngI (37°C)} - \text{AngI (0°C)}}{\text{Time (Std)}} \right] \times 1,11$$

Da das Substrat Angiotensinogen im Überfluss vorhanden ist und somit die Reninkonzentration den einzigen limitierenden Faktor darstellt, kann die Plasmareninaktivität mit der Plasmareninkonzentration gleichgesetzt werden.

3.2.2. Plasmaaldosteronkonzentration

Die Plasmaaldosteronbestimmung erfolgte durch einen direkten ELISA.

Nach Versuchsende wurden die Versuchstiere unter Isoflurannarkose dekapitiert und das Blut in, mit Lithiumheparin versehene, Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurde das Blut für 10 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert und das Plasma in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Zur Bestimmung der Aldosteronkonzentration mittels ELISA wurden die Proben nach Standardbedingungen 1:2 verdünnt und nach folgendem Pipettierschema auf die beschichtete Multiwellplatte aufgetragen:

Well	ELISA Puffer	Standard/ Proben	Aldosteron AChE-Tracer	Aldosteron Polyclonal Antiserum
Blank	-	-	-	-
Unspezifische Bindungen	150 µl	-	50 µl	-
Maximale Bindung	100 µl	-	50 µl	-
Standard/Proben	-	100 µl	50 µl	50 µl

Nach 18 Stunden Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Platte gewaschen. Anschließend wurden pro Well 200 µl Ellman's Reagenz zugegeben und die Platte erneut 90-120 Minuten inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 405 nm gemessen, die OD-Werte der Standards und Proben ins Verhältnis zur Optischen Dichte der Maximalen Bindung ($\% B_{\text{Probe}} / B_{\text{Max}}$) gesetzt und anschließend die Konzentrationen mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.

3.2.3. Plasma- und Urinelektrolyte

Die Natrium- und Kaliumkonzentration in Plasma und Urin wurde mit Hilfe eines Elektrolytanalysegerätes bestimmt.

Da das Analysegerät für die Analyse von Proben menschlichen Ursprungs vorgesehen ist, wurden die Proben für die Messungen wie folgt verdünnt:

- Plasma: Verdünnung 1:5, Gesamtvolumen 300 µl
- Urin: Verdünnung 1:10, Gesamtvolumen 1000 µl

- Urin (Niedrigsalzdiät): Unverdünnt, Gesamtvolumen 1000 μ l

Die Messwerte der Proben wurden folgendermaßen korrigiert:

- Plasma: Die Messwerte wurden mit Verdünnungsfaktor multipliziert
- Urin: Die Messwerte wurden automatisch mit dem Faktor 10 multipliziert
- Urin (Niedrigsalzdiät): Die automatische Multiplikation durch das Gerät musste durch die Division mit dem Faktor 10 korrigiert werden

3.2.4. Osmolarität von Plasma und Urin

Die Bestimmung der Osmolarität von Plasma und Urin erfolgte mittels der Gefrierpunkterniedrigung. Hierbei kann die Osmolarität anhand des veränderten Gefrierpunktes von wässrigen Lösungen im Vergleich zu reinem Wasser direkt bestimmt werden.

Das Probenvolumen von 50 μ l wurde durch den Osmomat heruntergekühlt und anschließend ein Eiskristall erzeugt. Die Osmolarität wurde automatisch durch die Verzögerung des Gefrierpunktes bestimmt. Die Urinproben wurden für dieses Verfahren 1:2 mit ddH₂O verdünnt.

3.2.5. Hämatokrit

Der Hämatokrit kann anhand einer Schablone von heparinisierten Glaskapillaren abgelesen werden, nachdem Plasma und Zellen durch Zentrifugation (10 Minuten bei 9000 rpm) voneinander getrennt wurden. Die Blutabnahme erfolgte durch Punktion der Vena facialis mit einer 20 G-Kanüle.

3.3. Glomeruläre Filtration

3.3.1. Ureakonzentration

Die Ureakonzentration in Plasma und Urin kann mittels Farbreaktion ermittelt werden. Das in der Reaktionslösung enthaltene chromogene Substrat bildet spezifisch mit Urea einen farbigen Komplex, was zu einem Farbumschlag der vorgefärbten Reagenzlösung führt. Die Intensität des Farbumschlages nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde bei 520 nm photometrisch gemessen und in Bezug zu einer Standardkonzentration (50 mg/dl Urea) berechnet.

Da die erwarteten Ureakonzentrationen in Plasma und Urin deutlich über der des Standards lagen, wurden die Plasmaproben 1:5 und die Urinproben 1:250 verdünnt. Die Ergebnisse wurden im Anschluss mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert.

3.3.2. Kreatininkonzentration Plasma

Zur Berechnung der Kreatininkonzentration im Plasma wurde ebenfalls ein kolorimetrischer Test verwendet. Nach Verdünnung einer Standardreihe von 4 mg/dl, 2 mg/dl, 1 mg/dl und 0,5 mg/dl Kreatinin wurde je Standard und Probe 25 µl mit je 25 µl Diluent für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 100 µl Kreatininreagenz zugegeben, welche ein kolorimetrisches Substrat enthält. Die optische Dichte wurde zweimal im Abstand von 30 Minuten gemessen und die Differenz der beiden Messungen errechnet. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der linearen Standardgeraden ausgewertet.

3.3.3. Kreatininkonzentration Urin

Auch die Ermittlung der Kreatininkonzentration im Urin erfolgte durch eine kolorimetrische Reaktion eines chromogenen Substrats, welches spezifisch an Kreatinin bindet und somit einen farbigen Komplex bildet. Die Intensität der Färbung unmittelbar nach Reaktionsbeginn und nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde bei 520 nm photometrisch gemessen. Die Differenz der gemessenen optischen Dichte zu den beiden Zeitpunkten wurde in Bezug zur Farbveränderung einer Standardlösung (2 mg/dl Kreatinin) mit folgender Formel berechnet:

$$[\text{Kreatinin}] = \frac{\text{OD}(\text{Probe 5 Min}) - \text{OD}(\text{Probe 0 Min})}{\text{OD}(\text{Standard 5 Min}) - \text{OD}(\text{Standard 0 Min})}$$

3.3.4. Berechnung der Kreatininclearance

Die Kreatininclearance ist ein Parameter zur Beurteilung der GFR. Zur Berechnung wurde die Kreatininausscheidung in 24 Stunden (Kreatininkonzentration im Urin multipliziert mit dem Volumen des 24 Stunden-Sammelurins) durch die Plasmakreatininkonzentration, das Körpergewicht und dem Faktor 1440 dividiert. Der Faktor 1440 stellt die Anzahl der Minuten eines 24-Stunden-Tages dar, sodass die berechnete Kreatininclearance in µl/min*gKG dargestellt wird.

$$\text{Kreatinin clearance} = \frac{\text{Kreatinin(Urin)} \times \text{Urinvolumen(24 Std)}}{\text{Kreatinin(Plasma)} \times 1440 \times \text{Körpergewicht}}$$

3.4. Blutdruckmessung

Die Herzfrequenz und der systolische Blutdruck wurden nicht-invasiv mit der „Tail-Cuff-Methode“ ermittelt. Die Mäuse waren in einem Restraîner fixiert und wurden einer zehnmütigen Aufwärmphase bei 37 °C unterzogen. Dies führte zur Dilatation der Blutgefäße und Reduktion des Stresslevels durch das Handling und die Fixierung. Durch Kompression der Schwanzarterien auf Höhe der Schwanzwurzel mit Hilfe einer aufblasbaren Manschette wurde der Blutfluss unterbunden. Distal der Manschette war ein Drucksensor platziert, welcher den Blutstrom in der Arterie maß. Anschließend verringerte sich der Druck der Manschette kontinuierlich, bis er unterhalb des systolischen Blutdrucks fiel und während der Systole ein Blutstrom in der Arterie detektiert werden konnte. Diese Werte wurden durch den Rechner aufgezeichnet. Des Weiteren wurde die Herzfrequenz vor der Kompression ermittelt und aufgezeichnet.

Zur Reduktion des stressbedingten Fehlers wurden die Tiere über 3 Tage an die Methode gewöhnt und anschließend drei Messungen pro Tier ausgewertet und ein Mittelwert daraus gebildet.

3.5. Immunhistochemie

Für die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Nieren zunächst mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert, um eine postmortale Veränderung des Gewebes zu verhindern. Dazu wurden die zu untersuchenden Tiere mit einer Kombinationsnarkose (Ketamin 120 mg/kg, Xylazin 16 mg/kg i.p.) euthanasiert. Nach Erlöschen des „Zwischenzehenreflexes“ wurde das Abdomen medial eröffnet. Anschließend wurde die Aorta abdominalis freipräpariert und distal des Abgangs der Arteria renalis mit einer Butterflykanüle katheterisiert. Die Vena femoralis wurde inzidiert, damit die Perfusionslösung dort austreten kann. Die Nieren wurden daraufhin mit 20 ml eines Saccharose-PBS-Puffers (330 mosm, pH=7,4) vorperfundiert, um die Blutbestandteile vollständig aus dem Gefäßsystem herauszuspülen und anschließend mit einer 3%igen PFA-PBS-Lösung (pH=7) fixiert. Die fixierten Nieren wurden vorsichtig entnommen, mit einer Rasierklinge halbiert, jede Nierenhälfte in eine Gewebe-Einbettkassette gegeben und über Nacht nochmals in eine 3%ige PFA-PBS-Lösung eingelegt.

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Nieren zunächst in einer Alkoholreihe mit zunehmender Alkoholkonzentration (2 x 70 %, 2 x 80 %, 2 x 90 %, 2 x 100 %, je 30 Minuten) dehydriert und dann nach folgendem Protokoll in Paraffin eingebettet:

- Inkubation in Isopropanol 3 Mal für je 30 Minuten (letzte Inkubation bei 45 °C)
- Inkubation in Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1:1) für 30 Minuten bei 55 °C
- Inkubation in Paraffin I (60°C) für 24 h
- Inkubation in Paraffin II (60°C) für 24 h
- Einbettung in Paraffin III (60°C) in Silikon-Kautschuk-Einbettformen
- Abkühlung und Aushärtung bei RT im Wasserbad

Nachdem aus den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht worden waren, wurden diese zweimal je 15 min in 100 % Xylol deparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte 1 Minute in 100 %igem Isopropanol und danach mehrmals in 96 %, 80 % und 70 %iges Isopropanol und letztendlich in H₂O getaucht, um sie zu rehydrieren. Die endogene Peroxidase wurde daraufhin 3 mal 5 Minuten bei RT in PBS blockiert und die Schnitte zur Reduktion von unspezifischen Bindungen 20 Minuten in einer Blockierlösung (Magermilch 5 %) inkubiert. Der primäre unkonjugierte Antikörper, welcher gegen das Antigen im fixierten Gewebe gerichtet ist, wurde mit der Blockierlösung verdünnt und die Schnitte darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten in Blockierlösung wurde der sekundäre Antikörper, ein fluoreszierenden Antikörper, der an den Fc-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers bindet, ebenfalls mit der Blockierlösung verdünnt und mit der Pipette aufgetragen. Nach 90 minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Antikörperlösung abgesaugt, die Schnitte drei Mal in PBS gewaschen und mit einem Deckglas versehen.

Verwendete Antikörper:

- Primäre Antikörper:
 - Chicken-anti-renin IgG (1:400 Verdünnung) (Wagner et al., 2009)
 - Mouse-anti- α -smooth muscle actin IgG (1:400 Verdünnung) (Wagner et al., 2009)
- Sekundäre Antikörper

- TRITC-conjugated donkey-anti-chicken IgG (1:400 Verdünnung) (Wagner et al. 2009)
- Cy5-conjugated donkey-anti-mouse IgG (1:400 Verdünnung) (Wagner et al. 2009)

Abschließend wurden die Schnitte mit einem konfokalen Mikroskop betrachtet und fotografiert.

3.6. RT-PCR

Das mRNA-Verhältnis im Nierengewebe wurde mit Hilfe der Real Time PCR bestimmt. Hierzu wurden den Versuchstieren nach Versuchsende unter Isoflurannarkose die Nieren entnommen und zonal in Nierenrinde, Mark und Papille aufgetrennt. Die Proben wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C aufbewahrt.

Die Isolation der RNA erfolgte mit Trizol, einer Phenol- und Guanidinisothiocyanat-haltigen Lösung. Das Nierenrindengewebe wurde in Trizol (1ml) homogenisiert, nach 5-minütiger Inkubation mit 0,2 ml Chloroform versetzt und erneut für 10 Minuten inkubiert. Nach Trennung der Phasen (Rote Phenol-Chloroform-Phase – Interphase – Wässrige Phase) durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1200 G), wurde die wässrige, RNA-haltige Phase in ein vorgekühltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und erneuter Inkubation von 10-15 Minuten bei 4 °C zur Fällung der RNA, wurden die Proben für 10 Minuten bei 12000 G zentrifugiert. Woraufhin sich das gallertartige RNA-Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes absetzte. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit Ethanol gewaschen und anschließend zur weiteren Verwendung in 200-250 µl RNase freiem Wasser gelöst und in einem Spektrophotometer bei 260 nm und 280 nm quantifiziert. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte im unmittelbaren Anschluss nach folgendem Protokoll.

- Je Probe ein 10 µl Ansatz für die cDNA-Synthese

1 µg entspr. µl	RNA (absolut)
1 µl	Oligo-(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg / µl)
add 10 µl	RNase & DNase freies Milliporewasser

- Anschließend wurden die RNA und Primer 5 min bei 65°C denaturiert, und dann sofort auf Eis gestellt

- Je 10 μl -Ansatz wurde ein Mastermix mit folgender Zusammensetzung zugefügt:

1 μl	M-MLV Reverse Transkriptase (100 U)
4 μl	5x Puffer
1 μl	dNTPs (10 mM)
4 μl	RNAse & DNAse freies Milliporewasser

- Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37°C für 1 h
- Ein Temperaturanstieg für 2 min auf 95°C führt zur Deaktivierung der Transkriptase und somit zu einem Reaktionsabbruch.
- Für die quantitative PCR wurde die cDNA mit 30 μl RNAse & DNAse freies Milliporewasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

Mit Hilfe der cDNA wurde mit dem Lightcycler-System LC480 eine quantitative Realtime PCR zur Bestimmung des relativen Verhältnisses von Renin zu GAPDH durchgeführt. Bei Synthese der DNA wird hierbei ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) eingefügt, wodurch die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge zunimmt und so indirekt nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt werden kann. Der exponentielle Verlauf der Reaktion wird somit in Echtzeit (real time) wiedergegeben.

Die 10 μl -Ansätze für die RT-PCR wurden wie folgt in Multititerplatten angesetzt:

5 μl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0,25 μl	sense Primer (5 pmol / μl)
0,25 μl	antisense Primer (5 pmol / μl)
3,5 μl	dd H ₂ O
1 μl	cDNA

Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	10 Min	Aktivierung
40	95°C	15 Sek	Denaturierung
40	58°C	20 Sek	Annealing
40	72°C	20 Sek	Elongation

Am Ende der RT-PCR wurden die Ansätze mit einer Anstiegsgeschwindigkeit von 0,11 °C/s auf 95°C erhitzt, wobei die Abnahme der Fluoreszenz durch die Denaturierung der Produkte

kontinuierlich gemessen wurde. Die daraus entstandenen Schmelzkurven lassen eine Kontrolle der Primerfunktion und eventueller Verunreinigungen zu.

3.7. Statistik

Zur Auswertung der Daten und Erstellung von Diagrammen wurde Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 6 verwendet.

Die Kalkulation der Daten erfolgte als Mittelwert \pm SEM und die Prüfung auf statistische Mittelwertunterschiede über Einstichproben- bzw. Zweistichproben-t-Tests wobei p (Irrtumswahrscheinlichkeit) für $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde.

V. ERGEBNISSE

1. Agonistenversuche

1.1. Plasmareninkonzentration

Um die Beeinflussung der Reninsekretion durch PAR1 und PAR2 *in vivo* zu bestimmen, wurden die Versuchstiere mit selektiven agonistischen Peptiden behandelt. Es zeigte sich, dass eine Stimulation des PAR1 mit TFLLR einen signifikanten Abfall ($p=0,04$) der PRC von 334 ± 70 ng ANGI/h*ml auf 155 ± 18 ng ANGI/h*ml bedingt, während eine Stimulation des PAR2 mit SLIGRL einen signifikanten Anstieg auf 864 ± 38 ng ANGI/h*ml ($p<0,01$) verursachte.

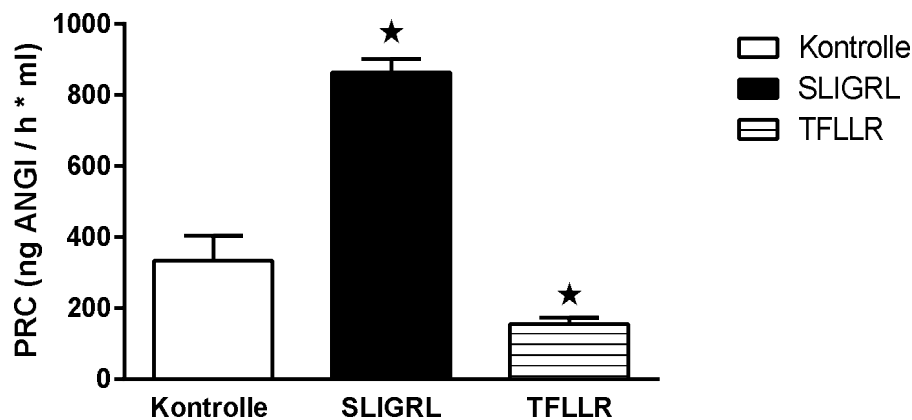


Abb. 7: Plasmareninkonzentration (PRC) nach Stimulation des PAR1 oder PAR2 mit den spezifischen agonistischen Peptiden TFLLR bzw. SLIGRL. Die Daten stammen von 23 Wildtyp-Mäusen, wovon 8 mit NaCl, 7 mit TFLLR und 8 mit SLIGRL behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$.

2. Charakterisierung von PAR2-KO-Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche an global PAR2-defizienten Mäusen durchgeführt. Zunächst wurden die Reninsekretion und die Nierenfunktion der PAR2-defizienten Tiere charakterisiert.

2.1. Renin

Nachdem die Stimulation des PAR2 mittels eines spezifischen Agonisten zu einem signifikanten Anstieg der Reninsekretion geführt hat, wurde untersucht, ob die basale Reninkonzentration in Abwesenheit eines funktionsfähigen PAR2 verändert ist.

2.1.1. Plasmenreninkonzentration

Die basale Plasmenreninkonzentration wurde anhand der Umsetzung von Angiotensinogen zu ANGI durch Renin innerhalb eines festgelegten Zeitraumes bestimmt. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (WT: 101 ± 14 ngANGI/h*ml, n=34; PAR2-KO: 100 ± 12 ngANGI/h*ml, n=33; p=0,96). Die basale Reninsekretion scheint deshalb nicht vom PAR2 beeinflusst zu werden.

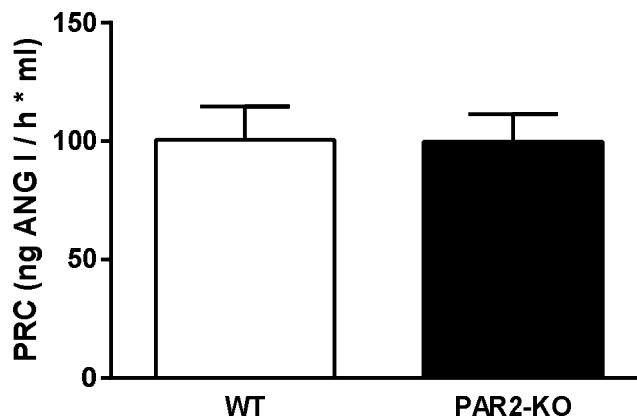


Abb. 8: Plasmenreninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Mäusen. Die Daten stammen von 34 WT und 33 PAR2-KOs. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.1.2. Renin mRNA

Nachfolgend wurde die mRNA-Expression von Renin in der Nierenrinde bestimmt. Auch in der Genexpression von Renin zeigte sich kein Unterschied (p=0,92) zwischen Wildtypen (100 ± 8 %; n=29) und PAR2-KO-Mäusen (99 ± 12 %; n=27).

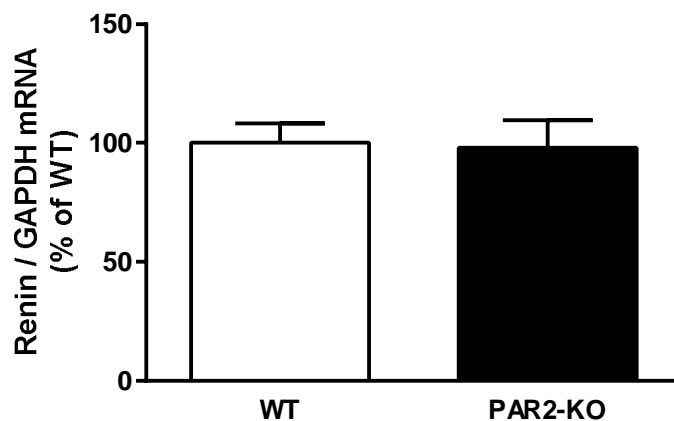


Abb. 9: Renin mRNA-Expression von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Mäusen. Es wurden 29 WT und 27 PAR2-KOs analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.1.3. Immunhistochemie

Die Lokalisation von Renin konnte anhand einer immunhistochemischen Darstellung der Niere gezeigt werden. Bei beiden Genotypen waren die reninbildenden Zellen am Gefäßpol der Niere entlang der Vas afferens lokalisiert. Eine quantitative Aussage lässt sich anhand eines Schnittes nicht treffen. Es lassen sich jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Reninmenge erkennen.

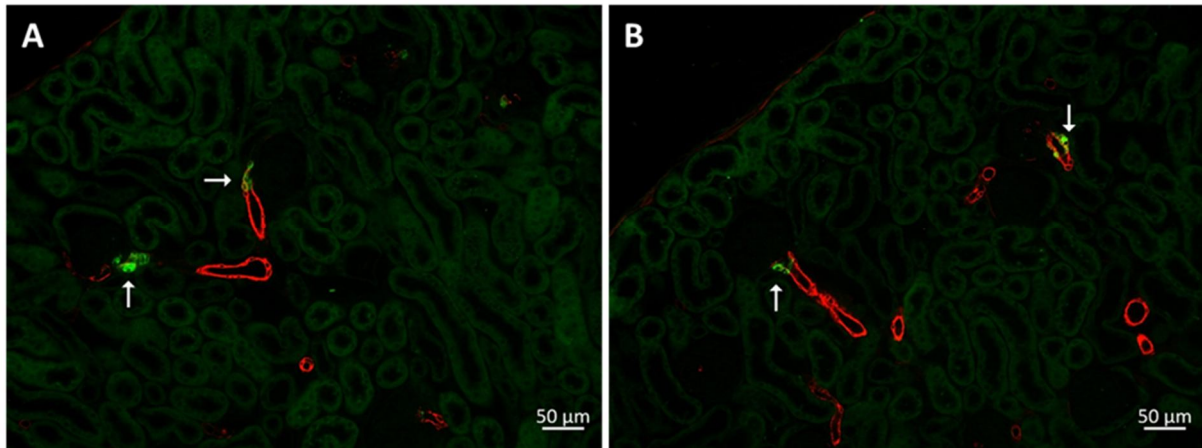


Abb. 10: Immunhistochemische Färbung der Niere für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). A zeigt eine Wildtypniere und B die Niere eines PAR2-KO. Pfeil: Reninpositive Zellen entlang der Arteriolen.

2.2. Kardiovaskulär

2.2.1. Systolischer Blutdruck

Da für PAR2 ein vasodilatatorischer Effekt beschrieben ist, wurde der systolische Blutdruck von WT und PAR2 an wachen Tieren mittels der Tail-Cuff-Methode gemessen. Der Blutdruck ist außerdem ein wichtiger Parameter, der die Reninfreisetzung beeinflussen kann. Es wurden, nach einer Gewöhnung an den Messablauf, je Maus drei Messungen durchgeführt und daraus ein Mittelwert errechnet. Die Messungen ergaben für Wildtypen einen systolischen Blutdruck von 118 ± 3 mmHg (n=9) und für PAR2-KO-Tiere einen systolischen Blutdruck von 120 ± 3 mmHg (n=8). Beide Genotypen weisen somit basal einen vergleichbaren Blutdruck auf (p=0,28).

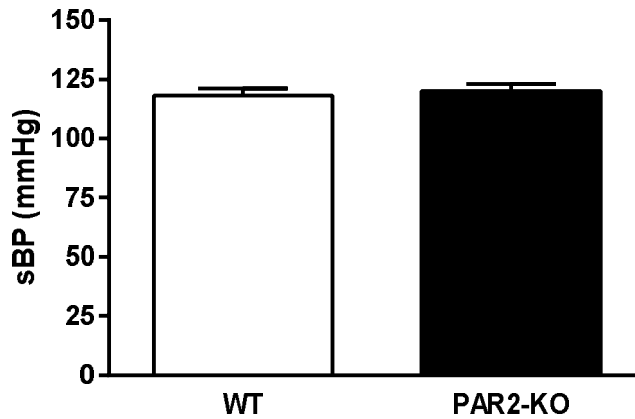


Abb. 11: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Tieren. Es wurde der Blutdruck von 9 WT- und 8 PAR2-KO-Mäusen je 3x gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

2.2.2. Herzfrequenz

PAR2 ist in Kardiomyozyten exprimiert (Ide et al. 2007). Um eine direkte Beteiligung des PAR2 an der Herzfrequenz zu untersuchen und um starke Abweichungen des Blutdrucks durch Stress auszuschließen, wurde die Herzfrequenz bei der Messung des systolischen Blutdrucks miterfasst. Die Werte waren vergleichbar und bewegten sich in einem physiologischen Rahmen (WT: 570 ± 27 bpm, $n=9$; PAR2-KO: 498 ± 49 bpm, $n=8$; $p=0,44$). Auch hier scheint der PAR2 basal keine Rolle zu spielen und eine relevante Verfälschung der Messung durch Stress kann ausgeschlossen werden.

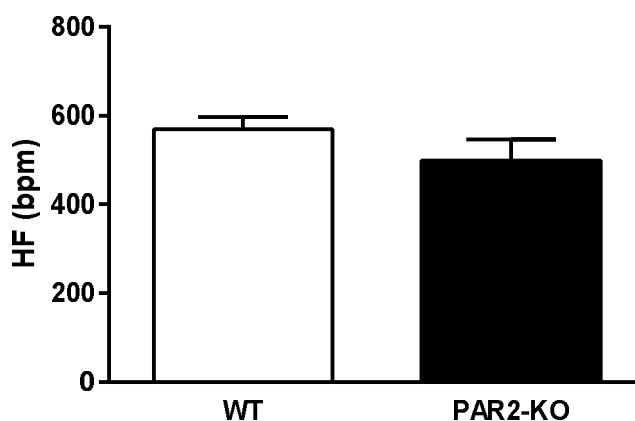


Abb. 12: Herzfrequenz von WT und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

2.3. Nierenfunktion

Eine Stimulation des PAR2 bedingt in der isoliert perfundierten Niere einen Anstieg des renalen Blutflusses und der GFR. Daher wurden typische Parameter, welche eine Aussage über die Nierenfunktion zulassen, bei Wildtypen und PAR2-KOs gemessen.

2.3.1. Kreatininkonzentration

Kreatinin ist ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt. Steigt die Plasmakonzentration von Kreatinin an, lässt dies auf eine verringerte GFR schließen. Die Plasmakreatininkonzentration wurde mittels eines kolorimetrischen Tests ermittelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,23$) zwischen der Plasmakreatininkonzentration von Wildtypen ($0,81 \pm 0,05$ mg/dL, $n=27$) und PAR2-KOs ($0,88 \pm 0,05$ mg/dL, $n=26$) festgestellt werden. Die GFR scheint in Abwesenheit eines funktionsfähigen PAR2 unter Normalbedingungen nicht beeinträchtigt zu sein.

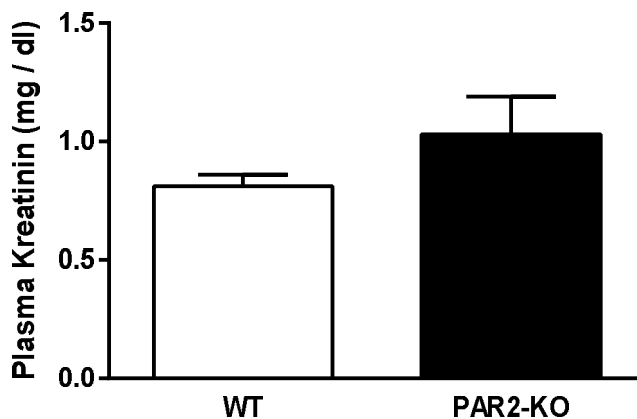


Abb. 13: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten wurden von je 27 Tieren erhoben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.3.2. Ureakonzentration

Die Ureakonzentration im Plasma ist ebenfalls ein Indikator für eine Nierenfunktionsstörung. Wie Kreatinin ist Urea ebenfalls ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt, dessen verminderte Ausscheidung auf eine verringerte GFR schließen lässt. Eine kolorimetrische Messung der Plasmaureakonzentration ergab keinen Unterschied zwischen den Genotypen (WT: $77,2 \pm 5,5$ mg/dl; PAR2-KO: $77,6 \pm 4,6$ mg/dl; je $n=27$; $p=0,96$). Das Ergebnis bestätigt die Befunde der Plasmakreatininmessung, dass die GFR *in vivo* unter Normalbedingungen scheinbar nicht von PAR2 beeinflusst wird.

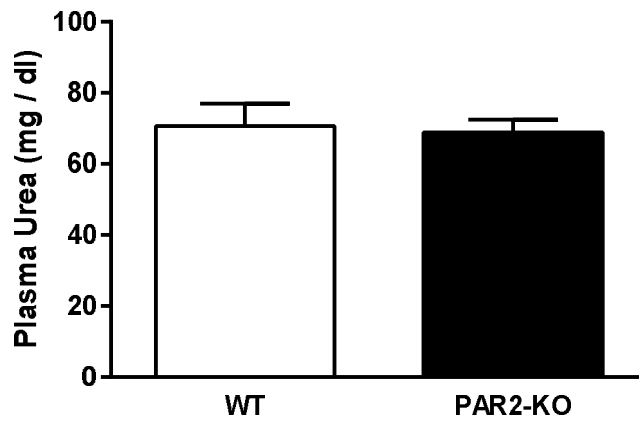


Abb. 14: Plasmaureakonzentrationen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden pro Genotyp 27 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4. Urinexkretion und Trinkverhalten

2.4.1. Urinvolumen

Der Urin wurde in einem Stoffwechselkäfig an drei aufeinander folgenden Tagen über je 24 Stunden gesammelt. Sowohl WT ($1,06 \pm 0,08$ ml/24h; n=49) als auch PAR2-KOs ($1,08 \pm 0,08$ ml/24h; n=49) schieden ein vergleichbares ($p=0,89$) Urinvolumen aus.

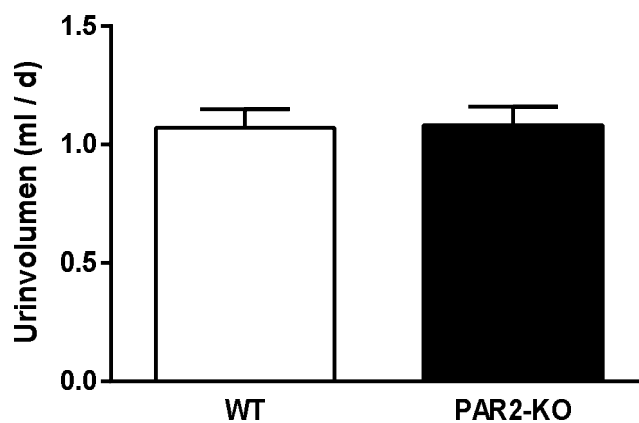


Abb. 15: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Gruppe 49 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4.2. Trinkvolumen

Um auszuschließen, dass nicht Unterschiede im Trinkverhalten zu verfälschten Urinvolumina führten, wurden die 24 Stunden-Trinkvolumina bei den Stoffwechselkäfig-

Versuchen mitbestimmt. Auch hier waren die Trinkmengen der Genotypen vergleichbar (WT: $5,9 \pm 0,2$ ml/24h; PAR2-KO: $6,0 \pm 0,2$ ml/24h; je n=49; p=0,85)

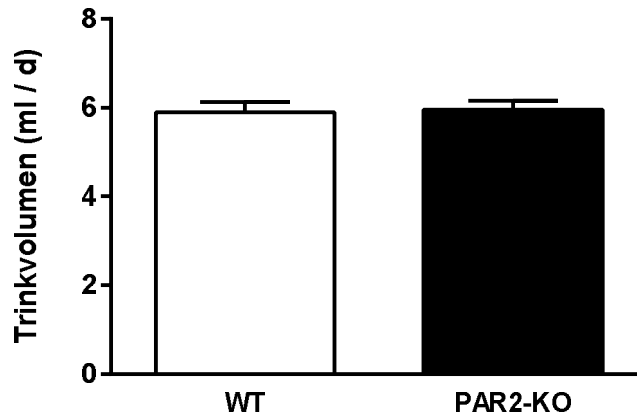


Abb. 16: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Gruppe 49 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4.3. Osmolarität

2.4.3.1. Plasmaosmolarität

Die Plasmaosmolarität wird physiologisch in einem sehr engen Rahmen kontrolliert. Eine Veränderung der Plasmaosmolarität könnte eine Folge einer Dysfunktion in der Resorbierfähigkeit der Niere, eines massiven Wasserverlustes über andere Wege oder einer sehr geringen Wasseraufnahme sein. Die Plasmaosmolarität der Versuchstiere war für beide Genotypen vergleichbar, wie in der folgenden Tabelle zu sehen ist.

	WT	PAR2-KO	p-Wert
Plasmaosmolarität [osmol/kg]	$0,322 \pm 0,005$ (n=30)	$0,324 \pm 0,006$ (n=26)	0,77

Tab. 4: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4.3.2. Urinosmolarität

Die Urinosmolarität lässt Rückschlüsse auf die Konzentrationsfähigkeit der Niere und die Kapazität der renalen Natriumreabsorption zu. Sie wurde mittels Gefrierpunktniedrigung aus dem in den Stoffwechselkäfigen aufgefangenen Urin bestimmt. Auch hier war kein Unterschied (p=0,85) zwischen WT ($3,6 \pm 0,2$ osmol/kg; n=27) und PAR2-KO-Mäusen ($3,5 \pm 0,2$ osmol/kg; n=27) festzustellen.

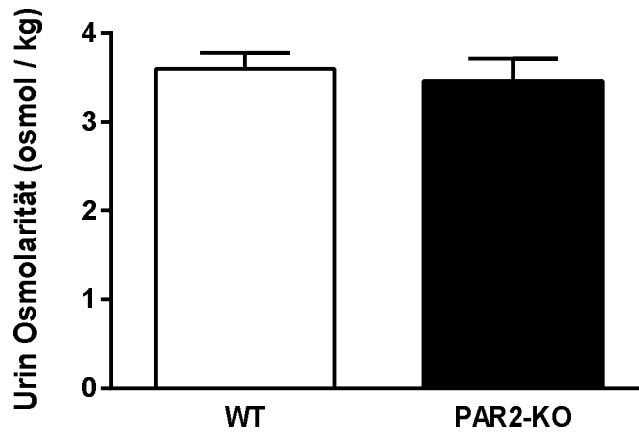


Abb. 17: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten stammen von je 27 Tieren pro Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4.4. Hämatokrit

Wie die Plasmaosmolarität, ist auch der Hämatokrit ein Indikator dafür, ob die Mäuse ausreichend hydriert waren und die Nieren fähig sind, den Wasserhaushalt im Organismus aufrecht zu erhalten. Beide Genotypen wiesen einen physiologischen Hämatokrit (WT: $47,8 \pm 0,3$ %, $n=41$; PAR2-KO: $47,3 \pm 0,2$ %, $n=39$) auf, der sich nicht voneinander unterschied ($p=0,16$).

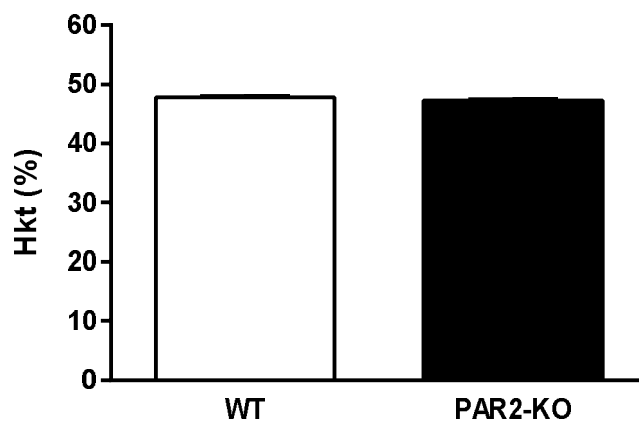


Abb. 18: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten stammen von 41 WT- und 39 PAR2-KO-Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

2.5. Elektrolyte

Da der PAR2 auch im distalen Tubulus und Sammelrohr exprimiert ist und ein modulierender Einfluss auf die Elektrolytresorption beschrieben ist, wurden die Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma und deren Ausscheidung im 24 Stunden-Urin bei WT und KOs mittels eines Elektrolytanalysegerätes bestimmt.

2.5.1. Plasmaelektrolyte

Die gemessenen Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere befanden sich bei beiden Genotypen im Referenzbereich und wiesen, wie der folgenden Tabelle entnommen werden kann, keine Unterschiede auf.

	WT	PAR2-KO	p-Wert
Na ⁺ [mmol/l]	130,6 ± 3,0 (n=30)	131,7 ± 3,2 (n=27)	0,81
K ⁺ [mmol/l]	6,30 ± 0,30 (n=28)	6,66 ± 0,26 (n=26)	0,38

Tab. 5: Natrium (Na⁺)- und Kalium (K⁺)-Konzentration im Plasma von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

2.5.2. Elektrolytausscheidung im Urin

Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,31$) in der Na⁺-Ausscheidung von Wildtypen ($119,9 \pm 7,6 \mu\text{mol/d}$; $n=43$) und PAR2-KOs ($130,5 \pm 7,4 \mu\text{mol/d}$; $n=43$) festgestellt werden. Auch die K⁺-Ausscheidung war bei beiden Genotypen ähnlich (WT: $356,4 \pm 20 \mu\text{mol/d}$; PAR2-KO: $385 \pm 21 \mu\text{mol/d}$; je $n=43$; $p=0,33$).

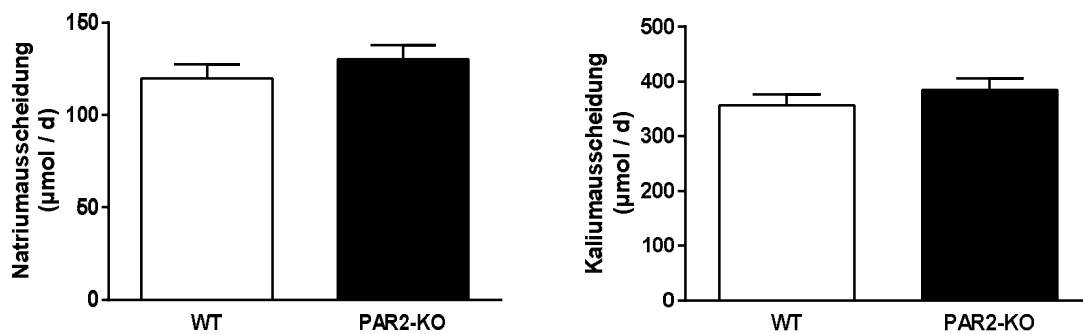


Abb. 19: Natrium (Na⁺)- und Kalium (K⁺)-Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Genotyp 43 Tiere zur Erhebung der Daten analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

2.6. Zusammenfassung

Basal waren zwischen Wildtypen und PAR2-KO weder in der Reninsynthese und -sekretion noch in der Nierenfunktion Unterschiede zu erkennen. Die Abwesenheit eines funktionsfähigen PAR2 scheint entweder basal keine ausschlaggebende Rolle zu spielen, oder durch andere Mechanismen kompensiert zu werden.

3. Akute Reninstimulation

In der isoliert perfundierten Niere und bei akuter Stimulation des Rezeptors *in vivo* konnte ein stimulierender Effekt des PAR2 auf die Reninsekretion beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der PAR2 bei der Regulation der Reninsekretion, durch eine akute Stimulation dieser, eine Rolle spielt. Hierfür wurde die Reninsekretion durch typische Stimuli auf unterschiedliche Weise angeregt und anschließend die Plasmareninkonzentration von Wildtypen und PAR2-Knockouts bestimmt.

3.1. Plasmareninkonzentration

Die akute Reninsekretion wurde durch den Vasodilatator Hydralazin (2 mg/kg), den β -Adrenorezeptor-Agonist Isoproterenol (10 mg/kg), den AT₁-Antagonist Losartan (3 mg/kg) oder durch das Schleifendiuretikum Furosemid (40 mg/kg) stimuliert. Die Substanzen wurden i.p. injiziert und nach einer Stunde die Plasmareninkonzentration bestimmt. Wie der folgenden Abbildung und Tabelle entnommen werden kann, wurde durch die Gabe von Hydralazin, Isoproterenol und Losartan ein signifikanter Anstieg der PRC erreicht, wobei die Werte von Wildtyp und PAR2-KO auch hier vergleichbar waren. Die akute Stimulation durch das Schleifendiuretikum führte ebenfalls bei beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg. Bei den WT-Mäusen konnte ein stärkerer, jedoch nicht signifikant größerer ($p=0,088$) Anstieg gemessen werden. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass der PAR2 auch im distalen Tubulus und Sammelrohr exprimiert ist und eventuell hier einen Einfluss auf die diuretikaabhängige vermehrte Natriumexkretion hat. Die durch die typischen Stimuli akut vermehrte Exozytose von Renin scheint nicht PAR2-abhängig reguliert zu werden.

PRC [ng ANGI/h*ml]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Kontrolle	248 ± 34 (n=8)	186,7 ± 35 (n=8)	0,27
Hydralazin	1764 ± 460 (n=5)	1417 ± 473(n=5)	0,88
Isoproterenol	2611 ± 397 (n=4)	2715 ± 252 (n=4)	0,83
Losartan	3195 ± 65 (n=5)	3194 ± 207 (n=5)	0,61
Furosemid	4161 ± 765 (n=4)	2508 ± 270 (n=4)	0,088

Tab. 6: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

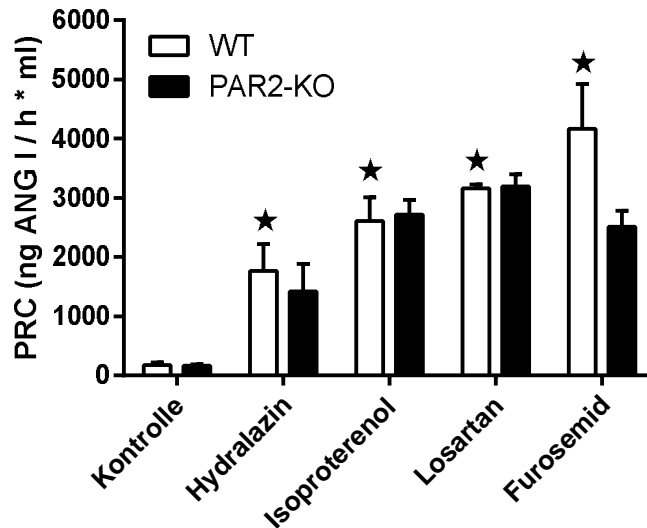


Abb. 20: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Die Δ PRC stellt die Veränderung, in diesem Fall den Anstieg der PRC, dar. Eventuelle Verfälschungen durch Unterschiede in der basalen Reninkonzentration der Versuchstiere wurden dadurch eliminiert. Auch nach Korrektur der Unterschiede in der Basal-PRC konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

Δ PRC [ng ANGI/h*ml]	WT	Basal	p-Wert
Hydralazin	1516 \pm 460 (n=5)	1230 \pm 473 (n=5)	p=0,68
Isoproterenol	2363 \pm 397 (n=4)	2529 \pm 252 (n=4)	p=0,74
Losartan	2911 \pm 65 (n=5)	3008 \pm 207 (n=5)	p=0,67
Furosemid	3912 \pm 765 (n=4)	2321 \pm 270 (n=4)	p=0,10

Tab. 7: Δ PRC von WT und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 9 WT und PAR2-KOs herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

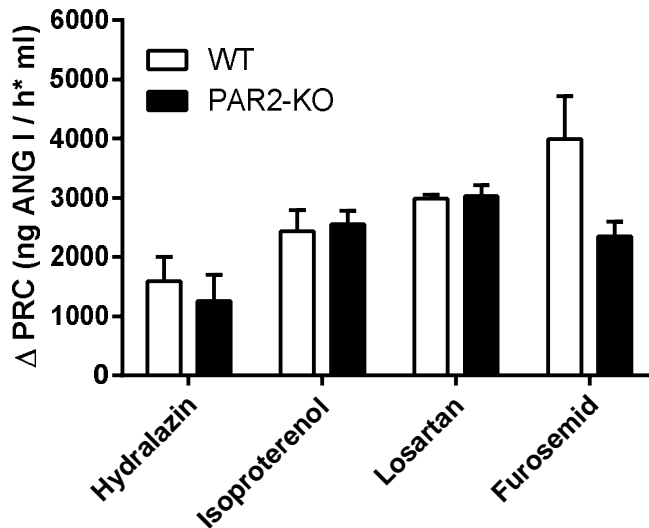


Abb. 21: Δ PRC von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.2. Hämatokrit

Der Hämatokrit der Kontroll-, Hydralazin-, Isoproterenol- und Losartangruppen war vergleichbar und befand sich im physiologischen Bereich (siehe Tabelle 8). Nach Furosemidapplikation war der Hämatokrit bei beiden Genotypen gleichermaßen signifikant erhöht (WT und PAR2-KO: $p < 0,01$), was vermutlich auf die stark vermehrte Urinausscheidung zurückzuführen ist.

Hämatokrit [%]	WT	Basal	p-Wert
Basal	49,0 \pm 1,4 (n=8)	49,3 \pm 1,5 (n=8)	p=0,82
Hydralazin	48,5 \pm 0,6 (n=4)	48,8 \pm 1,7 (n=4)	p=0,82
Isoproterenol	47,0 \pm 2,1 (n=4)	45,3 \pm 1,5 (n=4)	p=0,31
Losartan	51,6 \pm 1,5 (n=4)	49,3 \pm 2,0 (n=4)	p=0,19
Furosemid	56,0 \pm 0,8 (n=4)	56,6 \pm 0,6 (n=4)	p=0,13

Tab. 8: Hämatokrit von WT und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 9 WT und PAR2-KOs herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

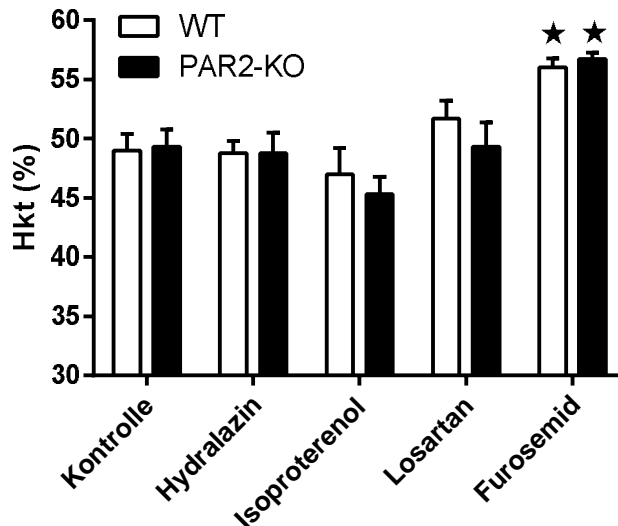


Abb. 22: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 4 Tiere je Gruppe herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4. Chronische Reninstimulation durch Diuretika

Nachdem PAR2 für die akute Freisetzung des Renins *in vivo* keinen relevanten Effekt zu haben scheint, wurden die Reninsynthese und –sekretion über einen Zeitraum von 5-7 Tagen stimuliert. Nach einer chronischen Stimulation von mehreren Tagen kann nicht nur die Exozytose von gespeichertem Renin, sondern auch die Reninsynthese beurteilt werden.

Eine Applikation von Furosemid (1,2 mg/d) über 5 Tage mittels osmotischer Minipumpen führt zu einer vermehrten Elektrolyt- und Wasserausscheidung und zu einem Blutdruckabfall. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Aktivität der RAAS-Kaskade. Auch in den chronischen Versuchen wurden geeignete Parameter für die Evaluierung der Reninsynthese und -sekretion sowie der Nierenfunktion an WT und PAR2-KO im Vergleich untersucht.

4.1. Renin

4.1.1. Plasmareninkonzentration

Die Plasmareninkonzentration wurde am Ende der fünftägigen Versuchsdauer bei beiden Genotypen bestimmt. Hierbei konnte kein Unterschied ($p=0,88$) zwischen den Genotypen festgestellt werden. Bei den WT (Basal: 101 ± 14 ng ANGI/h*ml, $n=34$; Furosemid: $534 \pm$

208 ng ANGI/h*ml, n=6; p<0,01) war ein vergleichbarer Anstieg der PRC wie bei den PAR2-KOs (Basal: 100 ± 12 ng ANGI/h*ml, n=33; Furosemid: 495 ± 127 ng ANGI/h*ml, n=6; p<0,01) zu sehen. Der, durch eine chronische Furosemidgabe induzierte Anstieg der Reninsekretion scheint deshalb unabhängig vom PAR2 reguliert zu werden.

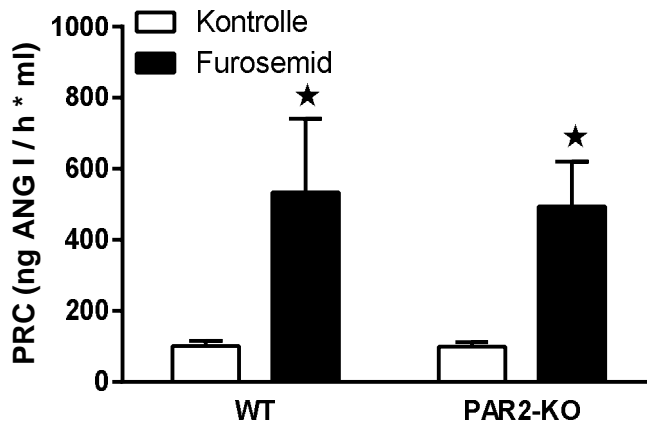


Abb. 23: Plasmenreninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; *: p<0,05 gegen Basalwert

4.1.2. Renin mRNA

Der Anstieg der Reninsynthese wurde mittels PCR der Renin mRNA-Expression evaluiert. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied (p=0,45) zwischen den Genotypen festgestellt werden. Bei den WT (Basal: 100 ± 8,2 %, n=29; Furosemid: 149,5 ± 35,9 %, n=6; p=0,046) war ein vergleichbarer Anstieg der Renin mRNA-Expression durch Furosemid zu sehen wie bei den PAR2-KOs (Basal: 98,7 ± 11,5 %, n=27; Furosemid: 203,4 ± 57,5 %, n=6; p=0,006). Auch in der Regulation der Reninsynthese spielt der PAR2 anscheinend keine wichtige Rolle.

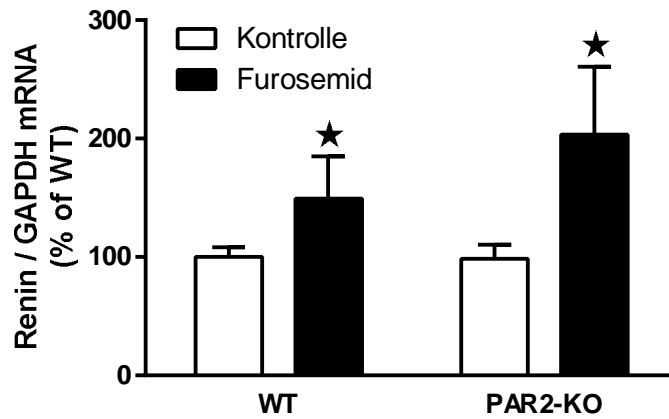


Abb. 24: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

4.2. Nierenfunktion

4.2.1. Kreatininkonzentration und -clearance

Die Plasmakreatininkonzentration wurde als Indikator für die Nierenfunktion kolorimetrisch bestimmt. Unter Furosemidgabe konnte weder bei den WT- noch bei den PAR2-KO-Tieren eine Veränderung der Plasmakreatininkonzentration festgestellt werden (siehe Tabelle 9).

Plasmakreatininkonz. [mg/dl]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,81 \pm 0,04 (n=27)	0,88 \pm 0,05 (n=26)	0,32
Furosemid	0,76 \pm 0,04 (n=6)	0,83 \pm 0,04 (n=6)	0,58

Tab. 9: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Die Kreatininclearance ist ein übliches Verfahren zur Bestimmung der Nierenfunktion. Dabei wird das Verhältnis von Kreatininkonzentration in Urin und Plasma bestimmt, wobei das Urinvolumen und das Körpergewicht mit berücksichtigt werden. Sie erlaubt einen Rückschluss auf die GFR, welche einen der wichtigsten Parameter für die Nierenfunktion darstellt. Die Werte der Clearance-Berechnung bestätigten das Ergebnis der Plasmakreatininbestimmung, dass zwischen den Genotypen kein signifikanter Unterschied festzustellen war (siehe Tabelle 10). Unter Furosemid stieg die Kreatininclearance signifikant an.

Kreatininclearance [$\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{g KG}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,55 \pm 0,09 (n=27)	0,42 \pm 0,06 (n=26)	0,32
Furosemid	7,53 \pm 0,72 (n=3)	5,49 \pm 1,01 (n=3)	0,17
p-Wert	<0,01	<0,01	

Tab. 10: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4.2.2. Ureakonzentration

Die Plasmaureakonzentration wurde als weiterer Parameter für eine eventuelle Nierenfunktionsstörung bestimmt. Wobei auch hier bestätigt werden konnte, dass die Werte der beiden Genotypen vergleichbar waren, wie der folgenden Tabelle entnommen werden kann. Unter Furosemidgabe waren die Ureakonzentrationen bei WT und PAR2-KO signifikant erhöht (WT: $p=0,02$; PAR2-KO: $p<0,01$) gegenüber den Basalwerten.

Plasmaureakonz. [mg/dl]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	77,3 \pm 5,5 (n=27)	77,6 \pm 4,6 (n=27)	0,96
Furosemid	95,8 \pm 6,8 (n=6)	111,9 \pm 5,3 (n=6)	0,09

Tab. 11: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4.3. Urinexkretion und Trinkverhalten

Die Gabe eines Schleifendiuretikums bewirkt eine verringerte Elektrolyt- und Wasserrückresorption im aufsteigenden Ast der Henleschleife durch die Hemmung des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters (NKCC2). Dadurch kommt es zu einer stark erhöhten Wasserausscheidung, die durch eine vermehrte Trinkmenge kompensiert wird.

4.3.1. Urinvolumen

Die Urinvolumina der Versuchstiere waren, wie zu erwarten, hochsignifikant erhöht. Die WT-Mäuse (Basal: 1,07 \pm 0,08 ml/d, n=49; Furosemid: 10,66 \pm 0,66 ml/d, n=6; $p<0,01$) wiesen dabei einen ähnlichen Anstieg ($p=0,26$) wie die PAR2-KOs (Basal: 1,08 \pm 0,08 ml/d, n=49; Furosemid: 11,74 \pm 0,63 ml/d, n=6; $p<0,01$) auf.

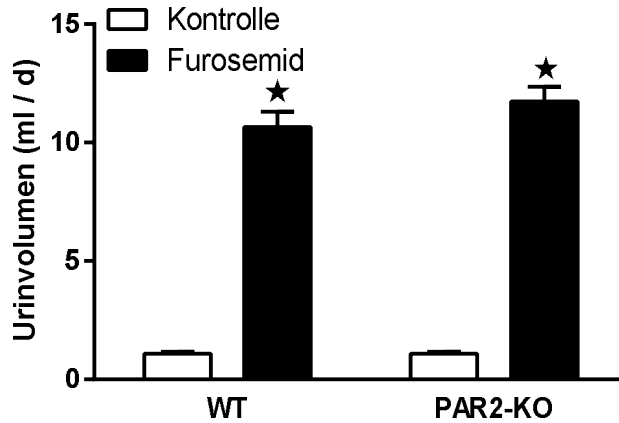


Abb. 25: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

4.3.2. Trinkvolumen

Um den massiven Flüssigkeitsverlust über die Niere zu kompensieren, tranken die mit Furosemid behandelten Tiere dementsprechend mehr. Bei den Trinkvolumina der WT (Basal: $5,90 \pm 0,23$ ml/d, $n=49$; Furosemid: $23,24 \pm 0,71$ ml/d, $n=6$; $p < 0,01$) und PAR2-KOs (Basal: $5,96 \pm 0,2$ ml/d, $n=49$; Furosemid: $21,76 \pm 1,17$ ml/d, $n=6$; $p < 0,01$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Genotypen ($p=0,30$) festgestellt werden.

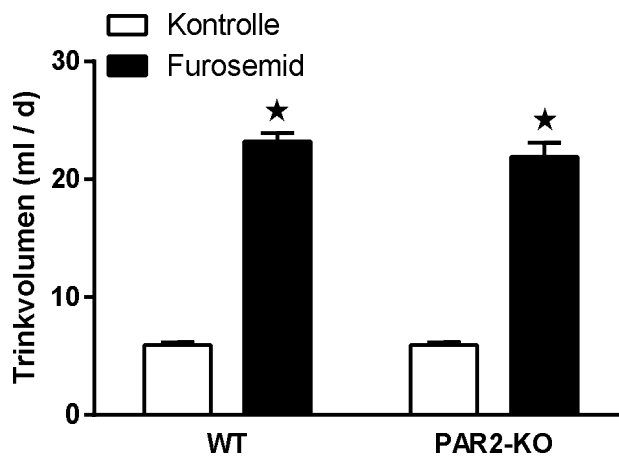


Abb. 26: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

4.3.3. Osmolarität

4.3.3.1. Plasmaosmolarität

Den Versuchstieren, welchen Furosemid verabreicht wurde, stand, neben normalem Trinkwasser auch eine isotone Kochsalzlösung zur Verfügung. Dadurch konnte die Osmolarität des Plasmas, trotz des Wasserverlustes unter Furosemidgabe, in einem physiologischen Rahmen reguliert werden. Dabei verhielten sich beide Genotypen vergleichbar, wie der folgenden Tabelle entnommen werden kann.

Plasmaosmolarität [osmol/kg]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,322 ± 0,005 (n=30)	0,324 ± 0,006 (n=26)	0,77
Furosemid	0,339 ± 0,009 (n=6)	0,325 ± 0,015 (n=6)	0,43

Tab. 12: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

4.3.3.2. Urinosmolarität

Unter Einwirkung eines Schleifendiuretikums wird die Konzentrationsfähigkeit der Niere durch Inhibition des NKCC2 herabgesetzt. Dies führt zu einer verringerten Osmolarität im Urin. Wie erwartet war die Osmolarität des Urins der WT (Basal: 3,60 ± 0,18 osmol/kg, n=27; Furosemid: 0,63 ± 0,22 osmol/kg, n=3; p<0,01) und PAR2-KOs (Basal: 3,46 ± 0,25 osmol/kg, n=27; Furosemid: 0,57 ± 0,21 osmol/kg, n=3; p<0,01) nach Furosemidgabe signifikant verringert. Wobei auch hier kein genotypspezifischer Unterschied festgestellt werden konnte (p=0,63).

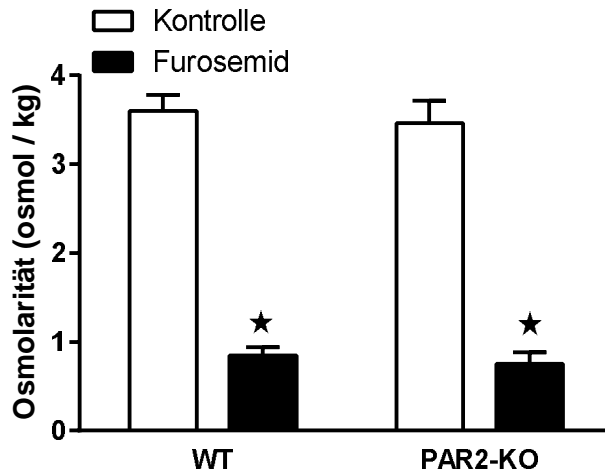


Abb. 27: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

4.3.4. Hämatokrit

Der Hämatokrit stieg bei beiden Genotypen unter Furosemideinfluss in einem vergleichbaren Maße signifikant an, wie in der Tabelle zu sehen ist.

Hämatokrit [%]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	47,8 \pm 0,3 (n=41)	47,3 \pm 0,2 (n=39)	0,16
Furosemid	56,3 \pm 0,8 (n=6)	57,0 \pm 0,6 (n=6)	0,52
p-Wert	<0,01	<0,01	

Tab. 13: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; p signifikant für $< 0,05$.

4.4. Elektrolyte

Die Inhibierung des NKCC2 führt zu einer vermehrten Elektrolyt-Ausscheidung. Es wurden deshalb die Natrium- und Kaliumkonzentrationen in Plasma und Urin gemessen.

4.4.1. Plasmaelektrolyte

Den Versuchsgruppen, welche Furosemid verabreicht bekommen haben, stand eine isotone Kochsalzlösung zum Trinken zur Verfügung, um eine Hyponatriämie und Hypovolämie zu vermeiden. Dadurch waren die Tiere in der Lage, die Plasmanatriumkonzentration trotz des massiven renalen Verlustes aufrecht zu erhalten, wie den folgenden Tabellen entnommen werden kann. Die beiden Genotypen wiesen dabei keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration von Na^+ auf. Die Plasmakaliumkonzentration war bei beiden Genotypen unter Furosemidgabe signifikant geringer (WT: $p=0,02$; PAR2-KO: $p < 0,01$) als

bei den Kontrolltieren. Ein PAR2-abhängiger Unterschied konnte auch hier nicht beobachtet werden.

Na ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	130,6 ± 3,0 (n=30)	131,7 ± 3,2 (n=27)	0,81
Furosemid	144 ± 14,8 (n=5)	142,6 ± 6,8 (n=4)	0,94

Tab. 14: Plasmanatriumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

K ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	6,30 ± 0,30 (n=28)	6,66 ± 0,26 (n=26)	0,38
Furosemid	4,69 ± 0,31 (n=5)	4,94 ± 0,22 (n=4)	0,56

Tab. 15: Plasmakaliumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

4.4.2. Natriumausscheidung im Urin

Die Natriumausscheidung im 24 Stunden-Sammelurin war bei WT (Basal: 119,8 ± 7,5 µmol/d, n=43; Furosemid: 2092 ± 141 µmol/d, n=6; p<0,01) und PAR2-KOs (Basal: 138,4 ± 7,4 µmol/d, n=43; Furosemid: 2379 ± 136 µmol/d, n=3; p<0,01) nach Furosemidgabe signifikant erhöht. Wobei auch hier kein genotypspezifischer Unterschied festgestellt werden konnte (p=0,17).

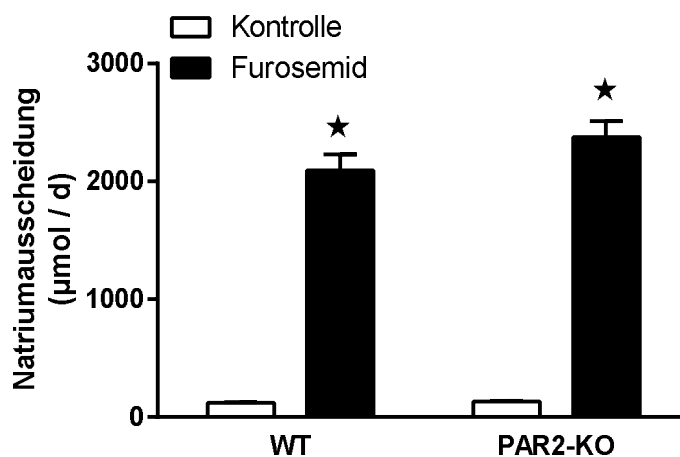


Abb. 28: Natriumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; (*): p<0,05 gegen Basalwert

4.4.3. Kaliumausscheidung im Urin

Die Kaliumausscheidung im 24 Stunden-Sammelurin war bei WT (Basal: $356 \pm 20 \mu\text{mol/d}$, $n=43$; Furosemid: $599 \pm 104 \mu\text{mol/d}$, $n=6$; $p<0,01$) und PAR2-KOs (Basal: $385 \pm 21 \mu\text{mol/d}$, $n=43$; Furosemid: $643 \pm 119 \mu\text{mol/d}$, $n=3$; $p<0,01$) nach Furosemidgabe signifikant erhöht. Wobei auch hier kein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO festgestellt werden konnte ($p=0,47$).

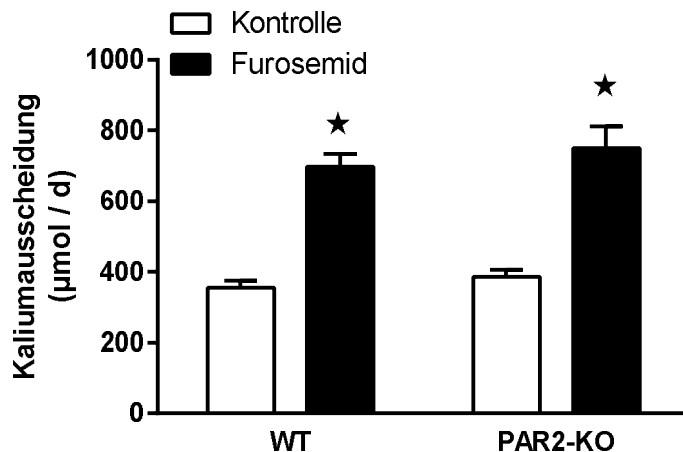


Abb. 29: Kaliumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/Tier/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p<0,05$ gegen Basalwert

4.5. Zusammenfassung

Die Regulation der Reninsynthese und -sekretion, sowie der Elektrolytausscheidung und Nierenfunktion nach Gabe eines Schleifendiuretikums scheint bei fehlender Funktion des PAR2 nicht verändert zu sein.

5. Chronische Salzdiäten

Eine vermehrte Salzaufnahme führt vor allem über den Macula densa-Mechanismus zu einer verminderten Reninsekretion. Eine verminderte Salzaufnahme bedingt dementsprechend einen Anstieg der Reninsekretion. Dieser Effekt wurde durch die Fütterung einer Hochsalz (HS)- beziehungsweise Niedrigsalz (LS)-Diät für 7 Tage provoziert, um die salzabhängige Regulation der Reninsekretion und die Nierenfunktion an WT- und PAR2-KO-Mäusen vergleichend zu untersuchen.

5.1. Renin

5.1.1. Plasmareninkonzentration

Die Plasmareninkonzentration wurde nach siebentägiger Diät bestimmt. Dabei konnte bei den WT-Mäusen unter Niedrigsalzdiät (299 ± 27 ng ANGI/h*ml; n=5) eine signifikant höhere PRC ($p < 0,01$) festgestellt werden, als bei den WT-Mäusen unter Hochsalzdiät (60 ± 8 ng ANGI/h*ml; n=5). Bei den PAR2-KO-Tieren konnte dieser salzabhängige Unterschied ebenfalls beobachtet werden (LS: 130 ± 13 ng ANGI/h*ml (n=5); HS: 78 ± 10 ng ANGI/h*ml (n=5); $p = 0,01$). Bei vermehrter Kochsalzzufuhr wiesen die Werte der beiden Genotypen keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,19$), wohingegen bei einer verminderten Kochsalzzufuhr bei den WT eine signifikant höhere PRC gemessen werden konnte, als bei den PAR2-KOs ($p < 0,01$).

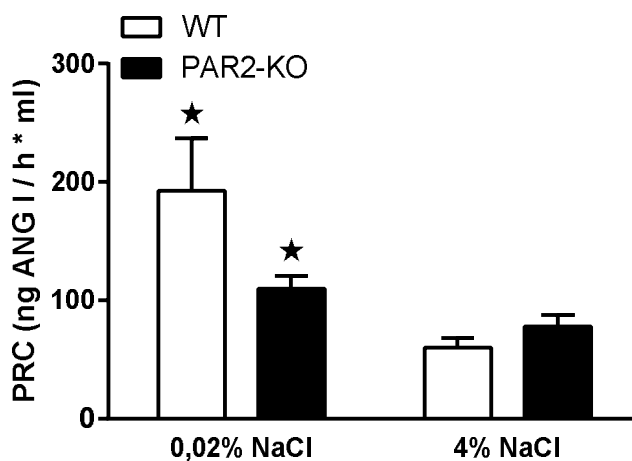


Abb. 30: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hochsalz- bzw. Niedrigsalzdiät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Hochsalzdiät.

5.1.2. Renin mRNA

Zur Kontrolle der PRC-Werte und um die Regulation der Renin-Expression bei verschiedenen Salzdiäten zu untersuchen, wurde die Renin mRNA bestimmt. Unter Niedrigsalzdiät (WT: $148,2 \pm 20$ %, n=10; PAR2-KO: 181 ± 33 %, n=14) konnte bei beiden Genotypen eine signifikant vermehrte Expression (WT: $p = 0,04$; PAR2-KO: $p = 0,03$) gegenüber der Hochsalzdiät (WT: 75 ± 13 %, n=4; PAR2-KO: 55 ± 16 %, n=5) festgestellt werden. Ein genotyp-abhängiger Unterschied war nicht zu sehen (LS: $p = 0,48$; HS: $p = 0,36$).

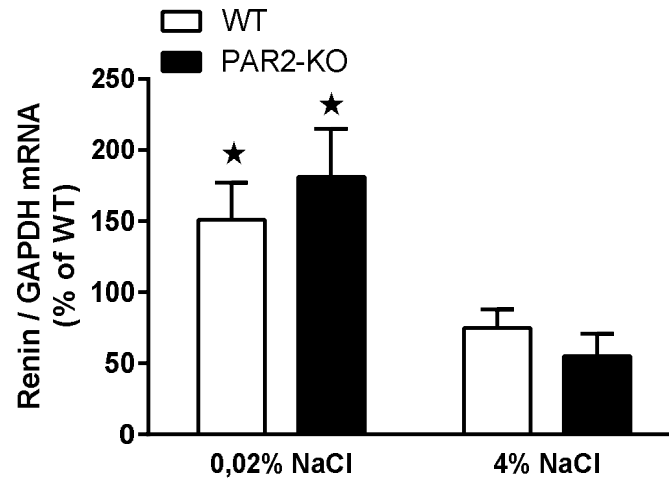


Abb. 31: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hochsalsz- bzw. Niedrigsalszdiät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

5.2. Kardiovaskulär

5.2.1. Systolischer Blutdruck

Da ein Abfall des Blutdrucks bei reduzierter NaCl-Zufuhr beschrieben ist (O'Shaughnessy et al. 2006), wurde der systolische Blutdruck unter Niedrigsalsbedingungen an WT und PAR2-KOs im Vergleich gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen beobachtet werden, wie die folgende Tabelle zeigt.

sBP [mmHG]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	109,7 \pm 3,5 (n=3)	117,3 \pm 1,8 (n=3)	0,12

Tab. 16: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Niedrigsals (LS)-Diät für 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

5.2.2. Herzfrequenz

Um starke Abweichungen des Blutdrucks durch Stress auszuschließen, wurde die Herzfrequenz bei der Messung des systolischen Blutdrucks miterfasst. Die Werte waren für beide Genotypen vergleichbar und bewegten sich in einem physiologischen Rahmen (siehe Tabelle 17)

HR [bpm]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	654 ± 10 (n=3)	659 ± 39 (n=3)	0,90

Tab. 17: Herzfrequenz (HR) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Niedrigsalz (LS)-Diät für 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM

5.3. Nierenfunktion

5.3.1. Kreatininkonzentration und -clearance

Die Kreatininkonzentration wurde auch hier als Indikator für die Nierenfunktion bestimmt. Bei einer vermehrten NaCl-Zufuhr konnte zwischen den Genotypen kein Unterschied der Plasmakreatininkonzentration festgestellt werden. Unter Niedrigsalzbedingung war die Konzentration des Kreatinins signifikant höher ($p < 0,01$ für WT und PAR2-KO) als unter Hochsalzbedingungen, wobei der Unterschied bei WT und PAR2-KO vergleichbar war (siehe Tabelle 18).

Kreatininkonzentration [mg/dL]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	1,13 ± 0,07 (n=9)	1,27 ± 0,07 (n=9)	0,19
HS	0,81 ± 0,03 (n=5)	0,76 ± 0,04 (n=5)	0,56

Tab. 18: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Die Kreatininclearance wurde zur Bestimmung der GFR berechnet. Die Werte waren für beide Genotypen unter Hochsalzbedingungen ähnlich, wie in der Tabelle zu sehen ist. Bei verminderter Kochsalzzufuhr war die GFR bei WT und PAR2-KOs gleichermaßen signifikant geringer (WT und PAR2-KO: $p < 0,01$) als unter Hochsalzbedingungen.

Kreatininclearance. [$\mu\text{l}/\text{Min} \cdot \text{g KG}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	0,16 ± 0,04 (n=7)	0,12 ± 0,02 (n=9)	0,41
HS	0,44 ± 0,03 (n=5)	0,44 ± 0,04 (n=5)	0,99

Tab. 19: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.3.2. Ureakonzentration

Die Ureakonzentration im Plasma wurde zusätzlich zur Kreatininkonzentration als Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion bestimmt. Hier war die Plasmakonzentration der beiden Versuchsgruppen mit Nidrigsalzdiät vergleichbar, wie der Tabelle entnommen werden kann. Auch bei vermehrter NaCl-Aufnahme wurde bei beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied (WT: $p=0,07$; PAR2-KO: $p=0,13$) in der Ureakonzentration gemessen.

Plasmaureakonz. [mg/dl]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	70,7 ± 6,2 (n=9)	68,8 ± 3,8 (n=9)	0,79
HS	51,3 ± 3,6 (n=5)	51,5 ± 5,5 (n=5)	0,99

Tab. 20: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Nidrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.4. Urinexkretion und Trinkverhalten

Da eine verminderte beziehungsweise erhöhte NaCl-Zufuhr auch Auswirkungen auf die Elektrolyt- und Wasserausscheidung in der Niere hat, wurden die Trink- und Urinmenge in 24 Stunden von WT und PAR2-KO gemessen und verglichen.

5.4.1. Urinvolumen

Das Urinvolumen von WT- und PAR2-KO-Tieren war vergleichbar. Während der Hochsalzdiät schieden die Versuchstiere signifikant größere Mengen ($P<0,01$) aus, als bei verminderter Kochsalzzufuhr, wie in der Tabelle zu sehen ist.

Urinvolumen [ml/d]	WT	PAR2-KO
LS	1,69 ± 0,20 (n=17)	1,46 ± 0,10 (n=18)
HS	5,61 ± 0,36 (n=10)	6,67 ± 0,41 (n=10)

Tab. 21: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Nidrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.4.2. Trinkvolumen

Die Trinkmenge war unter Nidrigsalzbedingungen signifikant geringer (WT und PAR2-KO: $p<0,01$) als unter Hochsalzbedingungen. Ein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO konnte auch im Trinkverhalten nicht beobachtet werden, wie in der Tabelle zu sehen ist.

Trinkvolumen [ml/d]	WT	PAR2-KO
LS	4,69 ± 0,32 (n=17)	3,78 ± 0,15 (n=18)
HS	9,07 ± 0,37 (n=9)	10,24 ± 0,53 (n=10)

Tab. 22: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.4.3. Osmolarität

5.4.3.1. Plasmaosmolarität

Die Plasmaosmolarität konnte von allen Versuchstieren, unabhängig vom Genotyp und von der Kochsalzaufnahme, in einem physiologischen Bereich kontrolliert werden. In der Tabelle sind die durchschnittlichen Messwerte aufgeführt, welche für alle Versuchsgruppen vergleichbar waren.

Plasmaosmolarität [osmol/kg]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Lowsalt	0,333 ± 0,009 (n=9)	0,337 ± 0,006 (n=9)	0,68
Highsalt	0,327 ± 0,004 (n=5)	0,348 ± 0,014 (n=5)	0,19

Tab. 23: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.4.3.2. Urinosmolarität

Die Urinosmolarität war bei vermehrter Kochsalzaufnahme im Vergleich zur Niedrigsalzdiät signifikant verringert (WT: p=0,03; PAR2-KO: p<0,01). Im Vergleich von WT und PAR2-KOs konnte jedoch auch hier kein Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 24).

Urinosmolarität [osmol/kg]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Lowsalt	2,68 ± 0,21 (n=9)	2,72 ± 0,28 (n=9)	0,92
Highsalt	1,78 ± 0,19 (n=5)	1,33 ± 0,19 (n=5)	0,14

Tab. 24: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.4.4. Hämatokrit

Der Hämatokrit war, wie die Plasmaosmolarität, bei allen Versuchstieren ähnlich, wie in der Tabelle zu sehen ist. Weder der Genotyp noch die NaCl-Zufuhr scheinen darauf einen Einfluss zu nehmen.

Hämatokrit [%]	Wildtyp	PAR2-KO	p-Wert
Lowsalt	48,4 ± 0,6 (n=9)	47,8 ± 0,5 (n=9)	0,39
Highsalt	47,4 ± 0,8 (n=5)	47,8 ± 1,1 (n=5)	0,77

Tab. 25: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.5. Elektrolyte

Eine vermehrte Aufnahme von Elektrolyten nimmt Einfluss auf deren Plasmakonzentration und Ausscheidung. Aus diesem Grund wurde die Natrium- und Kalium-Konzentration abhängig von der NaCl-Zufuhr und dem Genotyp untersucht.

5.5.1. Plasmaelektrolyte

Die Plasmakonzentration von Natrium war bei beiden Genotypen ähnlich. Auch eine Veränderung der Kochsalzzufuhr konnte von den Versuchstieren ausgeglichen werden und führte zu keiner Änderung der Natriumkonzentration im Plasma (siehe Tabelle 26). Eine vermehrte Kochsalzzufuhr führte zu einer signifikant höheren (WT: $p=0,04$; PAR2-KO: $p<0,01$) Plasmakaliumkonzentration als bei verminderter NaCl-Zufuhr. Die Werte waren bei beiden Genotypen gleichermaßen erhöht (siehe Tabelle 27).

Na ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	126,3 ± 2,3 (n=9)	128,1 ± 2,2 (n=9)	0,6
HS	140,2 ± 2,9 (n=5)	141,3 ± 6,8 (n=5)	0,88

Tab. 26: Plasmanatriumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

K ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	7,54 ± 0,18 (n=9)	7,94 ± 0,21 (n=7)	0,17
HS	8,95 ± 0,33 (n=5)	8,8 ± 0,31 (n=5)	0,75

Tab. 27: Plasmakaliumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

5.5.2. Natriumausscheidung im Urin

Entsprechend der Aufnahme wurde bei einer Niedrigsalzdiät im Vergleich zu einer Hochsalzdiät eine signifikant geringere (WT und PAR2-KO: $p < 0,01$) Na^+ -Konzentration im Urin gemessen. Dabei war die Natrium-Ausscheidung von WT- und PAR2-KO-Tieren ähnlich zueinander.

Na^+ [$\mu\text{mol/d}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	19 ± 2 (n=17)	18 ± 2 (n=18)	0,83
HS	1306 ± 164 (n=10)	1592 ± 211 (n=10)	0,41

Tab. 28: Natriumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

5.5.3. Kaliumausscheidung im Urin

Auch die Kaliumkonzentration war bei einer verminderten NaCl -Aufnahme signifikant geringer (WT und PAR2-KO: $p < 0,01$) wie bei einer vermehrten Aufnahme von Kochsalz (siehe Tabelle 29). Ein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO konnte auch hier nicht beobachtet werden.

K^+ [$\mu\text{mol/d}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
LS	$255,8 \pm 19,7$ (n=17)	$270,1 \pm 13,6$ (n=18)	0,55
HS	$456,2 \pm 48,0$ (n=9)	$534,1 \pm 75,9$ (n=10)	0,31

Tab. 29: Kaliumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

5.6. Zusammenfassung

Mit Ausnahme der Plasmareninkonzentration verhielten sich die gemessenen Parameter bei WT- und PAR2-KO-Mäusen unter vermehrter beziehungsweise verminderter NaCl -Zufuhr ähnlich. Die PRC stieg bei WT unter Niedrigsalzdiät signifikant mehr an als bei den KO-Tieren.

6. Chronische Reninstimulation durch AT_1 -Antagonisten

ANGII bewirkt u.a. über eine Aktivierung des AT_1 -Rezeptors eine Vasokonstriktion. Zudem wird die Freisetzung von Aldosteron und Vasopressin stimuliert. Durch die Antagonisierung des AT_1 -Rezeptors mittels Losartan werden diese blutdrucksteigernden Effekte aufgehoben,

was zu einem Abfall des Blutdrucks führt. Da der blockierte Rezeptor der Hauptwirkungsort des ANGI ist, wird bei einer Blockade auch vermehrt Renin freigesetzt. Zusätzlich hebt Losartan den ANGI vermittelten negativen Feedback auf die Reninsynthese und -sekretion auf. Aus diesem Grund eignet sich Losartan (30 mg/kg*d für 7 Tage) sehr gut um eine Stimulation der Reninsekretion zu erzielen. Der Effekt auf die Reninsynthese und -freisetzung kann noch verstärkt werden, indem die Tiere zusätzlich eine Niedrigsalzdiät (0,02% NaCl) erhalten.

6.1. Renin

6.1.1. Plasmareninkonzentration

Die Plasmareninsekretion der Versuchstiere stieg unter Losartan bei den WT von 101 ± 14 ng ANGI/h*ml (n=34) auf 207 ± 50 ng ANGI/h*ml (n=10) und bei den PAR2-KOs von 100 ± 11 ng ANGI/h*ml (n=33) auf 316 ± 74 ng ANGI/h*ml (n=10) signifikant (für beide Genotypen $p < 0,01$) an. Eine zusätzliche Niedrigsalzdiät führte zu einem weiteren Anstieg (WT: 2997 ± 381 ng ANGI/h*ml, n=18; PAR2-KO: 2219 ± 347 ng ANGI/h*ml, n=17; für beide Genotypen $p < 0,01$). Im Vergleich der beiden Genotypen zueinander konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Losartan: $p = 0,19$; Losartan + LS: $p = 0,14$).

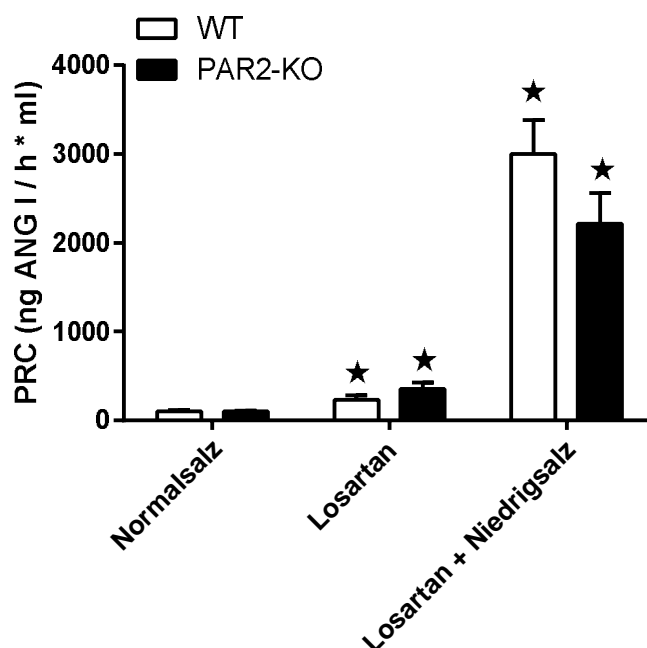


Abb. 32: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

6.1.2. Renin mRNA

Die Reninexpression war ebenfalls, sowohl nach Losartangabe als auch bei zusätzlicher Natriumsalzdiet, signifikant erhöht. Die mRNA-Expression von Renin der WT (NS: 100 ± 8 %, $n=29$; Losartan: 211 ± 52 %, $n=12$, $p<0,01$; Losartan + LS: 1668 ± 381 %, $n=3$, $p<0,01$) war auch hier vergleichbar zu der der PAR2-KOs (NS: 99 ± 12 %, $n=27$; Losartan: 157 ± 23 %, $n=13$, $p=0,02$; Losartan + LS: 1701 ± 233 %, $n=4$, $p<0,01$). Auch unter chronischer AT_1 -Blockade durch Losartan scheint der PAR2 an der Reninregulation nicht direkt beteiligt zu sein.

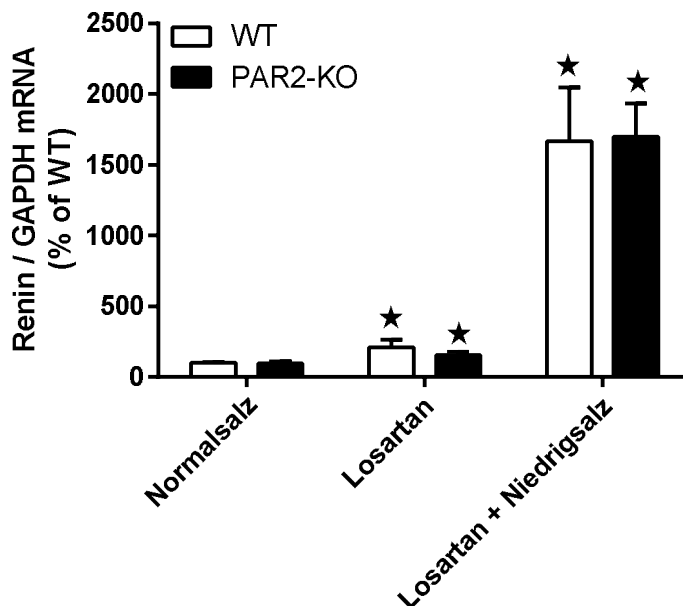


Abb. 33: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p<0,05$ gegen Basalwert

6.1.3. Immunhistochemie

Es wurden immunhistochemische Aufnahmen angefertigt, um die Lokalisation der reninbildenden Zellen darzustellen. Eine genaue Quantifizierung der Reninmenge ist mittels dieser Schnitte nicht möglich. Es konnte jedoch im Vergleich der gefärbten Schnitte unter Losartan und Losartan mit Natriumsalz eine vermehrte Reninanfärbung verglichen mit Kontrolltieren festgestellt werden. Des Weiteren wirken die Areale der reninbildenden Zellen unter Einfluss von Losartan und Losartan mit Natriumsalz vergrößert, was auf eine Rekrutierung neuer reninbildender Zellen schließen lässt. Die Genotypen scheinen jedoch keinen Unterschied aufzuweisen.

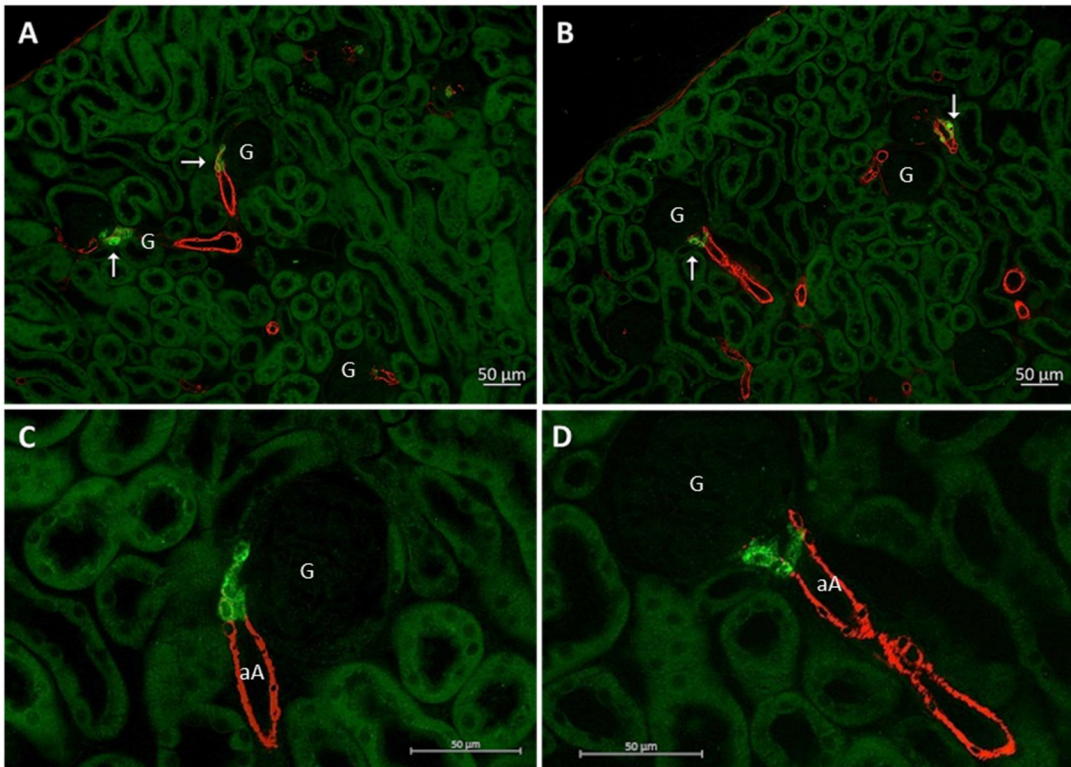


Abb. 34: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter basalen Bedingungen. aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

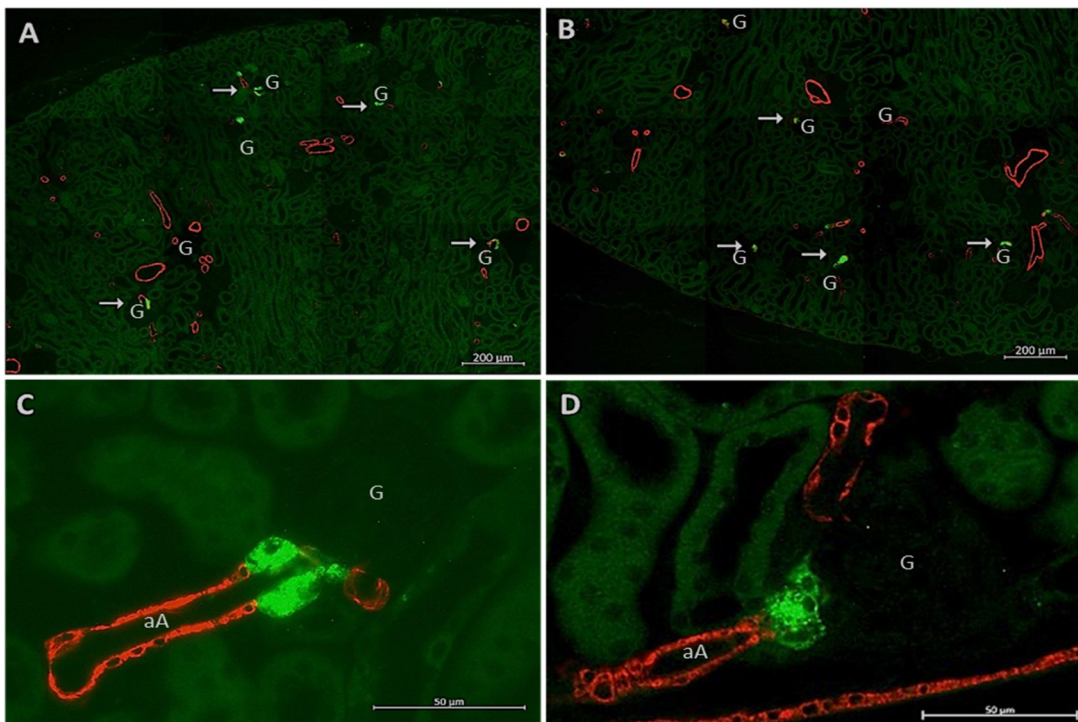


Abb. 35: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter Losartan (30 mg/kg*d). aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

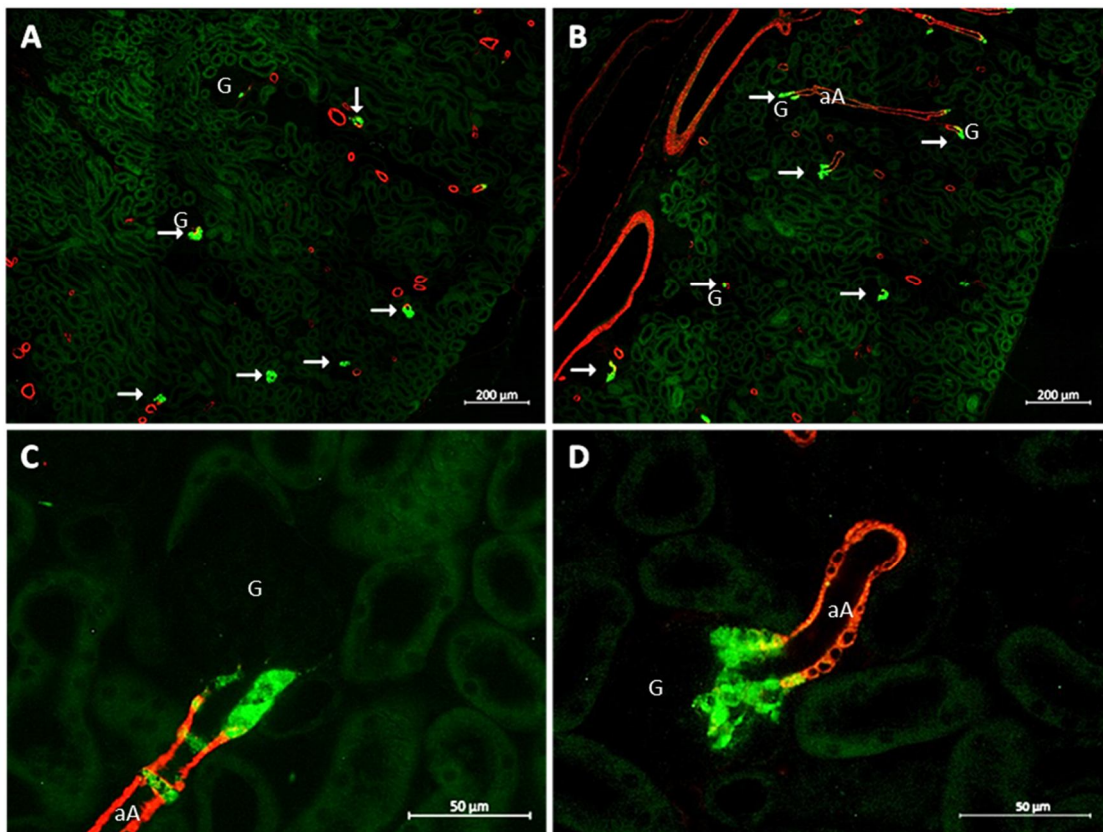


Abb. 36: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter Losartan (30 mg/kg*d) mit Nidrigsalzdiät (0,02 % NaCl). aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

6.2. Kardiovaskulär

6.2.1. Systolischer Blutdruck

Der blutdrucksenkende Effekt von Losartan konnte anhand der Messung des systolischen Blutdrucks mittels der Tail-Cuff-Methode aufgezeigt werden. Wie in der Tabelle zu sehen ist, wurde unter Losartan ein Blutdruckabfall gemessen (WT: $p=0,01$; PAR2-KO: $p=0,01$), welcher bei zusätzlicher Nidrigsalzdiät noch verstärkt war (WT: $p=0,03$; PAR2-KO: $p<0,01$). Der Funktionsverlust des PAR2 führte auch hier zu keinen Veränderungen des systolischen Blutdrucks.

sBP [mmHG]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	117,9 ± 3,0 (n=9)	120,0 ± 2,8 (n=8)	0,283
Losartan	97,9 ± 8,0 (n=4)	106,0 ± 2,4 (n=4)	0,37
Losartan + LS	72,5 ± 3,3 (n=4)	78,4 ± 4,7 (n=5)	0,83

Tab. 30: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM

6.2.2. Herzfrequenz

Um starke Abweichungen des Blutdrucks durch Stress auszuschließen, wurde die Herzfrequenz bei der Messung des systolischen Blutdrucks miterfasst. Die Werte waren vergleichbar und bewegten sich in einem physiologischen Rahmen, wie die folgende Tabelle aufzeigt. Es konnte eine relevante Verfälschung der Messung durch Stress ausgeschlossen werden.

HR [bpm]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	597 ± 27 (n=9)	498 ± 49 (n=8)	0,44
Losartan	604 ± 48 (n=4)	623 ± 44 (n=4)	0,78
Losartan+Lowsalt	607 ± 35 (n=5)	577 ± 34 (n=5)	0,6

Tab. 31: Herzfrequenz (HR) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.3. Nierenfunktion

Zur Evaluierung, ob der PAR2 bei Gabe von Losartan mit oder ohne Nidrigsalzdiät eine Rolle in der Regulation der Nierenfunktion spielt, wurde diese untersucht.

6.3.1. Kreatininkonzentration und -clearance

Die Plasmakreatininkonzentration wurde als Indikator für die Nierenfunktion mittels eines kolorimetrischen Tests bestimmt. Es konnte weder bei den WT- noch bei den PAR2-KO-Tieren eine Veränderung der Plasmakreatininkonzentration bei Losartangabe festgestellt werden (siehe Tabelle 8). Auch die Kombination mit einer Nidrigsalzdiät bewirkte keine Änderung des Kreatininplasmaspiegels. Die Nierenfunktion scheint weder bei den WT noch bei den PAR2-KOs beeinträchtigt zu sein.

Plasmakreatininkonz. [mg/dL]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,81 ± 0,05 (n=27)	0,88 ± 0,05 (n=26)	0,32
Losartan	0,74 ± 0,09 (n=9)	0,74 ± 0,07 (n=9)	0,99
LS+Losartan	0,62 ± 0,05 (n=7)	0,70 ± 0,10 (n=6)	0,49

Tab. 32: Plasamakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Die Werte der Clearance-Berechnung bestätigten das Ergebnis der Plasmakreatininbestimmung, dass weder zwischen den Genotypen noch durch die Gabe von Losartan ein signifikanter Unterschied festzustellen war (siehe Tabelle 9).

Kreatininclearance [µl/Min*g KG]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,55 ± 0,09 (n=27)	0,42 ± 0,06 (n=26)	0,23
Losartan	0,74 ± 0,16 (n=9)	0,40 ± 0,11 (n=9)	0,12
LS+Losartan	0,66 ± 0,16 (n=7)	0,64 ± 0,10 (n=6)	0,93

Tab. 33: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan +LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.3.2. Ureakonzentration

Eine kolorimetrische Messung der Plasmaureakonzentration ergab vergleichbare Ergebnisse für beide Genotypen. Auch die Blockade des AT₁-Rezeptors führte zu keiner Änderung der Ureakonzentration im Plasma. Dies bestätigt die Annahme, dass die Nierenfunktion bei beiden Genotypen unverändert ist.

Plasmaureakonz. [mg/dl]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	77,25 ± 5,5 (n=27)	77,59 ± 4,6 (n=27)	0,96
Losartan	100,66 ± 5,4 (n=9)	90,34 ± 9,5 (n=9)	0,36
LS+Losartan	83,38 ± 8,7 (n=7)	83,66 ± 9,4 (n=6)	0,98

Tab. 34: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.4. Urinexkretion und Trinkverhalten

Zusätzlich wurde der Urin über 24 Stunden im Stoffwechsellkäfig gesammelt und die Salz- und Wasserausscheidung bestimmt.

6.4.1. Urinvolumen

Das 24 Stunden-Urinvolumen war bei den Versuchsgruppen ähnlich, wie folgende Tabelle aufzeigt.

Urinvolumen [ml/d]	WT	PAR2-KO
Basal	1,07 ± 0,08 (n=49)	1,08 ± 0,08 (n=49)
Losartan	1,2 ± 0,13 (n=18)	0,88 ± 0,10 (n=17)
LS+Losartan	1,34 ± 0,15 (n=8)	2,02 ± 0,27 (n=8)

Tab. 35: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Natriumchlorid (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.4.2. Trinkvolumen

Um Unterschiede im Trinkverhalten als Ursache von eventuell verfälschten Urinvolumina auszuschließen, wurden die 24 Stunden-Trinkvolumina bei den Stoffwechsellkäfig-Versuchen mitbestimmt. Hier waren die Trinkmengen der Versuchsgruppen vergleichbar.

Trinkvolumen [ml/d]	WT	PAR2-KO
Basal	5,9 ± 0,23 (n=49)	5,96 ± 0,2 (n=49)
Losartan	5,33 ± 0,23 (n=18)	5,86 ± 0,38 (n=18)
LS+Losartan	5,62 ± 0,55 (n=8)	5,34 ± 0,4 (n=8)

Tab. 36: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Natriumchlorid (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.4.3. Osmolarität

6.4.3.1. Plasmaosmolarität

Die Osmolarität des Plasmas war bei allen Versuchsgruppen ähnlich. Auch zwischen WT und PAR-KO war kein signifikanter Unterschied zu sehen, wie der folgenden Tabelle entnommen werden kann.

Plasmaosmolarität [osmol/kg]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	0,322 ± 0,005 (n=30)	0,324 ± 0,006 (n=26)	0,77
Losartan	0,286 ± 0,017 (n=9)	0,312 ± 0,006 (n=9)	0,17
LS+Losartan	0,336 ± 0,012 (n=7)	0,302 ± 0,011 (n=6)	0,07

Tab. 37: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.4.3.2. Urinosmolarität

Die Urinosmolaritätsmessung mittels Gefrierpunkterniedrigung ergab für die Kontrollgruppen und die beiden Losartan-Gruppen (WT und PAR2-KO) ähnliche Werte. Die Gruppen mit zusätzlicher Nidrigsalzfütterung hatten eine signifikant geringere Urinosmolarität (WT: p=0,02; PAR2-KO: p=0,02).

Urinosmolarität [osmol/kg]	Wildtyp	PAR2-KO	p-Wert
Basal	3,597 ± 0,18 (n=27)	3,464 ± 0,25 (n=26)	0,67
Losartan	3,089 ± 0,22 (n=9)	3,861 ± 0,47 (n=9)	0,15
LS+Losartan	2,571 ± 0,37 (n=7)	2,138 ± 0,14 (n=6)	0,33

Tab. 38: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.4.4. Hämatokrit

Beim Hämatokrit konnten keine Unterschiede gefunden werden. Weder stimulationsabhängig noch genotypabhängig war ein signifikanter Unterschied zu sehen, wie der folgenden Tabelle entnommen werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Plasmaosmolarität.

Hämatokrit [%]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	47,8 ± 0,3 (n=41)	47,3 ± 0,2 (n=39)	0,16
Losartan	48,1 ± 0,4 (n=17)	47,5 ± 0,3 (n=17)	0,21
LS+Losartan	47,6 ± 0,4 (n=18)	47,6 ± 0,3 (n=17)	0,96

Tab. 39: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Niedrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.5. Elektrolyte

Durch die Niedrigsalzdiät wurde in den Elektrolythaushalt der Tiere eingegriffen. Da eine mögliche Beeinflussung der Elektrolytresorption durch den PAR2 beschrieben ist, wurde die Plasma-Elektrolytkonzentration und Elektrolyt-Ausscheidung in Abhängigkeit des PAR2 untersucht.

6.5.1. Plasmaelektrolyte

Die Plasma-Elektrolytkonzentration konnte von allen Versuchsgruppen in einem physiologischen Rahmen reguliert werden. Wie den Tabellen entnommen werden kann, hatten weder die Gabe von Losartan oder Losartan und einer Niedrigsalzdiät noch der ausgeschaltene PAR2 zu einem Unterschied in der Natrium- und Kaliumkonzentration geführt.

Na ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	130,6 ± 2,97 (n=30)	131,7 ± 3,18 (n=27)	0,81
Losartan	131,28 ± 8,6 (n=9)	142,1 ± 5,1 (n=9)	0,29
LS+Losartan	144,28 ± 14,8 (n=5)	142,6 ± 6,8 (n=4)	0,94

Tab. 40: Na⁺-Plasmakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Niedrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

K ⁺ [mmol/l]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	6,30 ± 0,30 (n=28)	6,66 ± 0,26 (n=26)	0,38
Losartan	5,35 ± 0,23 (n=9)	5,36 ± 0,22 (n=9)	0,97
LS+Losartan	5,08 ± 0,11 (n=4)	6,30 ± 0,82 (n=4)	0,19

Tab. 41: K⁺-Plasmakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Niedrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.5.2. Elektrolytausscheidung im Urin

Sowohl bei der Natrium- als auch bei der Kaliumausscheidung war ein signifikanter Abfall bei Niedrigsalzfütterung zu beobachten (WT: $p < 0,01$; PAR2-KO: $p < 0,01$). Dieser ist auf die reduzierte NaCl-Aufnahme zurückzuführen und war zu erwarten. Basal und bei einer Kombination von Losartan und LS-Diät war kein Unterschied in der Elektrolytkonzentration von WT- und PAR2-KO-Tieren zu sehen. Nach alleiniger Losartangabe konnte bei den PAR2-KOs eine signifikant geringere Ausscheidung von Na^+ und K^+ gemessen werden, wie den Tabellen entnommen werden kann.

Na^+ [$\mu\text{mol/d}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	119,9 \pm 7,6 (n=43)	130,4 \pm 7,4 (n=43)	0,32
Losartan	152,1 \pm 10,7 (n=9)	98,0 \pm 20,2 (n=9)	0,026
LS+Losartan	8 \pm 1,4 (n=7)	15,2 \pm 6,3 (n=6)	0,25

Tab. 42: Na^+ -Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Niedrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

K^+ [$\mu\text{mol/d}$]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	356,4 \pm 19,9 (n=43)	385,1 \pm 21,1 (n=43)	0,33
Losartan	461,9 \pm 37,5 (n=9)	266,3 \pm 60,2 (n=9)	0,014
LS+Losartan	41,25 \pm 21,5 (n=7)	114,4 \pm 67,8 (n=6)	0,3

Tab. 43: K^+ -Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Niedrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

6.6. Endothelialer Natriumkanal (ENaC) mRNA

Auf Grund des Ergebnisses der Na^+ - und K^+ -Messung im Urin und da eine mögliche Beeinflussung des ENaC durch PAR2 beschrieben ist, wurde die Expression des ENaC in den Nieren bestimmt. Hier konnte, wie in der Tabelle zu sehen ist, kein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO festgestellt werden. Durch die Blockade des AT_1 -Rezeptors und zusätzlichem Blutdruckabfall wurde eine vermehrte Expressierung von ENaC gemessen (WT: $p = 0,02$; PAR2-KO: $p = < 0,01$).

ENaC mRNA [%]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	100 ± 14 (n=12)	90 ± 18 (n=13)	0,68
Losartan	109 ± 28 (n=9)	112 ± 14 (n=9)	0,98
LS+Losartan	229 ± 62 (n=7)	239 ± 61 (n=7)	0,91

Tab. 44: ENaC mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

6.7. Zusammenfassung

Fast alle gemessenen Parameter waren für beide Genotypen vergleichbar und scheinen PAR2-unabhängig reguliert zu werden. Eine Ausnahme war die Ausscheidung von Natrium und Kalium, wo bei den PAR2-KO-Tieren eine verminderte Ausscheidung unter Losartanbehandlung festzustellen war.

7. Plasmaaldosteronkonzentration

Anschließend wurde bei einigen der Stimuli die Aldosteronkonzentration mittels eines ELISA bestimmt.

Die Aldosteronkonzentration stieg, wie die Tabelle zeigt, unter Nidrigsalzdiät (0,02 % NaCl) signifikant an (WT und PAR2-KO: $p < 0,01$). Wurde zu der Nidrigsalzdiät Losartan (30 mg/kg*d) verabreicht, fiel die Aldosteronkonzentration wieder signifikant ab (WT: $p = 0,03$; PAR2-KO: $p < 0,01$). Die Basalwerte und der Anstieg der Aldosteronkonzentration unter verminderter Kochsalzzufuhr war für WT und PAR2-KOs ähnlich. Eine zusätzliche Losartangabe führte bei den WT zu signifikant niedrigeren ($p = 0,03$) Werten.

Eine alleinige Gabe von Losartan führte bei beiden Genotypen gleichermaßen zu keinem signifikanten Unterschied in der Aldosteronkonzentration.

Aldosteronkonzentration [pg/ml]	WT	PAR2-KO	p-Wert
Basal	132 ± 36 (n=11)	224 ± 44 (n=8)	0,12
LS	1181 ± 198 (n=3)	1696 ± 196 (n=5)	0,13
LS + Losartan	486,0 ± 151,7 (n=6)	969,8 ± 115,2 (n=7)	0,03
Losartan	251,7 ± 58,4 (n=9)	391,9 ± 77,9 (n=8)	0,16

Tab. 45: Plasmaaldosteronkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe einer Nidrigsalz (LS)-Diät (0,02 % NaCl), von Losartan (30 mg/kg*d) oder LS + Losartan (0,02 % NaCl + 30 mg/kg*d) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

8. PAR1- und PAR2-Expression in Nieren von WT-Mäusen

Schließlich wurde die Rezeptorexpression von PAR1 und PAR2 im Kortex von WT-Nieren gemessen, um eine mögliche Regulation dieser Rezeptoren bei den verwendeten chronischen Stimuli zu bestimmen. Dazu wurden die Tiere mit den gleichen chronischen Stimuli (Niedrigsalzdiät 0,02 %, Hochsalzdiät 4 %, Losartan 39 mg/kg*d, Losartan + Niedrigsalzdiät und Furosemid 1,2 mg/Tier*d) wie im KO-Modell behandelt und anschließend die PAR1- und PAR2-Exprimierung mittels PCR bestimmt.

8.1. PAR1

In der Expression des PAR1 konnten keine durch die chronischen Stimuli induzierten Unterschiede festgestellt werden (Niedrigsalz: 111 ± 17 %; Normalsalz: 100 ± 14 %; Hochsalz: 100 ± 13 %; Losartan: 90 ± 9 %; Losartan + Niedrigsalz: 105 ± 10 %; Furosemid: 99 ± 12 %).

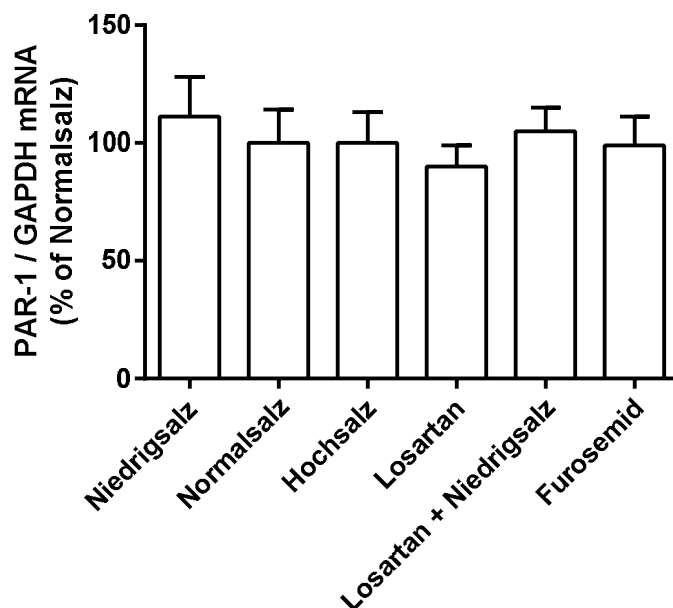


Abb. 37: PAR1 mRNA von Wildtyp (WT) nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl), Hochsalzdiät (4 % NaCl), Losartan (30 mg/kg*d), Losartan + Niedrigsalzdiät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) oder Furosemid (1,2 mg/Tier*d). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

8.2. PAR2

Der PAR2 war ebenfalls unter Einfluss der Stimuli vergleichbar stark exprimiert wie unter Normalbedingungen (Niedrigsalz: 115 ± 14 %; Normalsalz: 100 ± 14 %; Hochsalz: 91 ± 9 %; Losartan: 90 ± 8 %; Losartan + Niedrigsalz: 99 ± 10 %; Furosemid: 83 ± 9 %).

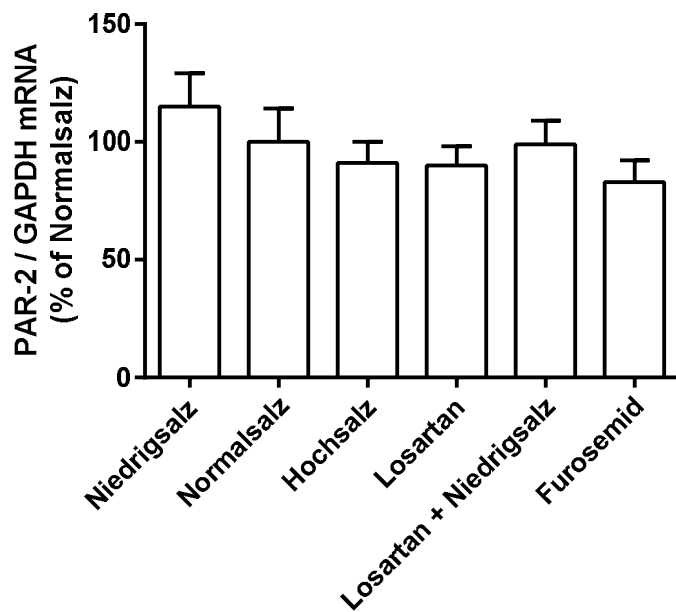


Abb. 38: PAR2 mRNA von Wildtyp (WT) nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Niedersalzdiät (0,02 % NaCl), Hochsalzdiät (4 % NaCl), Losartan (30 mg/kg*d), Losartan + Niedersalzdiät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) oder Furosemid (1,2 mg/Tier*d). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

VI. DISKUSSION

1. PAR1 und PAR2 *in vitro*

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Protease-aktivierte Rezeptoren verschiedene Wirkungen auf das kardiovaskuläre System haben. Unter anderem sind sie an der Thrombozytenaggregation, an Entzündungsprozessen und an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (Leger et al. 2006). Auch in den Nieren ist die Expression von PAR1 und PAR2 nachgewiesen (D'Andrea et al. 1998; Gui et al. 2003). *In vitro* und *ex vivo* Versuche an isoliert perfundierten Nieren geben Hinweise darauf, dass der PAR1 und PAR2 dort eine Rolle in der Regulation der Reninsynthese und -sekretion sowie in der Hämodynamik der Niere spielen können (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011; Trottier et al. 2002). Eine Stimulation des PAR1 bedingt, vermutlich durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den JGA-Zellen, eine verminderte Reninsekretion. Wo hingegen eine Aktivierung des PAR2, über NO vermittelt, zu einem Anstieg der Reninfreisetzung führt (Höcherl et al. 2011). Die Regulation der Reninsekretion hat einen unmittelbaren Effekt auf die RAAS-Kaskade, da Renin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der ANGII-Synthese darstellt. Somit kann eine vermehrte Reninfreisetzung über eine vermehrte ANGII-Bildung zu einem vasokonstriktorisch vermittelten Blutdruckanstieg und zu einer vermehrten Salz- und Wasserresorption im Tubulus führen. Eine verminderte Reninsekretion führt zu einer geringeren ANGII-Bildung und dadurch zu einer Vasodilatation sowie zu einer verminderten Elektrolyt- und Wasserrückresorption. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des PAR1 eine Vasokonstriktion der Vas afferens bedingt, was zu einem verminderten Blutfluss im Glomerulus und zu einem Abfall der GFR führt. Ferner wurde gefunden, dass eine Aktivierung des PAR2 eine bestehende Vasokonstriktion der Vas afferens durch ANGII aufhebt und so einen gesteigerten Blutfluss im Glomerulus und eine höhere GFR bedingt (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011; Trottier et al. 2002). Des Weiteren wird ein direkter Einfluss des PAR1 und PAR2 auf die Elektrolytresorption und -sekretion vermutet. Sowohl die Natriumrückresorption über epitheliale Natriumkanäle (ENaC) im distalen Tubulus, Verbindungstubulus und Sammelrohr als auch die kalziumabhängige Chloridsekretion im renalen Sammelrohr scheinen durch Serinproteasen reguliert werden zu können (Bertog et al. 1999; Chraïbi et al. 1998; Ray et al. 2015; Vallet et al. 1997). Diese *in vitro* Effekte des

PAR1 und PAR2 auf die Reninsynthese und -sekretion und auf die renale Hämodynamik lassen vermuten, dass sie *in vivo* ebenfalls Einfluss auf die Nierenfunktion haben könnten.

2. Charakterisierung der PAR2-KO-Maus

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die phänotypischen Veränderungen, welche durch einen Funktionsverlust des PAR2 hervorgerufen werden könnten, bezüglich der Reninsynthese und -sekretion, der Nierenfunktion, des Blutdrucks und der Elektrolyt- und Wasserausscheidung charakterisiert. Die bereits beschriebenen *In Vitro*-Ergebnisse weisen darauf hin, dass der PAR1 und PAR2 auch *in vivo* einen Effekt auf die Regulation der Reninsynthese und -freisetzung haben könnten. Aus diesem Grund wurden Versuche an einem globalen PAR2-Knockout hinsichtlich der Reninregulation und Nierenfunktion durchgeführt.

2.1. Reninsynthese und -sekretion

Renin nimmt im RAAS eine Schlüsselstellung ein. Es setzt Angiotensinogen zu ANGI um, welches wiederum von ACE zu dem biologisch aktiven ANGIO umgewandelt wird. Durch diesen ersten reninabhängigen Schritt wird die Geschwindigkeit der ANGIO-Synthese und damit des RAAS bestimmt (Castrop et al. 2010). Die Reninsynthese und -freisetzung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, z.B. die ANGIO-Konzentration per se, den Blutdruck, die Salzkonzentration des Urins und die Aktivität des sympathischen Nervensystems. Dies gewährleistet u.a. eine sensible Regulation des Blutdrucks und des Salz- und Wasserhaushaltes bei veränderten Bedingungen. In unseren Untersuchungen konnten die reninbildenden Zellen immunhistochemisch an den Gefäßpolen der Glomeruli entlang der Vas afferens lokalisiert werden, wobei beim Vergleich der Nierenschnitte von PAR2-KO-Mäusen mit den Schnitten von WT-Mäusen kein deutlicher Unterschied in der Intensität der Reninfärbung auffiel (siehe Abb.10). Auch die Reninkonzentration im Plasma der PAR2-defizienten Mäuse unterschied sich basal nicht von der Plasmareninkonzentration der Wildtypen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Reninfreisetzung basal in Abwesenheit eines funktionsfähigen PAR2 nicht verändert ist und somit unabhängig des PAR2 moduliert wird. Die Expression der Renin mRNA in der Niere war ebenfalls für beide Genotypen vergleichbar, was darauf schließen lässt, dass die Reninsynthese ebenfalls nicht PAR2-abhängig reguliert wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass PAR2 nicht an der basalen Reninsynthese und -sekretion *in vivo* beteiligt ist.

Denkbar wäre aber auch eine Kompensation des Funktionsverlustes des PAR2 durch andere reninregulierende Mechanismen.

2.2. Kardiovaskulär

Der Blutdruck ist im unmittelbaren Zusammenhang mit der Reninsekretion zu betrachten. Ein Anstieg des Blutdrucks hat eine Inhibierung der Reninsekretion zur Folge. Ein Abfall des Blutdrucks bedingt dementsprechend eine Stimulation der Reninfreisetzung (Davis et al. 1976; Nafz et al. 1997; Ryan et al. 2000; Scholz et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte hinsichtlich des systolischen Blutdrucks kein Unterschied zwischen WT- und PAR2-defizienten Mäusen beobachtet werden. Obwohl in einer Studie telemetrisch bei PAR2-KO ein signifikant höherer systolischer Blutdruck von ca. 5 mmHg gemessen wurde als bei WT (McGuire et al. 2008), wird in weiteren Veröffentlichungen, sowohl telemetrisch als auch mittels der Tail-Cuff-Methode gemessen, ebenfalls kein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO hinsichtlich des systolischen Blutdrucks beschrieben (Hughes et al. 2013; Morla et al. 2013). Es ist also davon auszugehen, dass sich der Blutdruck bei WT und PAR2 nicht unterscheidet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der basale Blutdruck somit keinen Einfluss auf die Reninsekretion hat.

Des Weiteren ist zumindest der PAR2 auch in den Kardiomyozyten exprimiert (Ide et al. 2007). Um eine Beeinflussung der Herzfrequenz durch den PAR2 zu untersuchen, wurde diese vor der Messung des Blutdrucks bestimmt. Auch hier lies sich kein genotyp-abhängiger Unterschied feststellen. Dies deckt sich ebenfalls mit den bisherigen Erkenntnissen in der Literatur (Hughes et al. 2013; McGuire et al. 2008).

2.3. Nierenfunktion

Die Kreatinin- und Ureakonzentration im Plasma und vor allem die Kreatininclearance sind typische Parameter für die Einschätzung der Nierenfunktion. Eine verminderte GFR könnte dabei auf eine verringerte Nierendurchblutung oder eine Nierenschädigung hinweisen (Levey et al. 2015). An der isoliert perfundierten Niere hebt PAR2 eine durch ANGII vermittelte Vasokonstriktion der Vas afferens auf und bedingt dadurch einen Anstieg des renalen Blutflusses und der GFR. Basal hat eine Stimulation des PAR2 kaum einen Einfluss auf die Nierendurchblutung und Filtrationsrate (Gui et al. 2003; Trottier et al. 2002). Auch *in vivo* ist basal kein Unterschied in der Plasmakreatininkonzentration beschrieben (Kazerani et al. 2004). Es gibt jedoch Befunde die zeigen, dass bei höheren Konzentrationen des PAR2-Agonisten SLIGRL die renale Durchblutung an der isoliert perfundierten Mäuseniere

gesteigert werden kann (Höcherl et al. 2011). Ein möglicher speziesabhängiger Unterschied zwischen Maus und Ratte kann hier nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Annahme, dass PAR2 basal kaum einen Effekt auf die GFR zu haben scheint. Sowohl hinsichtlich der Plasmakreatinin- als auch der Plasmaureakonzentration war kein Unterschied zwischen WT und PAR2-KO festzustellen. Zudem war die Kreatininclearance gleich.

Die Menge des ausgeschiedenen Urins und die Trinkmenge über 24 Stunden wiesen keine Unterschiede zwischen den WT- und den PAR2-KO-Tieren auf. Der PAR2 scheint deshalb keinen Einfluss auf die basale Wasserausscheidung zu haben. Geringe Abweichungen in der Urinmenge lassen sich durch Verluste durch das Auffangen des Urins im Stoffwechsellkäfig erklären.

Die Plasma- und Urinosmolarität und der Hämatokrit geben Aufschluss über die Konzentrationsfähigkeit der Nieren. Auch diese Ergebnisse liefern keine Hinweise darauf, dass PAR2 einen Einfluss auf die Fähigkeit der Niere den Harn zu konzentrieren hat.

Im Glomerulus werden im Blut befindliche Elektrolyte in den Primärharn filtriert. Ionenkanäle, Sym- und Antiporter entlang des Tubulus und des Sammelrohrs resorbieren und sezernieren Elektrolyte und erzeugen so einen osmotischen und elektrischen Diffusionsgradienten, dem weitere Elektrolyte und Wasser folgen. Einige der Ionenkanäle und Transporter können über das RAAS oder den PAR2 reguliert werden. So werden z.B. der ENaC, der ROMK und die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch Aldosteron reguliert, welches im RAAS durch ANGIO aktiviert werden kann (Achard et al. 2006). Auch ANGIO per se bedingt eine Aktivierung von z.B. $\text{Na}^+\text{/H}^+\text{-Austauschern}$, $\text{Na-Bicarbonat-Transportern}$ und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Timmermans et al. 1993). Für den PAR2 ist ebenfalls ein regulatorischer Effekt auf den ENaC und die kalziumaktivierte Chloridsekretion im Tubulus beschrieben (Bertog et al. 1999; Chraïbi et al. 1998; Ray et al. 2015; Vallet et al. 1997). Eine Analyse der Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma und Urin der Versuchstiere ergab, dass sowohl die Plasmawerte, wie auch die ausgeschiedene Na^+ - und K^+ -Menge für beide Genotypen vergleichbar waren. Die Ergebnisse entsprechen den Befunden in der Literatur (Morla et al. 2013). Deshalb scheint ein Verlust des PAR2 keinen Einfluss auf die basalen Resorptions- und Sekretionsvorgänge von Ionen in der Niere zu haben.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen sagen, dass ein Fehlen des PAR2 keinen Einfluss auf die basale Nierenfunktion zu haben scheint.

3. Akute Stimulation der Reninsekretion

Versuche mit speziellen Diäten oder typischen Stimuli dienen in der Regel dazu, die maximale Leistung beziehungsweise Leistungsfähigkeit eines Organs zu überprüfen. Bei Knockout-Modellen können daher Störungen in der Kompensation auftreten oder deutlicher zu sehen sein.

Da der PAR2 basal keinen Einfluss auf die Reninsynthese und -sekretion zu haben scheint oder dieser *in vivo* durch andere Mechanismen ausgeglichen werden könnte, wurden zum einen Versuche zum Einfluss einer Aktivierung von PAR1 oder PAR2 auf die Reninsekretion durchgeführt und zum anderen die Reninsekretion nach typischen akuten Stimuli bestimmt. Anschließend wurde die Regulation der Reninfreisetzung bei WT und PAR2-KO verglichen.

3.1. PAR1 und PAR2-Agonisten

Die Stimulation des PAR1 führt in einem *Ex Vivo*-Modell zu einem Anstieg der Reninfreisetzung, PAR1 induziert dabei möglicherweise einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, welcher zu einer erhöhten Exozytoseaktivität der JGA-Zellen führt. Nach Aktivierung des PAR2 ist eine vermehrte Reninsekretion zu beobachten, welche wahrscheinlich über NO vermittelt ist (Gui et al. 2003; Höcherl et al. 2011; Trottier et al. 2002). Um zu untersuchen, ob diese Effekte auch *in vivo* ausgelöst werden können, wurden den Versuchstieren selektive agonistische Peptide für den PAR1 (TFLLR) oder den PAR2 (SLIGRL) injiziert. Diese Agonisten weisen eine identische Aminosäuresequenz auf wie die receptoreigenen Liganden und können so den Rezeptor irreversibel aktivieren (Kawao et al. 2004). Nach Gabe des PAR2-Agonisten SLIGRL konnte ein signifikanter Anstieg der Plasmanreninkonzentration gemessen werden, wo hingegen eine Aktivierung des PAR1 durch den Agonisten TFLLR zu einem signifikanten Plasmanreninabfall führte. Eine Stimulation der Rezeptoren scheint deshalb auch *in vivo* einen Effekt auf die akute Reninfreisetzung zu haben. Andererseits könnte aber auch eine Änderung des Blutdrucks durch SLIGRL oder TFLLR die Reninsekretion beeinflussen haben. Es wurde berichtet, dass SLIGRL zu einem Blutdruckabfall und TFLLR zu einem Blutdruckanstieg führt (Damiano et al. 1999). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gemessen.

3.2. Akute Stimuli

Die akute Stimulation der Reninsekretion sollte Aufschluss darüber geben, ob der PAR2 in der akuten Freisetzung des Renins eine Rolle spielt. Eine Stimulation mit dem Vasodilatator Hydralazin (2 mg/kg), dem β -Adrenorezeptor-Agonist Isoproterenol (10 mg/kg), dem AT₁-Antagonist Losartan (3 mg/kg) oder dem Schleifendiuretikum Furosemid (40 mg/kg) führte zu einem signifikanten Anstieg der PRC in WT-Mäusen. Die Auswahl und Konzentrationen der akuten Stimuli wurden der Literatur entnommen, wo sie bei C57Bl/6-Mäusen ebenfalls zu einem ähnlich signifikanten Anstieg führten (Kim et al. 2007b). An PAR2-KOs ist die Stimulation der akuten Reninfreisetzung noch nicht beschrieben. Hydralazin, Isoproterenol und Losartan bedingten einen ähnlichen Anstieg der PRC in PAR2-KOs wie in WT. Nach Injektion des Schleifendiuretikums Furosemid (40 mg/kg) stieg die PRC bei den WT-Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant stärker an als bei den PAR2-KOs. Da der PAR2 bereits im Zusammenhang mit der Funktion des ENaC beschrieben wurde (Bertog et al. 1999; Chraïbi et al. 1998; Ray et al. 2015; Vallet et al. 1997), wäre eine mögliche Erklärung für den tendenziell geringeren Plasmareninanstieg nach akuter Furosemidgabe eine Beteiligung des PAR2 am sogenannten Connecting Tubule Glomerular Feedback (CTGF). Eine erhöhte NaCl-Konzentration führt hierbei, über einen vermehrten Natriumtransport über ENaC und nachfolgende Freisetzung von NO, PGE₂ und Epoxyeicosatrienoide Säuren, zu einer Vasodilatation der Vas afferens (Wang et al. 2012; Wang et al. 2015). Ob und wie genau der PAR2 hier eine Rolle spielt, ist jedoch nicht untersucht.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass ein PAR2-abhängiger Unterschied nach akuter Stimulation der Reninsekretion nicht festgestellt werden konnte. PAR2 scheint deshalb nicht an der akut vermehrten Reninfreisetzung beteiligt zu sein.

Der Hämatokrit war nach Isoproterenol-, Hydralazin- und Losartangabe bei beiden Genotypen unverändert. Die Applikation von Furosemid führte genotyp-unabhängig zu einem signifikanten Anstieg des Hämokrits, was auf die vermehrte Wasserausscheidung zurückzuführen ist und somit eine effektive Wirkung von Furosemid bestätigt (Morla et al. 2013; Rowland et al. 2003).

4. Chronische Stimulation der Reninsynthese und -sekretion

Da eine Stimulation des PAR2 mittels SLIGRL zu einem Anstieg der Reninfreisetzung führte, aber bei einer akuten Stimulation der Reninfreisetzung durch verschiedene Stimuli kein PAR2-abhängiger Unterschied zu sehen war, wurde in der vorliegenden Arbeit die

Reninregulation, Nierenfunktion und Elektrolyt- und Wasserausscheidung unter bekannten chronischen Stimuli der Reninsynthese und -sekretion, wie verminderter NaCl-Zufuhr, einem Schleifendiuretikum und einem AT₁-Antagonisten, analysiert.

4.1. Reninsynthese und -sekretion

Eine chronische Gabe von Furosemid bedingt durch eine Blockade des NKCC2-Cotransporters eine vermehrte Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser über die Niere sowie einen Blutdruckabfall (Limmer et al. 2015). Diesem wird durch einen Anstieg der Reninsynthese und -sekretion entgegengewirkt. Ein Anstieg der Reninsynthese und -sekretion bei chronischer Furosemidgabe wird auch in der Literatur für WT-Mäuse beschrieben (Nüsing et al. 2005; Rowland et al. 2003; Schweda et al. 2003). Die Reninbildung und -freisetzung der PAR2-KOs verhielt sich ähnlich wie die der WT.

Seit langem ist die salzabhängige Regulation des Renins bekannt. Eine Diät mit Niedrigsalz- und Hochsalzfutter über 7 Tage führte zu dem Ergebnis, dass die Reninsynthese und -freisetzung unter Niedrigsalzbedingungen, im Vergleich zu einer Hochsalzdiät, signifikant erhöht war. Dies entspricht den bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Auswirkung einer veränderten Salzaufnahme auf die Reninbildung und -freisetzung bei WT (Hildebrandt et al. 2014; Schweda et al. 2003). Die veränderte Kochsalzzufuhr führt zu einer Veränderung der NaCl-Konzentration im Harn, was über den Macula densa-Mechanismus die Regulation der Reninsekretion beeinflusst (Kim et al. 2006; Lorenz et al. 1991; Peti-Peterdi et al. 2010; Wagner et al. 1998). Bei den PAR2-KOs war ebenfalls eine salzabhängige Regulation zu sehen, jedoch war diese schwächer ausgeprägt als bei den WT. Der Grund dafür ist unbekannt. Möglicherweise kommt es bei einer verminderten oralen Kochsalzzufuhr zur Bildung von Proteasen, die den PAR2 aktivieren können. Bisher ist aber keine PAR2-aktivierende Protease bekannt, die bei einer verminderten oralen NaCl-Zufuhr vermehrt gebildet wird. Mögliche Kandidaten könnten dabei Kallikreine sein, da diese in den Nieren in einer salzabhängigen Weise reguliert werden (Weinberg et al. 1987). Dies bedarf jedoch weiterführende Untersuchungen.

Nach einer chronische Applikation von Losartan konnte ebenfalls ein Anstieg der Reninbildung und -freisetzung festgestellt werden. Eine Blockade des AT₁-Rezeptors bewirkt zum einen eine Unterbrechung des negative Feedbacks von ANGII auf die Reninsynthese, zum anderen bedingt Losartan einen Blutdruckabfall. Beide Effekte führen zu einer vermehrten Reninausschüttung (Hackenthal et al. 1990; Kurtz et al. 1999; Unger et al. 1996). Durch eine zusätzliche verminderte Salzaufnahme konnte der Effekt des Losartans

auf die Reninsekretion zusätzlich verstärkt werden, da ein zusätzlicher Blutdruckabfall die Reninfreisetzung ebenfalls stimuliert. Dieser reninstimulierende Effekt einer Blockade des AT₁-Rezeptors bei normaler und verminderter Kochsalzzufuhr ist bei WT bereits bekannt (Chen et al. 2010; Schmid et al. 2013). Die Reninregulation der PAR2-KOs war vergleichbar mit den WT. Die vermehrte Reninsynthese und -sekretion findet dabei nicht ausschließlich in vorhandenen JG-Zellen statt. Zusätzlich wurden, wie auch bereits in der Literatur beschrieben (Chen et al. 2007b; Gomez et al. 1990b; Sequeira Lopez et al. 2004; Taugner et al. 1984), glatte Muskelzellen rekrutiert und zu JG-Zellen umgewandelt (siehe Abb. 32-34). Zusammenfassend war die Reninregulation bei allen Versuchen, unabhängig eines funktionsfähigen PAR2, für beide Genotypen vergleichbar. In der vorliegenden Arbeit konnte somit kein Effekt des PAR2 auf die chronische Regulation der Reninfreisetzung bei den verwendeten Stimuli gefunden werden.

4.2. Kardiovaskulär

Der Blutdruck ist eine wichtige Determinante der Reninbildung und -freisetzung. Er wurde in der Arbeit unter Nidrigsalzdiät, Losartangabe und unter Losartangabe bei einer zusätzlichen verminderten Kochsalzzufuhr gemessen. Nach Blockade des AT₁-Rezeptors konnte ein Abfall des Blutdrucks gemessen werden. ANGII führt über die RAAS-Kaskade zu einer Vasokonstriktion und vermehrten Elektrolyt- und Wasserresorption. Werden diese blutdrucksteigernden Effekte blockiert, fällt der Blutdruck ab. An WT ist dieser Effekt gut beschrieben (Castrop 2015; Castrop et al. 2010; Timmermans et al. 1993). Für PAR2-KOs gibt es hingegen noch keine veröffentlichten Ergebnisse. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass der Blutdruck ähnlich wie bei den WT abfällt. Ein zusätzlicher Blutdruckabfall bei Losartan konnte durch die zusätzliche Verabreichung einer Nidrigsalzdiät hervorgerufen werden. Eine verminderte Salzzufuhr alleine führte jedoch zu keinem signifikanten Abfall des Blutdrucks. Dies entspricht den bereits beschriebenen Ergebnissen der telemetrischen und der Tail-Cuff-Messung an WT (Combe et al. 2016; Machura et al. 2012). Eine Arbeit beschreibt einen Blutdruckabfall unter Nidrigsalzbedingungen, wobei dieser bei PAR2-KOs geringer ausgeprägt ist, als bei WT (Morla et al. 2013). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Blutdruckregulation scheint ebenfalls kaum durch den PAR2 beeinflusst zu sein, da auch hier kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei chronisch verwendeten Stimuli der Blutdruck bei PAR2-KOs ähnlich reguliert wird wie bei WT.

Die Herzfrequenz war bei allen Versuchstieren, unabhängig des Genotyps und der Behandlung vergleichbar und in einem physiologischen Rahmen. Auch in der Literatur sind für die verwendeten chronischen Stimuli bei WT keine Unterschiede in der Herzfrequenz beschrieben (Combe et al. 2016; Melo et al. 1999).

4.3. Nierenfunktion

Als Indikator für eine Nierenfunktionsstörung wurde die Plasmakreatininkonzentration bestimmt. Unter chronischer Furosemidgabe war die Plasmakreatininkonzentration im Vergleich zur Kontrolle ähnlich. Die Kreatininclearance war jedoch deutlich erhöht, was durch die vermehrte Wasser- und damit auch Kreatininausscheidung nach Blockade des NKCC2 bedingt ist und für WT bereits in der Literatur beschrieben ist (Kemter et al. 2010). Für PAR2-KOs wurden vergleichbare Kreatininwerte gemessen. Die Plasmaureakonzentration ist ein weiterer Indikator für die Nierenfunktion und war bei WT und PAR2-KO gleichermaßen erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Rückresorption von Urea (Kim 2006) in Verbindung mit der vermehrten Wasserausscheidung unter Furosemid (Limmer et al. 2015; Nüsing et al. 2005) zu erhöhten Plasmawerten führt. Die Urinausscheidung und Trinkmenge war unter Furosemidgabe erwartungsgemäß (Nüsing et al. 2005) massiv erhöht, was auf die Blockade des NKCC2 und die damit verbundene geringere Resorption von Natrium und in Folge dessen von Wasser zurückzuführen ist (Limmer et al. 2015). Auch der Hämatokrit war durch den massiven Wasserverlust bei beiden Genotypen erhöht, was mit bisher beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt (Rowland et al. 2003). Die Urinosmolarität war, wie bereits in der Literatur beschrieben (Kemter et al. 2010; Limmer et al. 2015), unter Furosemid auf Grund der massiven Wasserausscheidung verringert. Die Plasmanatriumkonzentration konnte unter chronischer Furosemidgabe (1,2 mg/d) durch die Aufnahme einer isotonen Kochsalzlösung, welche den Tieren zusätzlich zum Trinkwasser zur Verfügung stand, aufrecht erhalten werden. Die Kaliumkonzentration im Plasma sank hingegen signifikant ab. Während im Urin unter Furosemidgabe ein signifikanter Anstieg der Na^+ - und K^+ -Konzentration zu beobachten war. Die vermehrte Elektrolytausscheidung ist durch die Blockade des NKCC2 bedingt. Die Effekte von Furosemid auf die Elektrolytkonzentration in Plasma und Urin sind bei WT bereits beschrieben (Nüsing et al. 2005). Für PAR2-KOs sind bisher keine Daten veröffentlicht, die Werte sind jedoch mit denen der WT vergleichbar, was gegen einen Einfluss von PAR2 auf die Nierenfunktion unter Furosemid spricht.

Unter Hochsalzdiät ist die Kreatininausscheidung höher als unter Niedrigsalzbedingungen, was eine verminderte Plasmakreatininkonzentration und eine erhöhte Kreatininclearance zur Folge hat. Auch hier ist dieser Effekt für WT bereits bekannt (Cholewa et al. 2001). Die Plasmaureakonzentration war unter den verschiedenen Salzdiäten bei beiden Genotypen unverändert gegenüber den Kontrollen. Da im Gegensatz zu Kreatinin Urea im Tubulus rückresorbiert wird (Kim 2006), könnte dies der Grund für eine gleichbleibende Plasmaureakonzentration bei veränderter Kreatininkonzentration sein. Die Urinausscheidung stieg unter vermehrter Kochsalzzufuhr deutlich an im Vergleich zu einer verminderten NaCl-Zufuhr. Eine chronisch vermehrte Salzaufnahme führt zu einer erhöhten Ausscheidung der Elektrolyte und damit verbunden auch zu einer vermehrten Wasserausscheidung, wie bereits in der Literatur dargestellt (Mangrum et al. 2002). Die Urinosmolarität war bei vermehrter Salzzufuhr geringer als unter verminderter Salzzufuhr. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die vermehrte Wasserausscheidung unter Hochsalzbedingungen einen größeren Effekt auf die Urinosmolarität hat als die verminderte Elektrolytausscheidung unter Niedrigsalzbedingungen (Makhanova et al. 2008). Die Plasmaosmolarität und der Hämatokrit waren unverändert unter den verschiedenen Salzdiäten. Bei einer verminderten beziehungsweise vermehrten NaCl-Aufnahme konnte von den Versuchstieren beider Genotypen die Na⁺-Konzentration im Plasma reguliert werden. Die Plasmakaliumkonzentration und die Na⁺- und K⁺-Ausscheidung waren bei beiden Genotypen unter Hochsalzbedingungen signifikant höher als unter Niedrigsalzbedingungen. Die salzabhängige Elektrolytausscheidung wird durch den Macula-densa-Mechanismus und die Beeinflussung des Blutdrucks reguliert (Lorenz et al. 1991; O'Shaughnessy et al. 2006) und entspricht auch hier den Ergebnissen in der Literatur (Mangrum et al. 2002). In der Literatur ist ein PAR2-abhängiger Unterschied in der Natriumausscheidung unter Niedrigsalzbedingungen beschrieben. PAR2-KOs scheiden mehr Natrium aus als WT. Dieser Effekt verliert sich jedoch ab Tag 7 (Morla et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied gesehen werden. Zusammenfassend konnte kein Unterschied in der Nierenfunktion zwischen den Genotypen bei Hoch- beziehungsweise Niedrigsalzdiät beobachtet werden.

Unter Losartangabe mit und ohne zusätzlicher verminderter Kochsalzzufuhr war keine Veränderung der Nierenfunktion zu beobachten. Die Plasmakreatinin- und die Plasmaureakonzentration war unter Losartan bei beiden Genotypen unverändert gegenüber den Kontrollen. In der Urinausscheidung und Trinkmenge konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Eine PAR2 abhängige Änderung der

Urinausscheidung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Auch die Plasmaosmolarität und der Hämatokrit wiesen genotyp-unabhängig gleiche Werte auf, welche sich in einem physiologischen Rahmen bewegten. Unter Losartan war die Urinosmolarität vergleichbar mit der der Kontrolltiere, wo hingegen bei zusätzlicher verminderter Kochsalzzufuhr eine reduzierte Urinosmolarität auf Grund der verminderten Elektrolytausscheidung beobachtet werden konnte. Auch die Urinosmolarität scheint ein PAR2-unabhängig regulierter Parameter zu sein, da keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt wurden. Die Plasmaelektrolytkonzentration war bei Losartangabe mit normaler und verminderter NaCl-Aufnahme und unabhängig des Genotyps vergleichbar mit den Kontrolltieren. Die Urinausscheidung von Natrium und Kalium war bei zusätzlicher Niedrigsalzdiät bei WT und PAR2-KO, auf Grund der geringeren Aufnahme der Elektrolyte, vermindert. Bei alleiniger Losartangabe wurde bei den PAR2-KO-Mäusen eine signifikant niedrigere Urinkonzentration von Natrium und Kalium gemessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der PAR2, abgesehen von der geringeren Na⁺- und K⁺-Ausscheidung bei PAR2-KO-Mäusen unter Losartangabe, keinen Einfluss auf die Nierenfunktion hat.

4.6. Aldosteronkonzentration

Da eine Niedrigsalzdiät bei WT zu einem größeren Anstieg der Reninsekretion führte als bei PAR2-KOs, wurde zur Kontrolle dieses Ergebnisses die Plasmakonzentration von Aldosteron unter verminderter Salzzufuhr bestimmt. Die Aldosteronkonzentration war bei verminderter Kochsalzzufuhr gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Durch den Macula-densa-Mechanismus und den verminderten Blutdruck (Lorenz et al. 1991; O'Shaughnessy et al. 2006) kommt es zu einer Aktivierung des RAAS, was zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration führt, wie er für WT bereits beschrieben ist (Chiga et al. 2008; Nakagawa et al. 2016). Bei einer zusätzlichen Losartanapplikation sank die Aldosteronkonzentration wieder, was durch die Blockade des AT₁-Rezeptors in der RAAS-Kaskade zu erwarten war und ein bereits beschriebener Effekt ist (Volpe et al. 1995). Allerdings war hier bei den WT ein signifikant stärkerer Abfall in der Aldosteronkonzentration zu sehen als bei den PAR2-KOs. Da kein Unterschied in der Plasmakaliumkonzentration gemessen wurde, könnte der Effekt auf Aldosteron durch andere Faktoren, welche die Sekretion von Aldosteron regulieren, wie z.B. ANP oder ACTH hervorgerufen werden. Diese Annahme muss jedoch erst noch untersucht werden. Des Weiteren wurde die Expression von PAR1 in der Nebenniere und ein Einfluss des PAR1 auf

die Aldosteronsekretion beschrieben (Raven et al. 2001). Eine Auswirkung eines Funktionsverlustes des PAR2 auf die Aldosteronsekretion scheint unwahrscheinlich, da PAR2 nicht in der Zona glomerulosa exprimiert wird. Nach alleiniger Gabe von Losartan konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Da in der Aldosteronkonzentration bei Nidrigsalzdiät mit Losartangabe ein Unterschied zwischen PAR2 und WT festgestellt werden konnte und der ENaC durch Aldosteron stimuliert werden kann (Nesterov et al. 2012), wurde die Expression des Kanals bestimmt. Das Ergebnis wies jedoch keinen Unterschied in der ENaC-Expression der beiden Genotypen auf.

4.7. PAR1- und PAR2-Expression

Wäre die Expression von PAR1 oder PAR2 unter den verwendeten chronischen Stimuli der Reninfreisetzung verändert, könnte dies einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben. Bei den verwendeten chronischen Stimulationen konnte in der Expression des PAR1 und des PAR2 in den Nierenrinden von WT kein Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden.

5. Ausblick

Die PAR1 und 2 scheinen unter physiologischen Bedingungen und nach Stimulation der Reninsynthese und -sekretion durch übliche Stimuli in einem gesunden Organismus *in vivo* nicht an der Regulation der Reninsynthese und -sekretion beteiligt zu sein. Durch direkte Stimulation der Rezeptoren mittels Agonisten konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Effekt von PAR1 und PAR2 auf die Reninsekretion möglich ist. PAR1 und PAR2 sind im Zusammenhang mit atherosklerotischen und proinflammatorischen Prozessen beschrieben. Dies lässt die Vermutung zu, dass PAR1 und PAR2 unter pathologisch veränderten Bedingungen eine Rolle in der Regulation der Reninsynthese und -freisetzung und des Blutdrucks spielen können. Eine Aktivierung des PAR2 durch die Mastzelltryptase bei chronischen Entzündungen (Mack et al. 2009) oder durch Dipeptidyl peptidase-4 (DDP-4) und Chitinase-3 like protein 1 (CH3L1) bei Diabetes mellitus oder metabolischem Syndrom (Kagota et al. 2016) wären mögliche Beeinflussungen der PARs durch pathologische Prozesse.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung der Hypertonie nimmt an Bedeutung zu, da Bluthochdruck in den Industrieländern ein weit verbreitetes Problem darstellt. Von zentraler Bedeutung hierbei ist die Regulation der Reninsekretion, welche über das RAAS entscheidend auf die Regulation des Blutdrucks einwirkt. Die bisherigen Therapieansätze zur Behandlung der Hypertonie über Regulation des RAAS beziehen sich auf eine Beeinflussung der ANGII-Synthese oder -Wirkung. Ein früheres Eingreifen in die Kaskade könnte möglicherweise die Nebenwirkungen der Therapie reduzieren. Die Protease-aktivierten Rezeptoren stellen eine vielversprechende Möglichkeit hierfür dar, da sie spezifisch agonisiert und antagonisiert werden können. In Säugetieren existieren insgesamt vier Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR1, 2, 3 und 4), wovon PAR1, PAR2 und PAR4 in der Niere nachgewiesen werden können. Die Rolle von PAR4 ist jedoch noch unklar. Für PAR1 und PAR2 konnte in *ex vivo* Modellen ein möglicher Einfluss auf die Reninsekretion nachgewiesen werden. Dies legt die Frage nahe, welche Bedeutung der PAR1 und der PAR2 *in vivo* bei der Regulation der Reninsynthese und -sekretion haben. Um dies zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Evaluierung des Einflusses der PARs auf die Reninbildung und -freisetzung, die Nierenfunktion und die Blutdruckhomöostase mittels einer generierten PAR2-defizienten Mauslinie durchgeführt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei den PAR2-KO-Tieren, entgegen der Hypothese, kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Reninsynthese und -sekretion gefunden werden konnte. Weder basal noch unter typischen akuten und chronischen Stimuli der Reninsekretion, konnte unter physiologischen Bedingungen ein PAR2-abhängiger Unterschied nachgewiesen werden. Der PAR2 scheint entweder keinen Effekt auf die Reninbildung und -freisetzung zu haben, oder das Fehlen des Rezeptors kann unter physiologischen Bedingungen kompensiert werden. Durch eine direkte Stimulation von PAR1 und PAR2 durch selektiv agonistische Peptide konnte jedoch ein Effekt an der Reninfreisetzung provoziert werden.

Da der PAR1 und der PAR2 im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen wie z.B. entzündlichen und atherosklerotischen Prozessen oder Diabetes mellitus beschrieben ist, legt dies die Vermutung nahe, dass PARs unter pathologischen Bedingungen eine Rolle in der Reninsekretion und -synthese spielen könnten.

VIII. SUMMARY

The development of new therapeutic strategies for the treatment of hypertension gains in importance, as high blood pressure is a common problem in industrialized countries. The regulation of renin secretion plays a prominent role in this case, because it has an influence on the regulation of the blood pressure via the RAAS. The previous therapeutic strategies for the treatment of hypertension via the regulation of the RAAS refer to the influence on the synthesis or the effect of ANGII. An earlier access to the cascade possibly could reduce the side effects of the therapy. The protease-activated receptors show great promise for this, because they can be agonized and antagonized specifically. In mammals exist four protease-activated receptors (PAR1, 2, 3 and 4), whereof PAR1, PAR2 and PAR4 are expressed in the kidney. The role of PAR4 is still unclear. For PAR1 and PAR2 a possible effect on the renin secretion is proven in an *ex vivo* model. This raise the question what relevance the PAR1 and the PAR2 have in the *in vivo* regulation of the renin synthesis and secretion. Experiments with a PAR2-deficient mouse line were executed to evaluate the effect of the PARs on the renin synthesis and secretion, the renal function und the blood pressure homeostasis.

In summary no evidence could be detected that the PAR2 has an effect on the renin synthesis and secretion. Neither basal nor under typical akute and chronic stimuli of the renin secretion, a PAR2-dependent difference could be detected. The PAR2 seems to have no effect on the renin synthesis and secretion or the absense of the receptor can be compensated under physiological conditions. However a direct stimulation of the PAR1 or the PAR2 with specific agonists could prompt an effect on the renin secretion.

Since the PAR1 and the PAR2 are described in connection with pathologic changes like for example inflammatory and atherosclerotic processes or diabetes mellitus, this suggests that the PARs figure into renin synthesis and secretion under pathologic conditions.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Uncategorized References

Achard J. M., Hadchouel J., Faure S., Jeunemaitre X. (2006). "Inherited sodium avid states." Adv Chronic Kidney Dis **13**(2): 118-23.

al-Ani B., Saifeddine M., Hollenberg M. D. (1995). "Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle." Can J Physiol Pharmacol **73**(8): 1203-7.

Baldwin J. M. (1994). "Structure and function of receptors coupled to G proteins." Curr Opin Cell Biol **6**(2): 180-90.

Barajas L., Salido E. (1986). "Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system." Lab Invest **54**(4): 361-4.

Barnes J. A., Singh S., Gomes A. V. (2004). "Protease activated receptors in cardiovascular function and disease." Mol Cell Biochem **263**(1-2): 227-39.

Barrett P. B., Harwood J. L. (1998). "Characterization of fatty acid elongase enzymes from germinating pea seeds." Phytochemistry **48**(8): 1295-304.

Beavo J. A. (1995). "cGMP inhibition of heart phosphodiesterase: is it clinically relevant?" J Clin Invest **95**(2): 445.

Bernardi S., Michelli A., Zuolo G., Candido R., Fabris B. (2016). "Update on RAAS Modulation for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Disease." J Diabetes Res **2016**: 8917578.

Bertog M., Letz B., Kong W., Steinhoff M., Higgins M. A., Bielfeld-Ackermann A., Fromter E., Bunnett N. W., Korbmayer C. (1999). "Basolateral proteinase-activated receptor (PAR-2) induces chloride secretion in M-1 mouse renal cortical collecting duct cells." J Physiol **521 Pt 1**: 3-17.

Bodin P., Burnstock G. (2001). "Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular." J Cardiovasc Pharmacol **38**(6): 900-8.

Boivin V., Jahns R., Gambaryan S., Ness W., Boege F., Lohse M. J. (2001). "Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney." Kidney Int **59**(2): 515-31.

Bono F., Lamarche I., Herbert J. M. (1997). "Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2)." Biochem Biophys Res Commun **241**(3): 762-4.

Camerer E., Huang W., Coughlin S. R. (2000). "Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5255-60.

- Campean V., Theilig F., Paliege A., Breyer M., Bachmann S. (2003). "Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse)." Am J Physiol Renal Physiol **285**(1): F19-32.
- Carey R. M., McGrath H. E., Pentz E. S., Gomez R. A., Barrett P. Q. (1997). "Biomechanical coupling in renin-releasing cells." J Clin Invest **100**(6): 1566-74.
- Castrop H. (2007). "Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine." Acta Physiol (Oxf) **189**(1): 3-14.
- Castrop H. (2015). "A role for AT1 receptor-associated proteins in blood pressure regulation." Curr Opin Pharmacol **21**: 43-7.
- Castrop H., Höcherl K., Kurtz A., Schweda F., Todorov V., Wagner C. (2010). "Physiology of kidney renin." Physiol Rev **90**(2): 607-73.
- Castrop H., Huang Y., Hashimoto S., Mizel D., Hansen P., Theilig F., Bachmann S., Deng C., Briggs J., Schnermann J. (2004). "Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice." J Clin Invest **114**(5): 634-42.
- Chen K., Carey L. C., Valego N. K., Rose J. C. (2007a). "Thyroid hormone replacement normalizes renal renin and angiotensin receptor expression in thyroidectomized fetal sheep." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(2): R701-6.
- Chen L., Kim S. M., Eisner C., Oppermann M., Huang Y., Mizel D., Li L., Chen M., Sequeira Lopez M. L., Weinstein L. S., Gomez R. A., Schnermann J., Briggs J. P. (2010). "Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is G α -dependent." J Am Soc Nephrol **21**(6): 986-92.
- Chen L., Kim S. M., Oppermann M., Faulhaber-Walter R., Huang Y., Mizel D., Chen M., Lopez M. L., Weinstein L. S., Gomez R. A., Briggs J. P., Schnermann J. (2007b). "Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein G α in juxtaglomerular cells." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F27-37.
- Cheung W. M., Andrade-Gordon P., Derian C. K., Damiano B. P. (1998). "Receptor-activating peptides distinguish thrombin receptor (PAR-1) and protease activated receptor 2 (PAR-2) mediated hemodynamic responses *in vivo*." Can J Physiol Pharmacol **76**(1): 16-25.
- Chiga M., Rai T., Yang S. S., Ohta A., Takizawa T., Sasaki S., Uchida S. (2008). "Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone." Kidney Int **74**(11): 1403-9.
- Chiu T., Reid I. A. (1996). "Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion." J Pharmacol Exp Ther **278**(2): 793-9.
- Cholewa B. C., Mattson D. L. (2001). "Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(3): R987-93.

Chraïbi A., Vallet V., Firsov D., Hess S. K., Horisberger J. D. (1998). "Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus oocytes*." J Gen Physiol **111**(1): 127-38.

Clapham D. E., Neer E. J. (1997). "G protein beta gamma subunits." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 167-203.

Cohen Y., Rahamimov R., Naveh-Many T., Silver J., Rahamimoff R. (1997). "Where is the "inverting factor" in hormone secretion from parathyroid cells?" Am J Physiol **273**(3 Pt 1): E631-7.

Combe R., Mudgett J., El Fertak L., Champy M. F., Ayme-Dietrich E., Petit-Demouliere B., Sorg T., Herault Y., Madwed J. B., Monassier L. (2016). "How Does Circadian Rhythm Impact Salt Sensitivity of Blood Pressure in Mice? A Study in Two Close C57Bl/6 Substrains." PLoS One **11**(4): e0153472.

Connolly A. J., Ishihara H., Kahn M. L., Farese R. V., Jr., Coughlin S. R. (1996). "Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor." Nature **381**(6582): 516-9.

Coughlin S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-64.

Coughlin S. R. (2005). "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology." J Thromb Haemost **3**(8): 1800-14.

D'Andrea M. R., Derian C. K., Leturcq D., Baker S. M., Brunmark A., Ling P., Darrow A. L., Santulli R. J., Brass L. F., Andrade-Gordon P. (1998). "Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues." J Histochem Cytochem **46**(2): 157-64.

Damiano B. P., Cheung W. M., Santulli R. J., Fung-Leung W. P., Ngo K., Ye R. D., Darrow A. L., Derian C. K., de Garavilla L., Andrade-Gordon P. (1999). "Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (PAR-2) and thrombin receptor (PAR-1) are distinguished in mice deficient in PAR-2 or PAR-1." J Pharmacol Exp Ther **288**(2): 671-8.

Davis J. O., Freeman R. H. (1976). "Mechanisms regulating renin release." Physiol Rev **56**(1): 1-56.

Dery O., Corvera C. U., Steinhoff M., Bunnnett N. W. (1998). "Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases." Am J Physiol **274**(6 Pt 1): C1429-52.

Deschepper C. F., Mellon S. H., Cumin F., Baxter J. D., Ganong W. F. (1986). "Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7552-6.

El-Daly M., Saifeddine M., Mihara K., Ramachandran R., Triggle C. R., Hollenberg M. D. (2014). "Proteinase-activated receptors 1 and 2 and the regulation of porcine coronary artery contractility: a role for distinct tyrosine kinase pathways." Br J Pharmacol **171**(9): 2413-25.

Fray J. C. (1976). "Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney." Am J Physiol **231**(3): 936-44.

Friis U. G., Jensen B. L., Sethi S., Andreasen D., Hansen P. B., Skott O. (2002). "Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases." Circ Res **90**(9): 996-1003.

Friis U. G., Madsen K., Stubbe J., Hansen P. B., Svenningsen P., Bie P., Skott O., Jensen B. L. (2013). "Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells." Pflugers Arch **465**(1): 25-37.

Friis U. G., Stubbe J., Uhrenholt T. R., Svenningsen P., Nusing R. M., Skott O., Jensen B. L. (2005). "Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells." Am J Physiol Renal Physiol **289**(5): F989-97.

Gambaryan S., Wagner C., Smolenski A., Walter U., Poller W., Haase W., Kurtz A., Lohmann S. M. (1998). "Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 9003-8.

Gomez R. A., Chevalier R. L., Carey R. M., Peach M. J. (1990a). "Molecular biology of the renal renin-angiotensin system." Kidney Int Suppl **30**: S18-23.

Gomez R. A., Chevalier R. L., Everett A. D., Elwood J. P., Peach M. J., Lynch K. R., Carey R. M. (1990b). "Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys." Am J Physiol **259**(4 Pt 2): F660-5.

Grunberger C., Obermayer B., Klar J., Kurtz A., Schweda F. (2006). "The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6." Circ Res **99**(11): 1197-206.

Gui Y., Loutzenhiser R., Hollenberg M. D. (2003). "Bidirectional regulation of renal hemodynamics by activation of PAR1 and PAR2 in isolated perfused rat kidney." Am J Physiol Renal Physiol **285**(1): F95-104.

Hackenthal E., Paul M., Ganten D., Taugner R. (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-116.

Hano T., Shiotani M., Baba A., Ura M., Nakamura Y., Tomobuchi Y., Nishio I., Masuyama Y. (1990). "Contribution of calmodulin and protein kinase C to renin release in spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **3**(8 Pt 2): 206S-209S.

Hautmann M., Friis U. G., Desch M., Todorov V., Castrop H., Segerer F., Otto C., Schutz G., Schweda F. (2007). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors." J Am Soc Nephrol **18**(4): 1150-6.

Hees H., Sinowatz F. (2000). Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie ; [mit 12 Schemata und 15 Tabellen], Dt. Ärzte-Verlag.

- Henriksen R. A., Hanks V. K. (2002). "PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(5): 861-6.
- Hildebrandt D. A., Irwin E. D., Cates A. W., Lohmeier T. E. (2014). "Regulation of renin secretion and arterial pressure during prolonged baroreflex activation: influence of salt intake." Hypertension **64**(3): 604-9.
- Höcherl K., Gerl M., Schweda F. (2011). "Proteinase-activated receptors 1 and 2 exert opposite effects on renal renin release." Hypertension **58**(4): 611-8.
- Hollenberg M. D., Saifeddine M., al-Ani B., Kawabata A. (1997). "Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides." Can J Physiol Pharmacol **75**(7): 832-41.
- Hollenberg, Trejo: Proteinase-activated receptors: PAR1 (2016), <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=347> (Stand: 13.02.2017)
- Hughes K. H., Wijekoon E. P., Valcour J. E., Chia E. W., McGuire J. J. (2013). "Effects of chronic in-vivo treatments with protease-activated receptor 2 agonist on endothelium function and blood pressures in mice." Can J Physiol Pharmacol **91**(4): 295-305.
- Hunt M. K., Ramos S. P., Geary K. M., Norling L. L., Peach M. J., Gomez R. A., Carey R. M. (1992). "Colocalization and release of angiotensin and renin in renal cortical cells." Am J Physiol **263**(3 Pt 2): F363-73.
- Ichihara A., Suzuki H., Murakami M., Naitoh M., Matsumoto A., Saruta T. (1995). "Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells." Eur J Endocrinol **133**(5): 569-77.
- Ide J., Aoki T., Ishivata S., Glusa E., Strukova S. M. (2007). "Proteinase-activated receptor agonists stimulate the increase in intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes and proliferation of cardiac fibroblasts from chick embryos." Bull Exp Biol Med **144**(6): 760-3.
- Inscho E. W. (2001). "P2 receptors in regulation of renal microvascular function." Am J Physiol Renal Physiol **280**(6): F927-44.
- Inscho E. W., Cook A. K., Navar L. G. (1996). "Pressure-mediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoceptor activation." Am J Physiol **271**(5 Pt 2): F1077-85.
- Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R. (1997). "Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans." Nature **386**(6624): 502-6.
- Jensen B. L., Kramer B. K., Kurtz A. (1997a). "Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells." Hypertension **29**(5): 1148-55.
- Jensen B. L., Rasch R., Nyengaard J. R., Skott O. (1997b). "Giant renin secretory granules in beige mouse renal afferent arterioles." Cell Tissue Res **288**(2): 399-406.

- Jutras I., Reudelhuber T. L. (1999). "Prorenin processing by cathepsin B *in vitro* and in transfected cells." FEBS Lett **443**(1): 48-52.
- Kageyama S., Brown J. (1990). "Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated glomeruli." Biochem Biophys Res Commun **168**(1): 37-42.
- Kagota S., Maruyama K., McGuire J. J. (2016). "Characterization and Functions of Protease-Activated Receptor 2 in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review." Biomed Res Int **2016**: 3130496.
- Kataoka H., Hamilton J. R., McKemy D. D., Camerer E., Zheng Y. W., Cheng A., Griffin C., Coughlin S. R. (2003). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells." Blood **102**(9): 3224-31.
- Kawao N., Ikeda H., Kitano T., Kuroda R., Sekiguchi F., Kataoka K., Kamanaka Y., Kawabata A. (2004). "Modulation of capsaicin-evoked visceral pain and referred hyperalgesia by protease-activated receptors 1 and 2." J Pharmacol Sci **94**(3): 277-85.
- Kazerani H. R., Plevin R., Kawagoe J., Kanke T., Furman B. L. (2004). "Lack of effect of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) deletion on the pathophysiological changes produced by lipopolysaccharide in the mouse: comparison with dexamethasone." J Pharm Pharmacol **56**(8): 1015-20.
- Keeton T. K., Campbell W. B. (1980). "The pharmacologic alteration of renin release." Pharmacol Rev **32**(2): 81-227.
- Kemter E., Rathkolb B., Bankir L., Schrewe A., Hans W., Landbrecht C., Klaften M., Ivandic B., Fuchs H., Gailus-Durner V., Hrabe de Angelis M., Wolf E., Wanke R., Aigner B. (2010). "Mutation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia." Am J Physiol Renal Physiol **298**(6): F1405-15.
- Khan T. A., Bianchi C., Voisine P., Sandmeyer J., Feng J., Sellke F. W. (2005). "Aprotinin inhibits protease-dependent platelet aggregation and thrombosis." Ann Thorac Surg **79**(5): 1545-50.
- Kim D. U. (2006). "Long-Term Regulation of Renal Urea Transporters during Antidiuresis." Electrolyte Blood Press **4**(1): 18-22.
- Kim S. M., Chen L., Faulhaber-Walter R., Oppermann M., Huang Y., Mizel D., Briggs J. P., Schnermann J. (2007a). "Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors." Hypertension **50**(1): 103-9.
- Kim S. M., Chen L., Mizel D., Huang Y. G., Briggs J. P., Schnermann J. (2007b). "Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F415-22.
- Kim S. M., Mizel D., Huang Y. G., Briggs J. P., Schnermann J. (2006). "Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion." Am J Physiol Renal Physiol **290**(5): F1016-23.

Klarenbach S. W., Chipiuk A., Nelson R. C., Hollenberg M. D., Murray A. G. (2003). "Differential actions of PAR2 and PAR1 in stimulating human endothelial cell exocytosis and permeability: the role of Rho-GTPases." Circ Res **92**(3): 272-8.

Klinke R., Baumann R. (2010). Physiologie, Thieme.

Kobilka B. K. (2007). "G protein coupled receptor structure and activation." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 794-807.

Komlosi P., Peti-Peterdi J., Fuson A. L., Fintha A., Rosivall L., Bell P. D. (2004). "Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake." Am J Physiol Renal Physiol **286**(6): F1054-8.

Ku D. D., Dai J. (1997). "Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response *in vitro*." J Cardiovasc Pharmacol **30**(5): 649-57.

Kurtz A. (2011). "Renin release: sites, mechanisms, and control." Annu Rev Physiol **73**: 377-99.

Kurtz A., Della Bruna R., Pfeilschifter J., Bauer C. (1988a). "Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release." Kidney Int **33**(4): 798-803.

Kurtz A., Della Bruna R., Pfeilschifter J., Taugner R., Bauer C. (1986a). "Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4769-73.

Kurtz A., Della Bruna R., Pratz J., Cavero I. (1988b). "Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release." J Cardiovasc Pharmacol **12**(6): 658-63.

Kurtz A., Muff R., Born W., Lundberg J. M., Millberg B. I., Gnadinger M. P., Uehlinger D. E., Weidmann P., Hokfelt T., Fischer J. A. (1988c). "Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion." J Clin Invest **82**(2): 538-43.

Kurtz A., Penner R. (1989). "Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3423-7.

Kurtz A., Pfeilschifter J., Bauer C. (1984). "Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?" Biochem Biophys Res Commun **124**(2): 359-66.

Kurtz A., Pfeilschifter J., Hutter A., Buhle C., Nobiling R., Taugner R., Hackenthal E., Bauer C. (1986b). "Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors." Am J Physiol **250**(4 Pt 1): C563-71.

Kurtz A., Wagner C. (1998). "Role of nitric oxide in the control of renin secretion." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): F849-62.

- Kurtz A., Wagner C. (1999). "Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors." J Am Soc Nephrol **10 Suppl 11**: S162-8.
- Laframboise M., Reudelhuber T. L., Jutras I., Brechler V., Seidah N. G., Day R., Gross K. W., Deschepper C. F. (1997). "Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line." Kidney Int **51**(1): 104-9.
- Lee H., Hamilton J. R. (2012). "Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease." Pharmacol Ther **134**(2): 246-59.
- Leger A. J., Covic L., Kuliopulos A. (2006). "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." Circulation **114**(10): 1070-7.
- Levey A. S., Becker C., Inker L. A. (2015). "Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults A Systematic Review." Jama-Journal of the American Medical Association **313**(8): 837-846.
- Limmer F., Schinner E., Castrop H., Vitzthum H., Hofmann F., Schlossmann J. (2015). "Regulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter by cGMP/cGMP-dependent protein kinase I after furosemide administration." Febs Journal **282**(19): 3786-3798.
- Lorenz J. N., Kotchen T. A., Ott C. E. (1990). "Effect of Na and Cl infusion on loop function and plasma renin activity in rats." Am J Physiol **258**(5 Pt 2): F1328-35.
- Lorenz J. N., Weihprecht H., Schnermann J., Skott O., Briggs J. P. (1991). "Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): F486-93.
- Machura K., Neubauer B., Steppan D., Kettl R., Grobota A., Kurtz A. (2012). "Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney." Am J Physiol Renal Physiol **302**(10): F1278-85.
- Mack M., Rosenkranz A. R. (2009). "Basophils and mast cells in renal injury." Kidney Int **76**(11): 1142-7.
- Madsen K., Friis U. G., Gooch J. L., Hansen P. B., Holmgaard L., Skott O., Jensen B. L. (2010). "Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells." Kidney Int **77**(2): 110-7.
- Majid D. S., Inscho E. W., Navar L. G. (1999). "P2 purinoceptor saturation by adenosine triphosphate impairs renal autoregulation in dogs." J Am Soc Nephrol **10**(3): 492-8.
- Makhanova N., Hagaman J., Kim H. S., Smithies O. (2008). "Salt-sensitive blood pressure in mice with increased expression of aldosterone synthase." Hypertension **51**(1): 134-40.
- Mangrum A. J., Gomez R. A., Norwood V. F. (2002). "Effects of AT(1A) receptor deletion on blood pressure and sodium excretion during altered dietary salt intake." Am J Physiol Renal Physiol **283**(3): F447-53.

Matzdorf C., Kurtz A., Hocherl K. (2007). "COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys." Am J Physiol Renal Physiol **292**(6): F1782-90.

McGuire J. J., Van Vliet B. N., Halfyard S. J. (2008). "Blood pressures, heart rate and locomotor activity during salt loading and angiotensin II infusion in protease-activated receptor 2 (PAR2) knockout mice." BMC Physiol **8**: 20.

Melo L. G., Veress A. T., Chong C. K., Ackermann U., Sonnenberg H. (1999). "Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice is prevented by AT1 receptor antagonist losartan." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): R624-30.

Molino M., Raghunath P. N., Kuo A., Ahuja M., Hoxie J. A., Brass L. F., Barnathan E. S. (1998). "Differential expression of functional protease-activated receptor-2 (PAR-2) in human vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 825-32.

Molino M., Woolkalis M. J., Reavey-Cantwell J., Pratico D., Andrade-Gordon P., Barnathan E. S., Brass L. F. (1997). "Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment." J Biol Chem **272**(17): 11133-41.

Morla L., Brideau G., Fila M., Crambert G., Cheval L., Houillier P., Ramakrishnan S., Imbert-Teboul M., Doucet A. (2013). "Renal proteinase-activated receptor 2, a new actor in the control of blood pressure and plasma potassium level." J Biol Chem **288**(14): 10124-31.

Morley D. Hollenberg, JoAnn Trejo: Proteinase-activated receptors: PAR2 (2015a). <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=348> (Stand: 13.02.2017)

Morley D. Hollenberg, JoAnn Trejo: Proteinase-activated receptors: PAR3 (2015b). <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=349> (Stand: 13.02.2017)

Morley D. Hollenberg, JoAnn Trejo: Proteinase-activated receptors: PAR4 (2015c). <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=350> (Stand: 13.02.2017)

Morris B. J. (1992). "Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing." J Hypertens **10**(3): 209-14.

Mundel P., Bachmann S., Bader M., Fischer A., Kummer W., Mayer B., Kriz W. (1992). "Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells." Kidney Int **42**(4): 1017-9.

Nafz B., Berthold H., Ehmke H., Hackenthal E., Kirchheim H. R., Persson P. B. (1997). "Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs." Am J Physiol **273**(2 Pt 2): F200-5.

Nakagawa H., Somekawa S., Onoue K., Kumazawa T., Ueda T., Seno A., Nakada Y., Nakano T., Matsui M., Soeda T., Okayama S., Kawakami R., Kawata H., Okura H., Saito Y.

(2016). "Salt accelerates aldosterone-induced cardiac remodeling in the absence of guanylyl cyclase-A signaling." Life Sci **165**: 9-15.

Nakanishi-Matsui M., Zheng Y. W., Sulciner D. J., Weiss E. J., Ludeman M. J., Coughlin S. R. (2000). "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin." Nature **404**(6778): 609-13.

Nesterov V., Dahlmann A., Krueger B., Bertog M., Loffing J., Korbmacher C. (2012). "Aldosterone-dependent and -independent regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in mouse distal nephron." Am J Physiol Renal Physiol **303**(9): F1289-99.

Neves F. A., Duncan K. G., Baxter J. D. (1996). "Cathepsin B is a prorenin processing enzyme." Hypertension **27**(3 Pt 2): 514-7.

Nickel R., Schummer A., Frewein J., Seiferle E. (2004). Eingeweide. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2, Parey.

Nüsing R. M., Treude A., Weissenberger C., Jensen B., Bek M., Wagner C., Narumiya S., Seyberth H. W. (2005). "Dominant role of prostaglandin E2 EP4 receptor in furosemide-induced salt-losing tubulopathy: a model for hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome." J Am Soc Nephrol **16**(8): 2354-62.

Nystedt S., Emilsson K., Larsson A. K., Strombeck B., Sundelin J. (1995). "Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2." Eur J Biochem **232**(1): 84-9.

Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J. (1994). "Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9208-12.

O'Shaughnessy K. M., Karet F. E. (2006). "Salt handling and hypertension." Annu Rev Nutr **26**: 343-65.

Oppermann M., Friedman D. J., Faulhaber-Walter R., Mizel D., Castrop H., Enyoji K., Robson S. C., Schnermann J. (2008). "Tubuloglomerular feedback and renin secretion in NTPDase1/CD39-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol **294**(4): F965-70.

Ortiz-Capisano M. C., Ortiz P. A., Harding P., Garvin J. L., Beierwaltes W. H. (2007). "Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase." Hypertension **49**(1): 162-9.

Ossovskaya V. S., Bunnnett N. W. (2004). "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease." Physiol Rev **84**(2): 579-621.

Peti-Peterdi J., Fintha A., Fuson A. L., Tousson A., Chow R. H. (2004). "Real-time imaging of renin release *in vitro*." Am J Physiol Renal Physiol **287**(2): F329-35.

Peti-Peterdi J., Harris R. C. (2010). "Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release." J Am Soc Nephrol **21**(7): 1093-6.

Peti-Peterdi J., Komlosi P., Fuson A. L., Guan Y., Schneider A., Qi Z., Redha R., Rosivall L., Breyer M. D., Bell P. D. (2003). "Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells." J Clin Invest **112**(1): 76-82.

- Petrovic N., Kane C. M., Sigmund C. D., Gross K. W. (1997). "Downregulation of renin gene expression by interleukin-1." Hypertension **30**(2 Pt 1): 230-5.
- Pfeilschifter J., Kurtz A., Bauer C. (1985). "Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglyceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells." Biochem Biophys Res Commun **127**(3): 903-10.
- Pietri L., Bloch-Faure M., Belair M. F., Sanford L. P., Doetschman T., Menard J., Bruneval P., Meneton P. (2002). "Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene." Exp Nephrol **10**(5-6): 374-82.
- Raven P. W., Kapas S., Carroll M., Hinson J. P. (2001). "Aldosterone secretion by the rat adrenal cortex is stimulated by the activation of protease-activated receptor 1." J Endocrinol **169**(3): 581-5.
- Ray E. C., Kleyman T. R. (2015). "Cutting it out: ENaC processing in the human nephron." J Am Soc Nephrol **26**(1): 1-3.
- Robin J., Kharbanda R., McLean P., Campbell R., Vallance P. (2003). "Protease-activated receptor 2-mediated vasodilatation in humans *in vivo*: role of nitric oxide and prostanoids." Circulation **107**(7): 954-9.
- Rondeau E., Sraer J. D., Nguyen G., He C. J., Zacharias U., Xu Y. (1999). "Role of thrombin and its receptor, the protease-activated receptor 1, in the pathophysiology of glomerular injury." Adv Nephrol Necker Hosp **29**: 17-34.
- Rowland N. E., Goldstein B. E., Robertson K. L. (2003). "Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice: fluid intake, plasma hormones, and brain Fos." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(6): R1586-94.
- Russo A., Soh U. J., Trejo J. (2009). "Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters!" Mol Interv **9**(2): 87-96.
- Ryan M. J., Gross K. W., Hajduczuk G. (2000). "Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(4): E823-9.
- Schmid J., Oelbe M., Saftig P., Schwake M., Schweda F. (2013). "Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane protein 2 in renin-producing cells: further evidence for a lysosomal nature of renin secretory vesicles." Pflugers Arch **465**(6): 895-905.
- Schnermann J., Levine D. Z. (2003). "Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide." Annu Rev Physiol **65**: 501-29.
- Scholz H., Hamann M., Gotz K. H., Kurtz A. (1994). "Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys." Pflugers Arch **428**(2): 173-8.
- Schricker K., Kurtz A. (1995). "Role of membrane-permeable ions in renin secretion by renal juxtaglomerular cells." Am J Physiol **269**(1 Pt 2): F64-9.

Schweda F., Friis U., Wagner C., Skott O., Kurtz A. (2007). "Renin release." Physiology (Bethesda) **22**: 310-9.

Schweda F., Kurtz A. (2004). "Cellular mechanism of renin release." Acta Physiol Scand **181**(4): 383-90.

Schweda F., Kurtz L., de Wit C., Janssen-Bienhold U., Kurtz A., Wagner C. (2009). "Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension." Kidney Int **75**(5): 482-9.

Schweda F., Segerer F., Castrop H., Schnermann J., Kurtz A. (2005). "Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors." Hypertension **46**(4): 780-6.

Schweda F., Wagner C., Kramer B. K., Schnermann J., Kurtz A. (2003). "Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice." Am J Physiol Renal Physiol **284**(4): F770-7.

Schwertschlag U., Hackenthal E. (1982a). "Forskolin stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney." Eur J Pharmacol **84**(1-2): 111-3.

Schwertschlag U., Hackenthal E. (1982b). "Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **319**(3): 239-42.

Schwertschlag U., Stahl T., Hackenthal E. (1982c). "A comparison of the effects of prostacyclin and 6-keto-prostaglandin E1 on renin release in the isolated rat and rabbit kidney." Prostaglandins **23**(1): 129-38.

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

Sequeira Lopez M. L., Pentz E. S., Robert B., Abrahamson D. R., Gomez R. A. (2001). "Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells." Am J Physiol Renal Physiol **281**(2): F345-56.

Shah R. (2009). "Protease-activated receptors in cardiovascular health and diseases." Am Heart J **157**(2): 253-62.

Shapiro M. J., Weiss E. J., Faruqi T. R., Coughlin S. R. (2000). "Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin." J Biol Chem **275**(33): 25216-21.

Skott O., Briggs J. P. (1987). "Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion." Science **237**(4822): 1618-20.

Soh U. J., Dores M. R., Chen B., Trejo J. (2010). "Signal transduction by protease-activated receptors." Br J Pharmacol **160**(2): 191-203.

Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T. A., Hollenberg M. D. (2005). "Proteinase-activated receptors: transducers of

proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response." Endocr Rev **26**(1): 1-43.

Takagi M., Takagi M., Franco-Saenz R., Mulrow P. J. (1988). "Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in a superfusion system of kidney slices and dispersed juxtaglomerular cells." Endocrinology **122**(4): 1437-42.

Taugner R., Buhle C. P., Nobiling R. (1984). "Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice." Cell Tissue Res **237**(3): 459-72.

Taugner R., Kim S. J., Murakami K., Waldherr R. (1987). "The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment." Histochemistry **86**(3): 249-53.

Timmermans P. B., Wong P. C., Chiu A. T., Herblin W. F., Smith R. D. (1993). "New perspectives in angiotensin system control." J Hum Hypertens **7 Suppl 2**: S19-31.

Todorov V., Muller M., Schweda F., Kurtz A. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(5): R1046-51.

Trottier G., Hollenberg M., Wang X., Gui Y., Loutzenhiser K., Loutzenhiser R. (2002). "PAR-2 elicits afferent arteriolar vasodilation by NO-dependent and NO-independent actions." Am J Physiol Renal Physiol **282**(5): F891-7.

Unger T., Chung O., Csikos T., Culman J., Gallinat S., Gohlke P., Hohle S., Meffert S., Stoll M., Stroth U., Zhu Y. Z. (1996). "Angiotensin receptors." J Hypertens Suppl **14**(5): S95-103.

Vallet V., Chraïbi A., Gaeggeler H. P., Horisberger J. D., Rossier B. C. (1997). "An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel." Nature **389**(6651): 607-10.

Volpe M., Rubattu S., Gigante B., Ganten D., Porcellini A., Russo R., Romano M., Enea I., Lee M. A., Trimarco B. (1995). "Regulation of aldosterone biosynthesis by adrenal renin is mediated through AT1 receptors in renin transgenic rats." Circ Res **77**(1): 73-9.

von Engelhardt W., Ahrens F. (2005). Physiologie der Haustiere, Enke.

Vouret-Craviari V., Bourcier C., Boulter E., van Obberghen-Schilling E. (2002). "Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2475-84.

Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R. (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." Cell **64**(6): 1057-68.

Wagner C., Kurtz A. (1998). "Regulation of renal renin release." Curr Opin Nephrol Hypertens **7**(4): 437-41.

Wagner C., Kurtz L., Schweda F., Simon A. M., Kurtz A. (2009). "Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney." Pflugers Arch **459**(1): 151-8.

Wang A. (2015). "Review of vorapaxar for the prevention of atherothrombotic events." Expert Opin Pharmacother **16**(16): 2509-22.

Wang H., D'Ambrosio M. A., Garvin J. L., Ren Y., Carretero O. A. (2012). "Connecting tubule glomerular feedback mediates acute tubuloglomerular feedback resetting." Am J Physiol Renal Physiol **302**(10): F1300-4.

Wang H., D'Ambrosio M. A., Ren Y., Monu S. R., Leung P., Kutskill K., Garvin J. L., Janic B., Peterson E. L., Carretero O. A. (2015). "Tubuloglomerular and connecting tubuloglomerular feedback during inhibition of various Na transporters in the nephron." Am J Physiol Renal Physiol **308**(9): F1026-31.

Weinberg M., Belknap S., Trebbin W., Solomon R. J. (1987). "Effects of changing salt and water balance on renal kallikrein, kininogen and kinin." Kidney Int **31**(3): 836-41.

Wilcox C. S., Welch W. J., Murad F., Gross S. S., Taylor G., Levi R., Schmidt H. H. (1992). "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11993-7.

Wolf K., Castrop H., Hartner A., Goppelt-Strube M., Hilgers K. F., Kurtz A. (1999). "Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa." Hypertension **34**(3): 503-7.

Xu W. F., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Foster D. C. (1998). "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6642-6.

X. ANHANG

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: A: Schematische Darstellung eines Malpighi-Körperchens und des Juxtaglomerulären Apparates; B: Immunhistochemische Darstellung eines Malpighi-Körperchens und des Juxtaglomerulären Apparates, rot: COX1, blau: Glattmuskelaktin, grün: PECAM (Endothelzelle). (Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Klaus Höcherl)

Abb. 2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Abb. 3: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch eine Serinprotease

Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktion von PAR1 und PAR2 in der Hämodynamik der Niere

Abb. 5: Genotypisierungs-PCR von PAR2-KO-Mäusen (120 bp) und Wildtyp-Mäusen (344 bp)

Abb. 6: Stoffwechsellage für einzelne Mäuse

Abb. 7: Plasmeninkonzentration (PRC) nach Stimulation des PAR1 oder PAR2 mit den spezifischen agonistischen Peptiden TFLLR bzw. SLIGRL. Die Daten stammen von 15 Wildtyp-Mäusen, wovon 7 mit TFLLR und 8 mit SLIGRL behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$.

Abb. 8: Plasmeninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Mäusen. Die Daten stammen von 34 WT und 33 PAR2-KOs. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 9: Renin mRNA-Expression von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Mäusen. Es wurden 29 WT und 27 PAR2-KOs analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 10: Immunhistochemische Färbung der Niere für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). A zeigt eine Wildtypnieren und B die Niere eines PAR2-KO. Pfeil: Reninpositive Zellen entlang der Arteriolen.

Abb. 11: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT)- und PAR2-KO-Tieren. Es wurde der Blutdruck von 9 WT- und 8 PAR2-KO-Mäusen je 3x gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Abb. 12: Herzfrequenz von WT und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Abb. 13: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten wurden von je 27 Tieren erhoben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 14: Plasmaureakonzentrationen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden pro Genotyp 27 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 15: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Gruppe 49 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 16: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Gruppe 49 Tiere analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 17: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten stammen von je 27 Tieren pro Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 18: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Die Daten stammen von 41 WT- und 39 PAR2-KO-Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 19: Natrium (Na⁺)- und Kalium (K⁺)-Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Es wurden je Genotyp 43 Tiere zur Erhebung der Daten analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 20: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Abb. 21: Δ PRC von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 22: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 4 Tiere je Gruppe herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 23: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 24: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 25: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 26: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 27: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 28: Natriumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; (*): $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 29: Kaliumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/Tier/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 30: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hochsalz- bzw. Niedrigsalzdiät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Hochsalzdiät.

Abb. 31: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hochsalz- bzw. Niedrigsalzdiät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 32: Plasmareninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 33: Renin mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; *: $p < 0,05$ gegen Basalwert

Abb. 34: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter basalen Bedingungen. aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

Abb. 35: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter Losartan (30 mg/kg*d). aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

Abb. 36: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in der Nierenrinde von WT und PAR2-KO. A und C zeigen die Nierenrinde einer WT-Maus. B und D zeigen die Nierenrinde einer PAR2-KO-Maus unter Losartan (30 mg/kg*d) mit Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl). aA: afferente Arteriole, G: Glomerulus, Pfeil: Reninpositive Zellen.

Abb. 37: PAR1 mRNA von Wildtyp (WT) nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl), Hochsalzdiät (4 % NaCl), Losartan (30 mg/kg*d), Losartan + Niedrigsalzdiät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) oder Furosemid (1,2 mg/Tier*d). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 38: PAR2 mRNA von Wildtyp (WT) nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Niedrigsalzdiät (0,02 % NaCl), Hochsalzdiät (4 % NaCl), Losartan (30 mg/kg*d), Losartan + Niedrigsalzdiät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) oder Furosemid (1,2 mg/Tier*d). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 1: Auflistung der wichtigsten aktivierenden Faktoren der PAR und möglichen synthetischen Aktivierungspeptiden

Tab. 2: Auflistung der wichtigsten G-Proteine, die durch die PAR aktiviert werden

Tab. 3: Lokalisationen der einzelnen Protease-aktivierten Rezeptoren

Tab. 4: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 5: Natrium (Na^+)- und Kalium (K^+)-Konzentration im Plasma von Wildtyp (WT) und PAR2-KO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 6: Plasmaninkonzentration (PRC) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 7: Δ PRC von WT und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 9 WT und PAR2-KOs herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 8: Hämatokrit von WT und PAR2-KO nach akuter Stimulation mit Hydralazin (2 mg/kg), Isoproterenol (10 mg/kg), Losartan (3 mg/kg) und Furosemid (40 mg/kg). Zur Datenerhebung wurden 9 WT und PAR2-KOs herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 9: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 10: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 11: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 12: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 13: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; p signifikant für $<0,05$.

Tab. 14: Plasmanatriumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 15: Plasmakaliumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe von Furosemid (1,2 mg/d für 5 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 16: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Niedrigsalz (LS)-Diät für 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Tab. 17: Herzfrequenz (HR) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Niedrigsalz (LS)-Diät für 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Tab. 18: Plasmakreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 19: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 20: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 21: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 22: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 23: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 24: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 25: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 26: Plasmanatriumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 27: Plasmakaliumkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 28: Natriumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 29: Kaliumausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Fütterung einer Hoch (HS)- bzw. Niedrigsalz (LS)-Diät für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 30: Systolischer Blutdruck (sBP) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Tab. 31: Herzfrequenz (HR) von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 32: Plasamkreatininkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 33: Kreatininclearance von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan +LS (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 34: Plasmaureakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 35: Urinvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 36: Trinkvolumen von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 37: Plasmaosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 38: Urinosmolarität von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 39: Hämatokrit von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 40: Na⁺-Plasmakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 41: K⁺-Plasmakonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 42: Na⁺-Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Tab. 43: K⁺-Ausscheidung von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Tab. 44: ENaC mRNA von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Stimulation der Reninsekretion durch Losartan (30 mg/kg*d) oder Losartan + Nidrigsalz (LS)-Diät (30 mg/kg*d + 0,02 % NaCl) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Tab. 45: Plasmaaldosteronkonzentration von Wildtyp (WT) und PAR2-KO nach chronischer Gabe einer Nidrigsalz (LS)-Diät (0,02 % NaCl), von Losartan (30 mg/kg*d) oder LS + Losartan (0,02 % NaCl + 30 mg/kg*d) für je 7 Tage. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

2. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm ³	Kubik Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb	Abbildung
AC	Adenylylzyklasen
ACE	angiotensin converting enzyme
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Adenosinphosphosulfat
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1
AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 2
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
bpm	beats per minute
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	copy DNA
cGKII	Cyclic GMP kinase II
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CH3L1	Chitinase-3 like protein 1

Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
COX1	Cyclooxygenase 1
d	doppelt destilliert
dd	Dipeptidyl peptidase-4
DDP-4	desoxyribonucleic acid
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglyol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ENaC	epithelial Na-channel
eNOS	epitheliale NO-Synthase
et al.	et alii
Fc	fragment crystallizable
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
G _{12/13}	G-Protein _{12/13}
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
G _i	G-Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
G _q	G-Protein
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Highsalt
i.p.	intraperitoneal
JG	juxtaglomerular
K ⁺	Kalium

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LS	Lowsalt
max	maximal
MD	Macula densa
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	optische Dichte
mosm	Milliosmol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAF	platelet activating factor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE-3	Phosphatdiesterase 3
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2

PGI ₂	Prostaglandin I ₂
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRA	plasma renin activity
PRC	plasma renin concentration
p-Wert	Signifikanzwert
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBF	renalen Blutflusses
RNA	ribonucleic acid
ROMK	renal outer medullary potassium (K) channel
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
Tab.	Tabelle
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF-βII	Transforming growth factor-beta 2
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
VSMC	vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ΔPRC	delta PRC

XI. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, welche mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Klaus Höcherl für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die stets konstruktive Kritik und die hervorragende Betreuung, sowohl in fachlicher als auch in zwischenmenschlicher Hinsicht.

Ich danke Herr Professor Dr. Wanke für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein großer Dank geht an die Kollegen meiner Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die stets große Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Ramona Steppan und Dr. rer. nat. Björn Neubauer der Universität Regensburg für die stets freundlichen Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und mir stets Rückhalt boten.