

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen

Direktor Professor Dr. H. Oßwald  
Abteilung molekulare Pharmakologie  
Leiter: Professor Dr. U. Quast

**Charakterisierung der durch ANG II verursachten  
cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung in  
reninsezernierenden Zellen der Rattenniere**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Marc Chmielnicki

aus

Ludwigsburg

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Russ  
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Krippel-Drews

## I. Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Verwendete Abkürzungen.....	VII
1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	2
1.2	Der juxtaglomeruläre Apparat.....	4
1.3	Regulation der Reninsekretion .....	7
1.3.1	Regulation der Reninsekretion durch zelluläre Faktoren .....	8
1.3.1.1	Calcium in der Regulation der Reninsekretion .....	8
1.3.1.1.1	Die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Regulation der Reninsekretion .....	8
1.3.1.1.2	Die Calcium Homöostase der reninsezernierenden Zellen .....	9
1.3.1.1.2.1	Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch spannungs-abhängige $Ca^{2+}$ -Kanäle (VOCC's).....	11
1.3.1.1.2.2	Beeinflussung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Rezeptor-aktivierte Kanäle (ROCC's) in den juxtaglomerulären Zellen der Niere .....	13
1.3.1.1.2.3	Einfluss von Speicher-aktivierten $Ca^{2+}$ -Kanälen (SOCC's) auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration von reninsezernierenden Zellen .....	15

## Inhaltsverzeichnis

---

1.3.1.2	cAMP in der Regulation der Reninsekretion .....	16
1.3.1.3	cGMP in der Regulation der Reninsekretion .....	18
1.3.1.4	Das Membranpotential in der Regulation der Reninsekretion .....	20
1.3.1.5	Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf die Reninsekretion .....	22
1.3.2	Regulation der Reninsekretion durch Botenstoffe und Mediatoren .....	23
1.3.2.1	Regulation der Reninsekretion durch Angiotensin II .....	23
1.3.2.2	Regulation der Reninsekretion durch Adenosin .....	25
1.3.2.3	Synergismus zwischen Adenosin und ANG II .....	28
1.3.2.4	Regulation der Reninsekretion durch Stickstoffmonoxid .....	29
1.3.2.5	Regulation der Reninsekretion durch Arachidonsäure und deren Metabolite .....	30
1.3.3	Regulation der Reninsekretion durch physiologische Faktoren ..	31
1.3.3.1	Der Barozereptormechanismus .....	31
1.3.3.2	Der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus .....	32
1.3.3.3	Das sympathische Nervensystem .....	34
1.4	Fragestellung .....	36
2	Material und Methoden .....	38
2.1	Material und Versuchstiere .....	38
2.1.1	Substanzen .....	38
2.1.2	Lösungen .....	39
2.1.2.1	Lösungen zur Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	40
2.1.2.2	Lösungen zur Messung des Membranpotentials .....	43
2.1.2.3	Lösungen zur Fluoreszenzmessung mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer .....	44
2.1.3	Versuchstiere .....	45

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2 Methoden .....	46
2.2.1 Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole ..	46
2.2.2 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie .....	46
2.2.2.1 Messapparatur .....	46
2.2.2.2 Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration .....	52
2.2.2.2.1 Färbung der afferenten Arteriole und Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration .....	52
2.2.2.2.2 Zellfreie Kalibrierung des Systems .....	54
2.2.2.2.3 Auswertung der $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten - Bestimmung der Peakgröße und Fläche .....	55
2.2.2.3 Messung des Membranpotentials .....	57
2.2.2.4 Fluoreszenzintensitätsmessung mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer .....	58
2.2.3 Statistik .....	58
3 Ergebnisse .....	59
3.1 Effekt und Charakterisierung des Einflusses von Angiotensin II auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Rattenniere .....	59
3.2 Pharmakologische Charakterisierung des Peak und der Plateauphase der $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung reninsezernierender Zellen durch ANG II .....	62
3.2.1 Einfluss des $\text{Ca}^{2+}$ - Antagonisten Isradipin auf Peak und Plateauphase .....	62
3.2.1.1 Doppelstimulationsprotokoll .....	62
3.2.1.2 Einzelstimulationsprotokoll .....	63
3.2.2 Einfluss von Speicher-aktivierten $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auf den Peak und die Plateauphase der Stimulation durch ANG II .....	65

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2.1	Einfluss der Blockade Speicher-aktivierter $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch Gadolinium auf den Peak und die Plateauphase .....	65
3.2.2.2	Einfluss der Blockade Speicher-aktivierter $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch 2-APB auf den Peak und die Plateauphase .....	67
3.2.3	Beeinflussung des Peak und der Plateauphase der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter ANG II Stimulation durch Veränderungen des Membranpotentials.....	68
3.2.3.1	Beeinflussung des Peak durch Veränderung des Membranpotentials .....	68
3.2.3.2	Beeinflussung der Plateauphase durch Veränderung des Membranpotentials.....	71
3.2.3.3	Beeinflussung der Peak- und Plateauphase der Stimulation mit ANG II durch CPA unter Depolarisation.....	75
3.2.4	Verhalten der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen bei Blockade von $\text{K}^+$ -Kanälen durch TEA .....	78
3.2.4.1	Beeinflussung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch TEA unter physiologischen Verhältnissen sowie unter Stimulation mit ANG II .....	78
3.2.4.2	Beeinflussung des Membranpotentials der reninsezernierenden Zellen durch TEA.....	81
3.2.5	Beeinflussung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Blockade einwärts gerichteter $\text{K}^+$ -Kanäle durch Barium.....	82
3.3	Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Osmolaritäten auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reninsezernierender Zellen der Rattenniere .....	84
3.3.1	Einfluss von extrazellulären hypoosmolaren Verhältnissen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen .....	84
3.3.2	Einfluss von extrazellulären hyper- und hypoosmolaren Verhältnissen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .....	86

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.3	Einfluss von Gadolinium auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter extrazellulären hypoosmolaren Verhältnissen .....	89
3.4	Charakterisierung der durch $\beta$ -Rezeptor-Stimulation verursachten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ .....	91
3.4.1	Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin/IBMX .....	91
3.4.2	Einfluss der Proteinkinase A auf die durch Isoprenalin/IBMX verursachte Erhöhung $[Ca^{2+}]_i$ .....	92
3.4.3	Die $[Ca^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen bei der Stimulation mit einem Epac-Aktivator .....	95
3.5	Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Stimulation mit ANG II im Zellverband .....	97
3.5.1	Substanzen zur Blockade der Gap junctions .....	97
3.5.2	Einfluss von 1-Heptanol, 1-Octanol und 18 $\beta$ -Glycyrrhetinic Acid auf die $[Ca^{2+}]_i$ .....	99
3.5.3	Veränderung des Membranpotentials der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere durch Stimulation mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetinic Acid .....	103
3.5.4	Einfluss von 18 $\beta$ -Glycyrrhetinic Acid auf die $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen der Rattenniere in $Ca^{2+}$ -freiem Medium .....	104
3.5.5	Einfluss von 18 $\beta$ -Glycyrrhetinic Acid auf den durch ANG II verursachten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in proximal und distal gelegenen reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole .....	106
4	Diskussion .....	109
4.1	Charakterisierung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht durch die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II .....	109
4.1.1	VOCC's in der Peak- und Plateauphase bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen während der Stimulation mit ANG II .....	110

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1.2	SOCC's in der Peak- und Plateauphase bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II.....	112
4.1.3	Einfluss der Depolarisation der Zellen auf die $[Ca^{2+}]_i$ während der Stimulation mit ANG II .....	114
4.2	Die Rolle der PKA und des Epac bei dem Einfluss von cAMP auf die $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen.....	116
4.3	Osmotische Einflüsse auf die $[Ca^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere.....	120
4.4	Die Rolle der Gap junctions bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II .....	123
4.5	BK <sub>Ca</sub> -Kanäle und K <sub>ir</sub> -Kanäle in juxtaglomerulären Zellen und der Einfluss dieser Kanäle bei der Stimulation durch ANG II.....	127
5	Zusammenfassung.....	129
6	Literatur.....	132

## II. Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP Ribose
ADPRC	ADP Ribose Cyclase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANG	Angiotensin
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylboran
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
8 Br cGMP	8 Brom cGMP
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	extrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Ionenkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Ionenkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cADPR	cyclische ADP Ribose
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sub>v</sub>	spannungsgesteuerter Ca <sup>2+</sup> -Kanal
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CICR	Calcium-induzierte Calciumfreisetzung
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Cl <sup>-</sup> -Ionenkonzentration
Collagenase	Collagenase Typ A, Clostridium histolyticum

## Verwendete Abkürzungen

---

COX	Cyclooxygenase
CPA	Cyclopiazonic Acid
DAG	Diacylglycerin
db cAMP	dibutyryl cAMP
DiBAC <sub>4</sub> (3)	bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGM	Extraglomeruläres Mesangium
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ET	Endothelin
Fura-2	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GC	Guanylatzyklase
Glyc. A.	18β-Glycyrrhetinic Acid
GMP	Guanosinmoophosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H-89	N- [2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide Dihydrobromide
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEPES-PS	physiologische HEPES-gepufferte Salzlösung
Hept.	1-Heptanol
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat
ISO	Isoproterenol
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensibler Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>ir</sub> -Kanal	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
KT 5720	PKA-Inhibitor der Firma Calbiochem
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

## Verwendete Abkürzungen

---

Mn <sup>2+</sup>	Manganionen
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Oct.	1-Octanol
P	Phosphat
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Chloro-Phenylthio)-2'-O-Methyladenosin-3'-5'- zyklisches Monophosphat
PDE	Phosphodiesterase
PG	Prostaglandin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
R	Ratio
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROCC's	Rezeptor-aktivierte Ca <sup>2+</sup> -Ionenkanäle
ROI	region of interest
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarcoendoplasmatic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (endoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase)
SOCC,s	Speicher-aktivierte Ca <sup>2+</sup> -Ionenkanäle
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
TGF	tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus
TRP	transient receptor potential

## Verwendete Abkürzungen

---

TX	Thromboxan
VOCC,s	spannungsaktivierte Ca <sup>2+</sup> -Ionenkanäle

## 1 Einleitung und Fragestellung

In Deutschland ist jeder fünfte Bundesbürger im Alter von über 40 Jahren an Bluthochdruck (Hypertonie) erkrankt. Dies entspricht einer Zahl von insgesamt 12 bis 15 Millionen Menschen im Bundesgebiet ([www.hochdruckliga.de](http://www.hochdruckliga.de)). Chronische Hypertonie hat unbehandelt weitreichende Folgen für den Betroffenen. Durch den hohen Blutdruck kommt es zu Schädigungen am Blutgefäßsystem mit den Folgen der Arterienverkalkungen (Arteriosklerose) und Durchblutungsstörungen von z.B. Herz, Gehirn, Niere oder auch den Extremitäten. Die Durchblutungsstörungen führen so zu Herzinfarkt, Hirnschlag oder zum Nierenversagen mit den damit verbundenen gesundheitlichen Konsequenzen. Die Hypertonie ist damit einer der wichtigsten Risikofaktoren für Herzkreislauferkrankungen. Zur Vorbeugung von Folgeschäden muss der hohe Blutdruck gesenkt werden.

Die Niere ist das wichtigste Organ in der Regulation des Körperwassers, der Elektrolyte und des Blutdrucks (Churchill (1995)). Einfluss auf diese Faktoren übt die Niere unter anderem über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aus. Dieses System stellt heute einen der wichtigsten Angriffspunkte in der Behandlung der Hypertonie dar. Pharmakologisch besteht die Möglichkeit in das RAAS mit ACE-Hemmern (Inhibitoren des angiotensin converting enzyme) und AT<sub>1</sub>-Blockern (Blocker des Angiotensin II AT<sub>1</sub>-Rezeptors) einzugreifen. Physiologisch stellt die Sekretion des Renin aus den reninsezernierenden Zellen der Niere den wichtigsten Schritt in der Aktivierung des RAAS dar. Wäre es möglich schon die Reninsekretion zu verhindern, würden weitere Therapeutika in der Behandlung der Hypertonie zur Verfügung stehen. Im Folgenden soll das RAAS und seine komplexe Regulierung sowie die Modulation der Reninsekretion dargestellt werden.

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

Das RAAS ist eines der wichtigsten Systeme zur Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens, des Salzhaushaltes und des Blutdrucks (Churchill (1995)). Eine Aktivierung des RAAS geschieht durch einen Blutdruckabfall, eine Abnahme des Plasmavolumens und durch Kochsalzentzug. Durch die Aktivierung des RAAS kommt es zu einer Zunahme des arteriellen Blutdrucks, des Herzminutenvolumens und der kardialen Vor- und Nachlast.

Die Synthese, Speicherung und Freisetzung des Renin erfolgt durch spezialisierte Zellen der Niere, den juxtaglomerulären Zellen (Barajas (1979)). Das Gen für menschliches renales Renin besteht aus 10 Exons und 9 Introns, aus deren Code die mRNA (messenger Ribonucleinsäure) transkribiert wird. Die Translation dieser mRNA zum Protein führt zur Entstehung des Präprorenin, einer frühen Vorstufe des Renin. Das Präprorenin besitzt 401 Aminosäuren. Aus dieser Vorstufe entsteht im endoplasmatischen Retikulum durch Abspaltung eines Signalpeptides (20 Aminosäuren) und durch Glykosylierung das inaktive Prorenin, bestehend aus 381 Aminosäuren. Im Golgi-Apparat wird das Prorenin in Vesikel verpackt. Dort kommt es zur Abspaltung von 46 Aminosäuren vom N-terminalen Ende des Moleküls und dadurch zur Bildung des aktiven Renin (Kurtz (1989)). Die Aspartylprotease Renin besitzt in ihrer aktiven Form ein Molekulargewicht von ca. 44 kDa. Renin spaltet mit hoher Substratspezifität von seinem Substrat, dem in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen, das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab, aus dem durch weitere Abspaltung eines Dipeptids mit Hilfe der Protease ACE das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) entsteht (s. Abb. 1). ANG II stellt das wichtigste Effektormolekül im RAAS dar. In den glatten Muskelzellen der Blutgefäßwände bindet ANG II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor gehört zur Familie der sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren, welche G<sub>i</sub>-Protein gekoppelt arbeiten. Bei Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die eine Spaltung des Membranphospholipides Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat

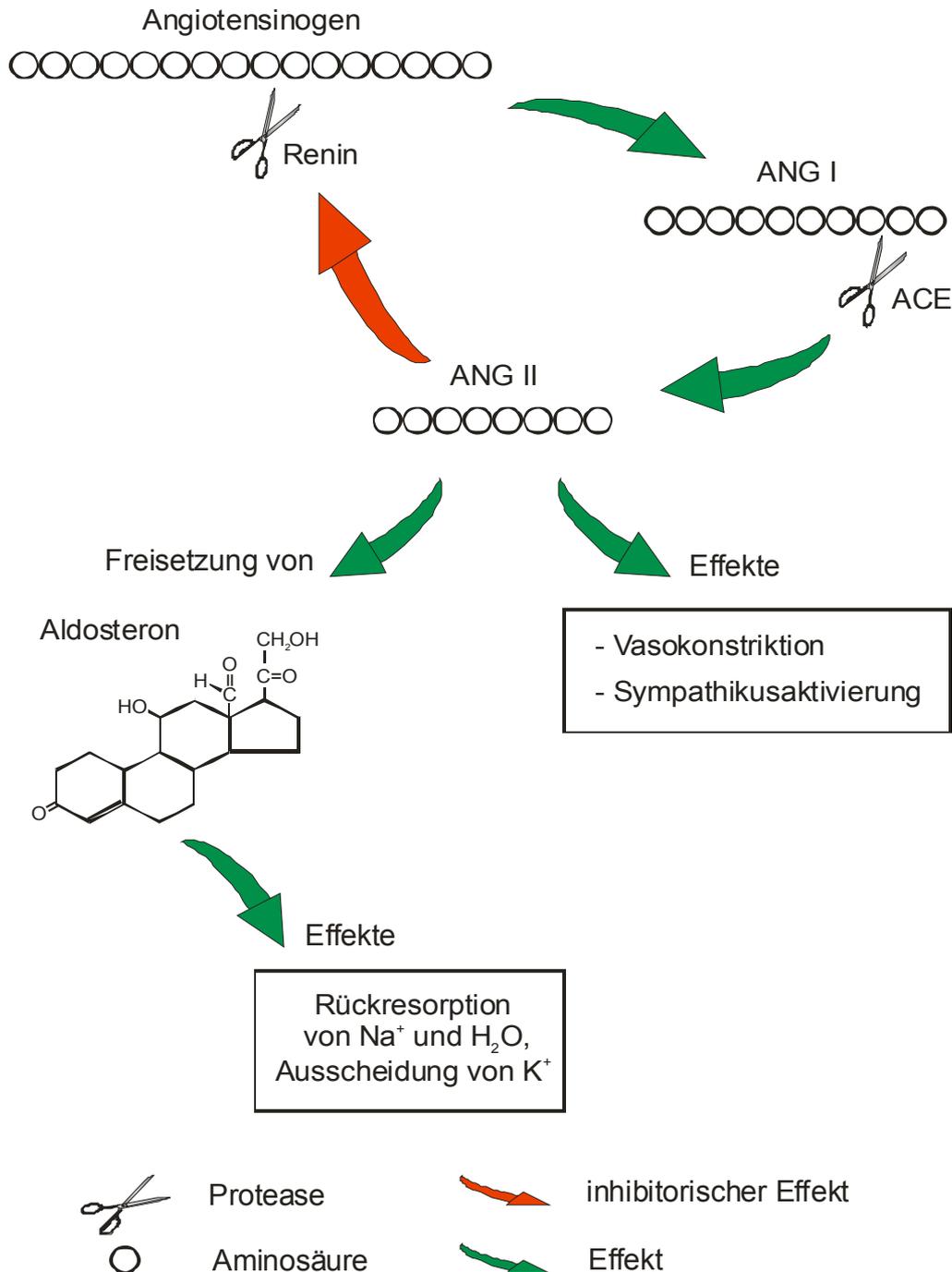


Abb. 1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (nach Rauch (2000))

(PIP<sub>2</sub>) katalysiert. Dabei entsteht Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). IP<sub>3</sub> bindet intrazellulär an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor, welcher eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt

## Einleitung und Fragestellung

---

(Berridge und Irvine (1984)). Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) hat eine Kontraktion der glatten Muskelzellen und somit eine Verkleinerung des Gefäßquerschnittes mit der Erhöhung des Gefäßwiderstands zur Folge. Ein weiterer Effekt des ANG II ist die Freisetzung des Mineralocorticoides Aldosteron, ebenfalls durch die Aktivierung des  $\text{AT}_1$ -Rezeptors, aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron bindet in den Zellen des distalen Tubulus des Nephrons an den Aldosteronrezeptor. Dieser Steroidrezeptor führt nach Aktivierung zur gesteigerten Biosynthese von  $\text{Na}^+$ -Kanälen, die in die Zellmembran integriert werden und eine vermehrte Rückresorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen und Wasser in der Niere verursachen. Dies führt zu einem gesteigerten Blutvolumen mit dem Resultat der Blutdruckerhöhung. Ein weiterer wichtiger Effekt ist die Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch ANG II. Der erhöhte Sympathikotonus bewirkt eine Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark, welche durch Steigerung der Herzarbeit und Erhöhung des Gefäßwiderstands ebenfalls zu einer Blutdruckerhöhung führen. Weitere extrarenale Effekte, die zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes beitragen, sind die Freisetzung von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen und die Aktivierung hypothalamischer Zentren zur Auslösung des Durstgefühls. Auch diese Mechanismen führen zur Erhöhung des intravasalen Volumens und dadurch zur Erhöhung des Blutdrucks. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmt ANG II die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere.

## 1.2 Der juxtaglomeruläre Apparat

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron (s. Abb. 2). Eine menschliche Niere besitzt ca. 1-1,2 Millionen dieser Einheiten. Das Nephron dient der Produktion des Urins und besteht aus dem Nierenkörperchen sowie dem anhängenden Tubulussystem, welches sich in den proximalen bzw.

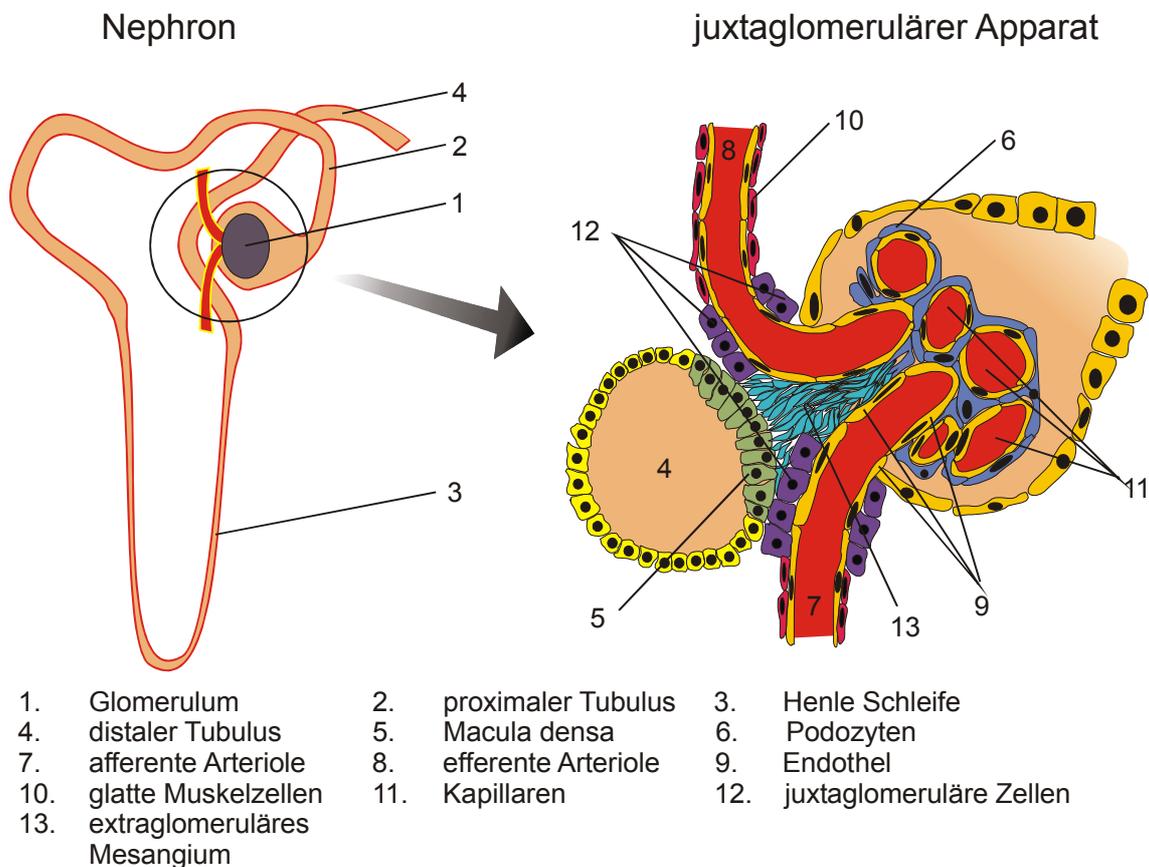


Abb. 2 Nephron und juxtaglomerulärer Apparat (schematisch)

distalen Tubulus sowie die Henle Schleife gliedert. Das Tubulussystem mündet in das Sammelrohrsystem, welches den Urin in das Nierenbecken leitet. Die Blutversorgung der Niere geschieht durch die Arteria renalis, die aus der Aorta entspringt. Die Arteria renalis verzweigt sich nach dem Eintritt in die Niere in die Arteriae interlobares. Daraus entspringen die Arteriae arcuatea, aus denen die Arteriae interlobulares hervorgehen. Aus diesen entspringen schließlich die afferenten Arteriolen, die die einzelnen Nierenkörperchen versorgen, ein Kapillarnetz bilden und sich anschließend wieder in den efferenten Arteriolen vereinigen.

Der juxtaglomeruläre Apparat besteht aus dem Glomerulum, der afferenten und efferenten Arteriole, dem extraglomerulären Mesangium und dem distalen

## Einleitung und Fragestellung

---

Tubulus mit der Macula densa. In diesem Bereich kommunizieren das tubuläre und das vaskuläre System der Niere miteinander (Barajas (1979)). Die Wand der afferenten Arteriole wird mikroskopisch in drei Schichten eingeteilt. Die innerste Schicht besteht aus Endothelzellen (Tunica intima). Die mittlere Schicht (Tunica media) setzt sich im proximalen Anteil aus glatten Muskelzellen im distalen Anteil, ca. 10 – 40 µm proximal des Eintritts der afferenten Arteriole in das Glomerulum, überwiegend aus den juxtaglomerulären Zellen zusammen. Die äußerste Schicht (Tunica adventitia) besteht aus lockerem, kollagenem Bindegewebe. In manchen afferenten Arteriolen sind die juxtaglomerulären Zellen bis 100 µm vom Glomerulum entfernt zu finden, in anderen befinden sich keine dieser Zellen (Bührle et al. (1984)). Die efferenten Arteriolen enthalten eine wesentlich geringere Anzahl juxtaglomerulärer Zellen (Taugner et al. (1982)). Die juxtaglomerulären Zellen stellen den Ort der Produktion und Sekretion des Botenstoffs Renin dar. Diese Zellen entstehen während der Embryogenese aus dem Mesenchym und besitzen die Fähigkeit, sich weiter in glatte Muskelzellen der Gefäßwand zu entwickeln (Sequeira Lopez et al. (2001)). Ebenso besitzen die glatten Muskelzellen der Gefäßwand die Fähigkeit, sich bei Aktivierung des RAAS in reninsezernierende Zellen rückzuwandeln (Bührle et al. (1984)). Dieser Mechanismus dient der Anpassung an unterschiedliche physiologische Bedingungen und wird als metaplastische Transformation (Cantin et al. (1977)) bezeichnet. Diese Anpassungsvorgänge haben zur Folge, dass es zu jedem Zeitpunkt Zellen gibt, die sich im Wandel zwischen Transformation und Retransformation befinden, so genannte intermediäre Zellen, die bezüglich ihrer Morphologie und Funktion (Myofilamente, Reningranula) zwischen glatten Muskelzellen und reninsezernierenden Zellen anzusiedeln sind (Hackenthal et al. (1990)). Die reninsezernierenden Zellen erscheinen mikroskopisch als relativ plumpe Zellen. Sie sind mit vielen Fortsätzen versehen und weisen im Zytoplasma kaum Myofilamente, jedoch viele Reningranula auf (Hackenthal et al. (1990)). Diese Reningranula sind Ort der Speicherung des Renin. Sie sind vermutlich lysosomaler Natur, in ihnen herrscht ein saurer pH-Wert (pH 5,5, Taugner und

Hackenthal (1989)). In ihnen konnte Taugner et al. (1985) Cathepsin B und D nachweisen. Speziell Cathepsin B wird, in Verbindung mit dem sauren pH-Wert, als Hauptkandidat für die Aktivierung von Renin angesehen.

### **1.3 Regulation der Reninsekretion**

Der juxtaglomeruläre Apparat ist das Zentrum der Speicherung und Freisetzung von Renin aus den dort angesiedelten reninsezernierenden Zellen. Diese anatomische Struktur besteht aus afferenter und efferenter Arteriole, dem distalen Tubulus, der Macula densa und dem extraglomerulären Mesangium (Schnermann (2003)). Der juxtaglomeruläre Apparat stellt ein wichtiges System von Regulationsmöglichkeiten der Reninsekretion dar. Die Regulation der Reninsekretion muss sehr genau erfolgen, da das RAAS ein sensibles System darstellt. So ist es nicht verwunderlich, dass es sich bei den Regulationsvorgängen um komplexe Zusammenspiele von vielen Faktoren handelt. Zur einfacheren und verständlicheren Darstellung wurden die Regulationsmechanismen in drei Ebenen untergliedert:

1. Ebene: Zelluläre Ebene mit den intrazellulären Signalwegen

- $\text{Ca}^{2+}$
- cAMP
- cGMP
- Membranpotential
- Osmolarität

2. Ebene: Mediatoren, Hormone und weitere Botenstoffe

- Angiotensin II (ANG II)
- Adenosin
- NO
- Arachidonsäure und ihre Metabolite

3. Ebene: Physiologische Vorgänge, die den Gesamtorganismus betreffen

## Einleitung und Fragestellung

---

- Der Barorezeptormechanismus
- Der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus
- Das sympathische Nervensystem

### 1.3.1 Regulation der Reninsekretion durch zelluläre Faktoren

#### 1.3.1.1 *Calcium in der Regulation der Reninsekretion*

##### 1.3.1.1.1 Die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Regulation der Reninsekretion

$\text{Ca}^{2+}$  ist in vielen Zellen ein second messenger. Extrazelluläre Faktoren (first messenger) erhöhen, zumeist auf unterschiedliche Arten, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und üben so ihre intrazellulären Effekte aus. In typischen sekretorischen Zellen wird durch eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Sekretion ausgelöst oder verstärkt. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dient auch als wichtiges Werkzeug in der Regulation der Reninsekretion (Kurtz (1989)). Fray (1977) erreichte eine Stimulation der Reninsekretion durch Perfusion der isolierten Rattenniere mit Lösungen niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Park et al. (1981) zeigten in ihren Experimenten, dass nach Blockade von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen mit Verapamil die Reninsekretion durch reninsekretionshemmende Botenstoffe nicht mehr vermindert werden konnte. Churchill und Churchill (1987) konnten mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalagonisten BAY K 8644 die basale Rate der Reninsekretion herabsetzen. Mehrere Autoren bestätigten somit die Hypothese, dass ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den juxtaglomerulären Zellen die Reninsekretion vermindert (Fray und Park (1986), Scholz et al. (1994b), Kurtz (1989)). Churchill (1985) bezeichnete Calcium damit als einen inhibitorischen second messenger in juxtaglomerulären Zellen. Heute spricht man vom „Calciumparadoxon“, d.h. bei einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kommt es zur Verminderung der Reninsekretion und vice versa. Eine mögliche Erklärung des Calciumparadoxon lieferten Taugner et al. (1988). Die juxtaglomerulären Zellen befinden sich, je nach Aktivitätszustand des RAAS, in unterschiedlichen Stadien der Transformation

## Einleitung und Fragestellung

---

zwischen glatten Muskelzellen und epitheloiden sekretorischen Zellen (Taugner et al. (1984)). Somit besitzen die Zellen einen unterschiedlichen Gehalt an kontraktile Filamenten, die sich vorwiegend in der intrazellulären Peripherie nahe der Zellmembran befinden und dort ein Netzwerk ausbilden. Kommt es zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , so reagieren die Myofilamente der Zelle mit einer Kontraktion und verkleinern die Poren zwischen den Filamenten so, dass die sekretorischen Vesikel die Zellmembran nur erschwert erreichen können und dadurch die Sekretion des Renin verhindert wird. Eine andere Hypothese schlugen Park et al. (1992) vor. Sie fanden heraus, dass der inhibitorische Effekt von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Calmodulin, das von glatten Muskelzellen bekannt ist, vermittelt wird bzw. die sekretorischen Schritte der Reninsekretion durch den  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-Komplex moduliert werden. Ein Anschwellen der Reninvesikel durch Einstrom von Wasser in die Vesikel führt zur Sekretion, wobei der  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-Komplex die osmotische Schwellung der Reninvesikel verhindert und dadurch die Reninsekretion verringert. Jensen und Skøtt (1994) vermuteten, dass die Stimulation der Reninsekretion nicht direkt abhängig von der  $[Ca^{2+}]_i$ , sondern von der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentration ( $[Cl^-]_i$ ) ist. Die Inhibition der Reninsekretion soll indirekt durch den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den juxtaglomerulären Zellen erfolgen. Der Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen führt zur Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Kanälen und damit zu einem Ausstrom von  $Cl^-$ -Ionen aus der Zelle mit dem Resultat der Zellschrumpfung und Verminderung der Reninsekretion. Diese Erklärungen stellen Hypothesen dar, der exakte Mechanismus des Calciumparadoxons ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

### 1.3.1.1.2 Die Calcium Homöostase der reninsezernierenden Zellen

Da  $Ca^{2+}$ -Ionen wichtige intrazelluläre Steuerungsprozesse übernehmen, muss ihre Konzentration innerhalb der Zelle exakt reguliert werden. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_e$ ) ca.  $10^{-3}$  M, die  $[Ca^{2+}]_i$  in den juxtaglomerulären Zellen ca.

## Einleitung und Fragestellung

$10^{-7}$  M. Zusammen mit dem Membranpotential besteht dadurch ein hoher elektrochemischer Gradient, der die treibende Kraft für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle darstellt (Churchill (1985)). Um diesen Gradienten aufrecht zu erhalten, muss die Zelle in der Lage sein,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol zu pumpen. Solche Pumpmechanismen stellen der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen dar (s. Abb. 3). Beide Mechanismen führen zu einem nach extrazellulär gerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport (Karaki et al. (1997)). Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nutzt den elektrochemischen Gradienten für  $\text{Na}^+$ -Ionen aus, der durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten wird und verwendet die Energie für den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen nutzen die Energie, die bei der Spaltung von ATP in ADP entsteht, um gegen den elektrochemischen Gradienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle zu befördern oder

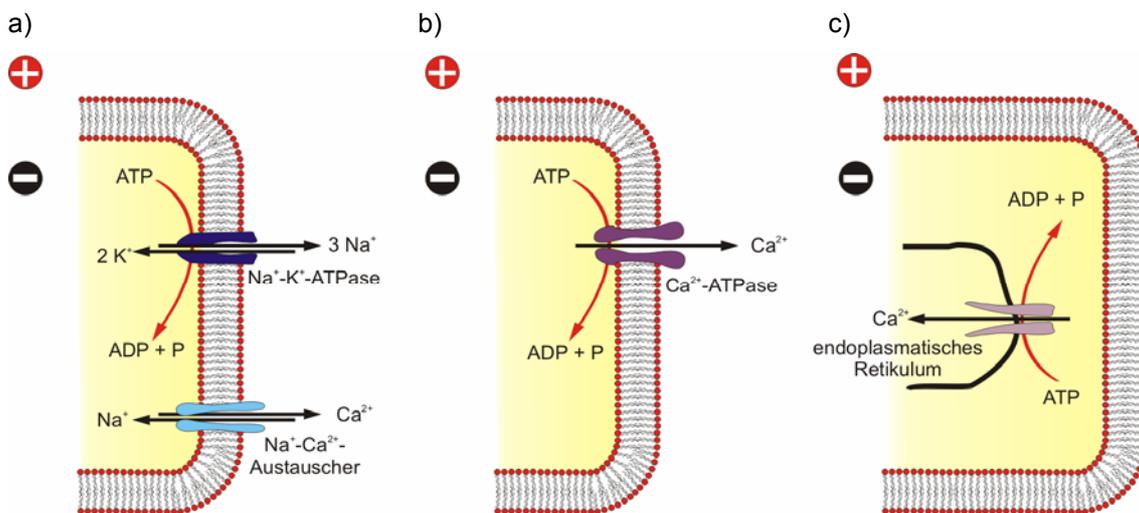


Abb. 3 Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der juxtaglomerulären Zellen

a) Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol mit Hilfe des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der den elektrochemischen Gradienten von  $\text{Na}^+$  als Energielieferant benutzt.

b) Herauspumpen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Dieser Transporter bezieht seine Energie aus der Spaltung von ATP in ADP+P, um den elektrochemischen Gradienten von  $\text{Ca}^{2+}$  zu überwinden.

c) Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe eines ATP-abhängigen Transporters (SERCA). Auch hier wird die Energie aus der Spaltung von ATP gewonnen.

## Einleitung und Fragestellung

---

in das endoplasmatische Retikulum zu pumpen (Karakı et al. (1997)). Intrazellulär besteht die Möglichkeit für die Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien zu speichern. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gelangen mittels der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) in das endoplasmatische Retikulum (Wuytack et al. (1982)). Der Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Mitochondrien kommt hierbei eine eher untergeordnete Rolle zu. Die relative Größe des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools beträgt nur ca. 1:20 gegenüber dem endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool (Karakı et al. (1997)). Um einen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu erreichen, kann die Zelle mehrere Mechanismen in Anspruch nehmen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können aus dem Extrazellulärraum in die Zelle strömen, aus den intrazellulären Speichern (z.B. endoplasmatisches Retikulum) freigesetzt werden und durch Gap junctions aus benachbarten Zellen einströmen.

Bisher konnten mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalfamilien gefunden werden: Spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VOCC's; voltage operated calcium channels), Rezeptor-aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (ROCC's; receptor operated calcium channels) und Speicher-aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (SOCC's; store operated calcium channels).

### *1.3.1.1.2.1 Anstieg der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch spannungsabhängige $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VOCC's)*

Wie die glatten Muskelzellen der Gefäßwände besitzen juxtaglomeruläre Zellen spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $\text{Ca}_v$ ), die sich durch eine Depolarisation der Zelle öffnen und so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle ermöglichen (Churchill (1985), Kurtz (1989)). Es gibt fünf unterschiedliche Subtypen dieser Kanäle, L-, T-, N-, P/Q- und R-Typ. Sie sind durch die Zusammensetzung der Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) des Kanals, wovon jeder Kanal bis zu fünf besitzt, definiert (Übersichtsarbeiten Catterall et al. (2002), Ertel et al. (2000)). Gordienko et al. (1994) konnte durch die Patch-clamp Methode zeigen, dass in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Rattenniere T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

## Einleitung und Fragestellung

---

(low voltage activated,  $Ca_v3.x$ ) und L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle (high voltage activated,  $Ca_v1.x$ ) vorhanden sind. Hansen et al. (2001) wies in der afferenten Arteriole der Rattenniere Untereinheiten der Kanäle  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  und somit ebenfalls T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle nach. In der efferenten Arteriole konnten dagegen bisher keine L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle nachgewiesen werden (Feng et al. (2004)). Hansen et al. (2000) konnten in der afferenten Arteriole und im extraglomerulären Mesangium (EGM) der Rattenniere zusätzlich noch einen P-/Q-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal ( $Ca_v2.x$ ) nachweisen. Hierbei handelt es sich um einen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanal, der aus dem Nervengewebe bereits bekannt ist (Catterall et al. (2002)). Scholz et al. (1991) gelang kein Nachweis von VOCC's in den juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. Scholz und Kurtz (1995) fanden ebenfalls keinen Anhalt für  $Ca_v$ -Kanäle an juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole der Mäuseniere. In größerer Entfernung vom reninpositiven Bereich der afferenten Arteriole konnten sie jedoch in glatten Muskelzellen VOCC's durch die Patch-clamp Methode nachweisen. T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen sich bei einem Membranpotential von ca.  $-50$  mV und zeigen eine rasche Aktivierung und Inaktivierung (Fox et al. (1987), Übersicht in Perez-Reyes et al. (1998)). L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen bei einem Membranpotential von ca.  $-40$  mV und zeigen eine langsamere Kinetik in der Aktivierung und Inaktivierung (Fox et al. (1987)). P-/Q-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle zeigen im Vergleich zu L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen eine noch langsamere Kinetik und werden stark durch G-Protein gekoppelte intrazelluläre Vorgänge moduliert (Hansen et al. (2000)). T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle kooperieren gemeinsam und kontrollieren den  $Ca^{2+}$ -Influx in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole (Feng et al. (2004)). Die Rolle der P-/Q-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle ist hier noch nicht vollständig und abschließend geklärt. Wie aus dem vorangegangenen Kapitel ersichtlich, sind die Angaben über die Existenz und Funktion von T-Typ- und L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen in juxtaglomerulären Zellen teilweise kontrovers und daher sicherlich nicht abschließend geklärt.

### *1.3.1.1.2.2 Beeinflussung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Rezeptor-aktivierte Kanäle (ROCC's) in den juxtaglomerulären Zellen der Niere*

ROCC's führen nach Bindung des Liganden an den Rezeptor - direkt oder indirekt - über einen second messenger zu einer lokalen Permeabilitätserhöhung der Zellmembran für unterschiedliche Ionen oder zu einer Entleerung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern. Angiotensin II, Adenosin, Vasopressin, Endothelin und  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten (z.B. Noradrenalin) führen zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Aktivierung von ROCC's und dadurch zu einer Hemmung der Reninsekretion (Churchill (1985)). Angiotensin II, Adenosin und Vasopressin aktivieren die PLC in den reninsezernierenden Zellen und führen dadurch zur Synthese von  $IP_3$  und DAG (Kurtz (1989), Rossi et al. (1987a)).  $IP_3$  setzt  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol frei (Churchill (1995)). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die die Öffnungswahrscheinlichkeit von  $Ca^{2+}$ -Kanälen erhöht und dadurch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die reninsezernierenden Zellen verstärkt (Kurtz (1989), Scholz et al. (1991), Dixon et al. (1994)). Endothelin verursacht eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in glatten Muskelzellen der Arteria mesenterica von Ratten durch Aktivierung der ADP-Ribosylcyclase und der damit verbundenen Produktion von cADP-Ribose. cADP-Ribose bindet intrazellulär an den Ryanodin-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums und verursacht eine Entleerung dieses Calciumspeichers (Giuliumian et al. (2000)). Fellner und Arendshorst (2000) konnten den Ryanodin-Rezeptor auch in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Rattenniere nachweisen. Dies wäre ein möglicher Weg, die Freisetzung von Renin durch Endothelin zu hemmen. Die Hypothese ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Noradrenalin, ein Agonist des  $\alpha_1$ -Rezeptors, führt in den reninsezernierenden Zellen zu einer Aktivierung der PLC, wobei das dabei gebildete DAG und die Aktivierung der PKC eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  spielt (Helliwell und Large (1997)). Albert und Large (2002) konnten an glatten Muskelzellen der Pfortader zeigen, dass die Erhöhung der



## Einleitung und Fragestellung

---

ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle von extrazellulär resultiert (Hoth und Penner (1992)). Bei der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Stimulation von  $\alpha_1$ -Rezeptoren, scheinen die Speicher-aktivierten Kanäle auch ohne die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum aktiviert zu werden (Albert und Large (2002)).

### *1.3.1.1.2.3 Einfluss von Speicher-aktivierten $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (SOCC's) auf die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von reninsezernierenden Zellen*

SOCC sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchlässige Kationen-Kanäle der Zellmembran (McFadzean und Gibson (2002)). Eine Stimulation der jeweiligen Rezeptoren führt durch die Synthese von  $\text{IP}_3$  oder ADP-Ribose zur Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (s. Kap.1.3.1.1.2.2) und zur Öffnung von SOCC's (Schulz und Krause (2004)). SOCC's gehören zur Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential) (McFadzean und Gibson (2002)). Die Aktivierung dieser Kanäle führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (Übersichtsarbeit in Parekh und Penner (1997)). SOCC's wurden von Fellner und Arendshorst (1999) in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Niere nachgewiesen und Schweda et al. (2000) konnten zeigen, dass durch eine Aktivierung der SOCC's die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen vermindert wird. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch SOCC's dient vermutlich der Wiederauffüllung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, kann jedoch auch anderweitige Funktionen, wie die Inhibition der Reninsekretion übernehmen (Parekh und Penner (1997)). Der genaue Signaltransduktionsweg zwischen der Speicherentleerung und der Aktivierung von SOCC's ist bislang noch nicht bekannt. Diskutiert wurden bisher drei unterschiedliche Modelle der Aktivierung von SOCC's (Übersichtsarbeit in Parekh und Penner (1997), Parekh (2003), Ma et al. (2000)):

1. die Vesikelfusionshypothese besagt, dass die SOCC's in Vesikeln intrazellulär vorliegen und die Aktivierung mit dem Einbringen der Kanäle in die Zellmembran durch Exozytosevorgänge stattfindet

2. die direkte örtliche Interaktion des IP<sub>3</sub>-Rezeptors mit SOCC's
3. die intrazelluläre Diffusion von Aktivormolekülen vom endoplasmatischen Retikulum zu den SOCC's

Keiner dieser Wege konnte bisher bewiesen oder ausgeschlossen werden.

### **1.3.1.2 cAMP in der Regulation der Reninsekretion**

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gehört, wie Ca<sup>2+</sup>-Ionen, zum System der intrazellulären second messenger. Die Bildung von cAMP aus ATP wird durch das membranständige Enzym Adenylatzyklase (AC) katalysiert (Robison et al. (1968)). Zyklisches AMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die weitere Effektormoleküle phosphoryliert und dadurch aktiviert. Durch das Enzym Phosphodiesterase (PDE) wird cAMP zu AMP abgebaut und dadurch inaktiviert. Mehrere Isoformen dieses Enzyms (PDE3, PDE4A, PDE4B) wurden in den juxtaglomerulären Zellen bislang beschrieben (Friis et al. (2002)). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zum Anstieg der Reninsekretion (Keeton und Campbell (1980)) (s. Abb. 5). Eine Stimulation von β<sub>1</sub>-Adrenozeptoren, Adenosin A<sub>2</sub>-Rezeptoren, Dopamin-D<sub>1</sub>-Rezeptoren, metabotropen Glutaminrezeptoren und Prostaglandinrezeptoren führte in zahlreichen Experimenten mehrerer Arbeitsgruppen zur Steigerung der Reninsekretion (Übersicht in Keeton und Campbell (1980)). All diese Rezeptoren steigern durch G-Protein vermittelte Aktivierung der AC die Synthese von cAMP (Churchill (1995)). Schwertschlag und Hackenthal (1982) konnten zeigen, dass Forskolin, ein rezeptorunabhängiger Aktivator der AC, die Reninsekretion ebenfalls erhöht. Auch die Applikation von membrangängigen cAMP-Derivaten wie dibutyryl cAMP (db cAMP) führte zur gesteigerten Reninsekretion (Devlin und Leckie (1994)). Theophyllin, ein PDE-Inhibitor, konnte durch Hemmung des cAMP-Abbaus in den juxtaglomerulären Zellen ebenfalls zu einer vermehrten Reninsekretion führen (Peart et al. (1975), Viskoper et al. (1977)). Friis et al. (2002) zeigten in ihren Experimenten, dass die Steigerung der Exozytose von Reninvesikeln durch cAMP von der

## Einleitung und Fragestellung

Aktivierung der PKA abhängt. Durch Steigerung der cAMP-Konzentration kann nicht nur die Sekretion von Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere angeregt werden, die Syntheseleistung der Zellen für dieses Protein wird auch auf der Ebene der Transkription erhöht (Klar et al. (2002), Persson (2003)). Der Einfluss von cAMP auf die  $[Ca^{2+}]_i$  wird bisher kontrovers diskutiert.

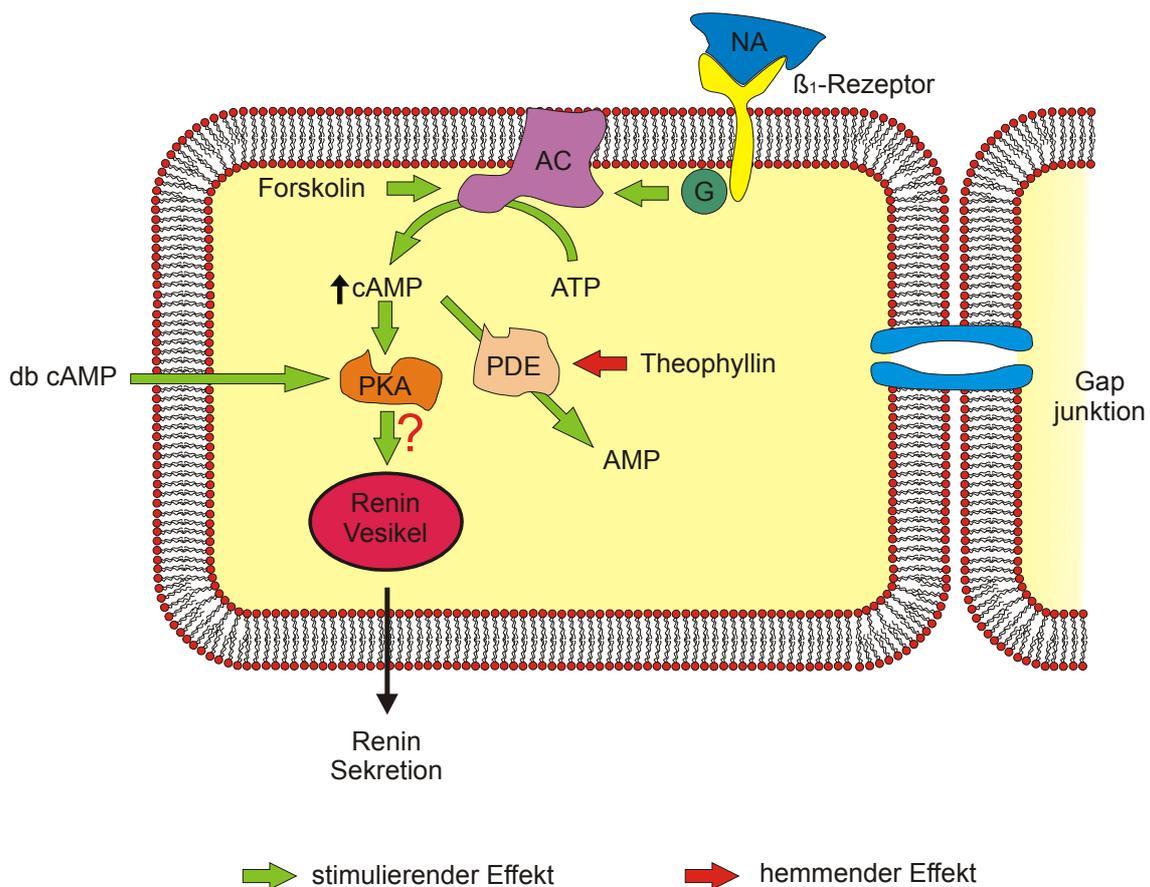


Abb. 5 Einfluss von cAMP auf die Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen am Beispiel des am  $\beta_1$ -Rezeptor angreifenden Noradrenalin (NA). Dargestellt sind auch die unterschiedlichen Angriffspunkte der experimentell angewendeten Substanzen Theophyllin, Forskolin und db cAMP. Durch Stimulation des  $\beta_1$ -Rezeptors kommt es zur G-Protein-gekoppelten Aktivierung der AC mit einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP und der Steigerung der Reninsekretion. Zyklisches AMP wird in den Zellen durch die PDE zu AMP inaktiviert.

Kurtz und Penner (1989) berichteten von einer Hemmung der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in juxtaglomerulären Zellen. Ebenso konnte eine Verminderung der  $Ca^{2+}$ -Permeabilität der Zellmembran durch cAMP gemessen werden (Kurtz (1989)). Aus diesen Ergebnissen wäre eine Verringerung der

## Einleitung und Fragestellung

---

$[Ca^{2+}]_i$  durch cAMP ein möglicher Weg, die Reninsekretion zu steigern. Laske-Ernst (2003) dagegen konnte unter Isoprenalin, einem  $\beta$ -Sympathomimetikum, in Verbindung mit IBMX, einem Phosphodiesterase-inhibitor, zeigen, dass bei reninsezernierenden Zellen der Rattenniere die  $[Ca^{2+}]_i$  durch die cAMP-erhöhenden Maßnahmen anstieg. Die genauen Signaltransduktionswege mit ihren komplexen Interaktionen sind hier noch nicht vollständig geklärt.

### **1.3.1.3 cGMP in der Regulation der Reninsekretion**

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist, wie cAMP, ein zyklisches Nukleosid und gehört zum System der intrazellulären second messenger. Die Synthese von cGMP erfolgt durch die Guanylatzyklase (GC) (Waldman und Murad (1987)). Hauptmerkmal der unterschiedlichen GC-Isoenzyme ist die Lokalisation innerhalb der Zelle. So wurden bisher membranständige und im Zytosol gelöste Isoenzyme entdeckt (Übersicht in Waldman und Murad (1987)). cGMP wird durch die cGMP-Phosphodiesterase zu GMP abgebaut und inaktiviert. In der Niere wird in diesem Zusammenhang die PDE5 diskutiert (Dousa (1999)). Der Einfluss von cGMP auf die Sekretion von Renin wird in der Literatur kontrovers dargestellt (Churchill (1995)). Henrich et al. (1988) und Della Bruna et al. (1991) diskutierten in ihren Arbeiten cGMP als einen inhibitorischen second messenger in der Regulation der Reninsekretion. Craven und DeRubertis (1985) konnten in ihren Experimenten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen cGMP und der Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere feststellen. Peart et al. (1975) konnten mit cGMP und 8-Br-cGMP, einem zellmembrangängigen Derivat des cGMP, die Reninsekretion stimulieren. Das im Zytosol gelöste Isoenzym der GC wird durch NO und organische Nitrate (z.B Nitroprussidnatrium) (Feelisch und Noack (1987)) sowie durch den Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor (Kurtz et al. (1988)) aktiviert. Der atriale natriuretische Faktor (ANF) dagegen stimuliert die membranständige Isoform der GC (Henrich et al. (1988)). Vidal et al. (1988) hemmten die

## Einleitung und Fragestellung

Sekretion von Renin durch Freisetzung von NO aus dem Endothel, Henrich et al. (1988) durch Applikation von Nitroprussidnatrium und ANF. Takagi et al. (1988) konnten in ihren Experimenten dagegen keinen Effekt von ANF auf die Reninsekretion feststellen. Henrich et al. (1988) fanden heraus, dass die

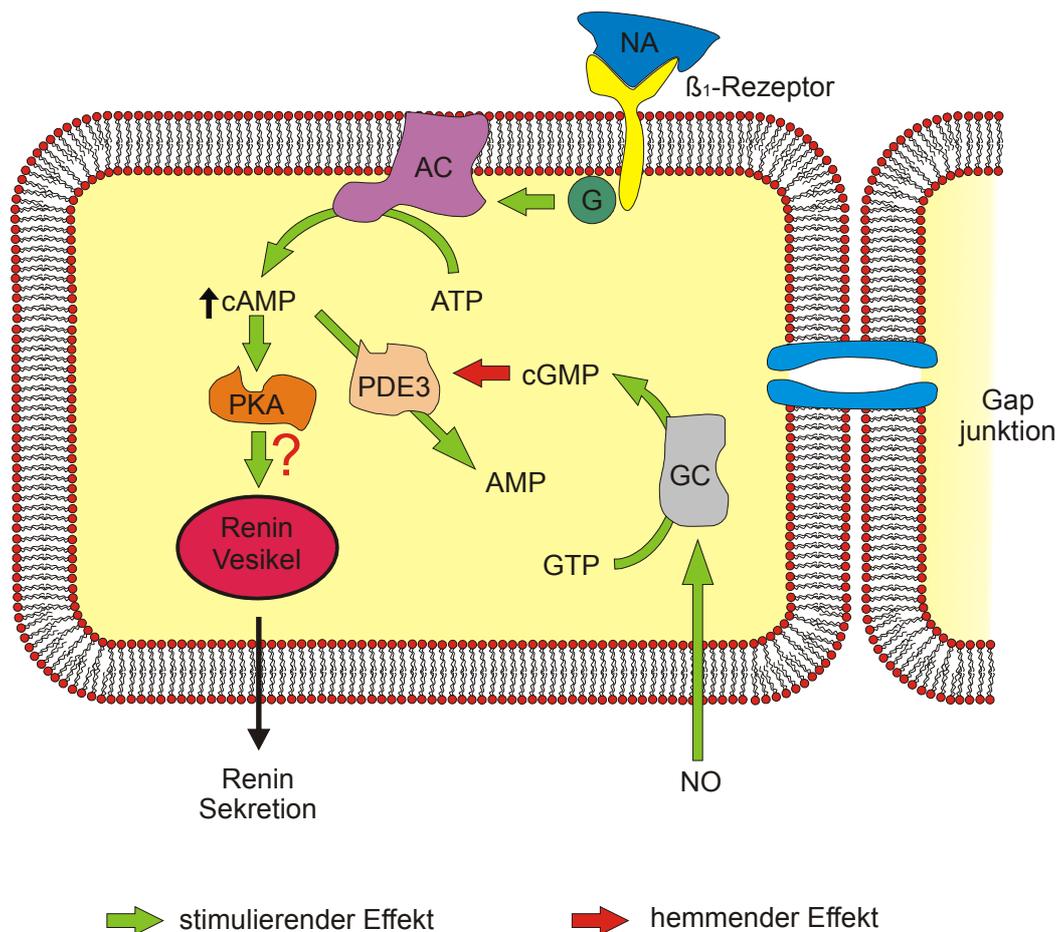


Abb. 6 Aktivierender Einfluss von cGMP auf die Regulation der Reninsekretion nach Kurtz et al. (1998) und Sayago und Beierwaltes (2001). cGMP wird durch die Guanylatcyclase aus GTP gebildet und hemmt die PDE3. Dadurch wird die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht. cAMP ist ein stimulierender second messenger in der Regulation der Reninsekretion.

Stimulation der Reninsekretion durch Isoproterenol und der damit verbundenen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, durch ANF, 8-Br-cGMP und Nitroprussidnatrium gehemmt werden konnte und stellten damit eine Verbindung zwischen den Signaltransduktionswegen der beiden second messenger cAMP und cGMP her. Kurtz et al. (1998) sowie Sayago und

Beierwaltes (2001) untersuchten die Hypothese, dass cGMP die PDE3 hemmt. PDE3 inaktiviert in reninsezernierenden Zellen den sekretionsstimulierenden second messenger cAMP zu AMP (s. Abb. 6, Kap. 1.3.1.2). Sayago und Beierwaltes (2001) erhöhten die intrazelluläre cGMP-Konzentration durch Hemmung der PDE5 mit Zaprinast und erreichten dadurch eine signifikante Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration und der Reninsekretion. Dies führten sie in Anlehnung an die Experimente von Kurtz et al. (1998) auf die Hemmung der PDE3 durch cGMP zurück. Kurtz et al. (1998) beschrieb die PDE3 als eine cGMP-gehemmte cAMP-PDE. Waldman und Murad (1987) diskutierten einen umgekehrten Zusammenhang zwischen cGMP und der  $[Ca^{2+}]_i$  in glatten Gefäßmuskelzellen. Dieser Zusammenhang wurde jedoch in juxtaglomerulären Zellen noch nicht nachgewiesen. Die exakten Interaktionen zwischen der intrazellulären cGMP-Konzentration in Verbindung mit der intrazellulären cAMP-Konzentration und der  $[Ca^{2+}]_i$  in der Regulation der Reninsekretion sind nicht abschließend geklärt.

### **1.3.1.4 Das Membranpotential in der Regulation der Reninsekretion**

Das Membranpotential sowie Veränderungen des Membranpotentials haben wichtige regulatorische Funktionen bei Exozytoseprozessen in sekretorischen Zellen (Penner und Neher (1988)). Jede Zelle besitzt unter physiologischen Bedingungen ein Ruhemembranpotential. Das Ruhemembranpotential reninsezernierender Zellen wurde durch mehrere Arbeitsgruppen bereits untersucht und lag meist zwischen  $-60$  mV und  $-70$  mV (s. Tab. 1). Das Ruhemembranpotential juxtaglomerulärer Zellen kommt überwiegend durch die hohe Membranpermeabilität dieser Zellen für  $K^+$ -Ionen zustande. Daher führt eine starke Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration zur Depolarisation der Zellen und zur verminderten Reninsekretion (Fishman (1976)). Zusätzlich besitzen die juxtaglomerulären Zellen langsame, gleichrichtende  $K^+$ -Kanäle, die bei einer starken Depolarisation öffnen und das Ruhemembranpotential wieder herstellen (Bührle et al. (1986)). Kurtz und Penner (1989) konnten zeigen, dass

## Einleitung und Fragestellung

reninsekretionshemmende Substanzen wie ANG II, Arginin-Vasopressin und  $\alpha_1$ -Rezeptor-Agonisten eine Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen hervorrufen. ANG II verursacht dies durch Blockade der einwärts-

Publikation	Ruhemembranpotential
Fishman (1976)	- 35 mV und - 70 mV
Bührle et al. (1984)	- 55 mV
Bührle et al. (1985)	- 58 mV
Bührle et al. (1986)	- 73 mV
Kurtz und Penner (1989)	- 62 mV
Russ et al. (1999)	- 61 mV

Tab. 1 Chronologische Darstellung der Messungen des Ruhemembranpotentials juxtaglomerulärer Zellen unterschiedlicher Arbeitsgruppen

gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle (Kurtz und Penner (1989)). In Anlehnung an das Calciumparadoxon wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und dadurch zur Hemmung der Reninsekretion führt (Fray et al. (1987)). Welche  $Ca^{2+}$ -Kanäle bei der Depolarisation für einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom sorgen, ist nicht abschließend geklärt. Die Rolle von spannungsaktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanälen (VOCC's) wurde bereits in Kap. 1.3.1.1.2.1 erläutert. Fishman (1976) konnte eine Hyperpolarisierung der juxtaglomerulären Zellen durch Adrenalin, einem  $\beta$ -Sympathikomimetikum, welches die Reninsekretion stimuliert, messen. Bührle et al. (1984) konnten dagegen unter den beiden  $\beta$ -Sympathikomimetika mit reninsekretionserhöhender Aktivität, Isoprenalin und Orciprenalin, keinen Einfluss auf das Membranpotential von juxtaglomerulären Zellen finden. Weitere reninsekretionsstimulierende Substanzen, wie Histamin und Prostaglandin  $E_2$ , zeigten ebenfalls keinen Effekt auf das Membranpotential juxtaglomerulärer Zellen (Bührle et al. (1986)). Hamilton et al. (1986) fanden einen hyperpolarisierenden und vasorelaxierenden Effekt des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners (ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanal) Cromakalim an glatten Muskelzellen der Portalvene

## Einleitung und Fragestellung

---

von Ratten. Diese Substanz wurde von Ferrier et al. (1989) einer klinischen Studie am Menschen unterzogen. Unter Cromakalim wurde in vivo eine Erhöhung der Plasmaaktivität von Renin, ANG II und Noradrenalin festgestellt. In vitro (Zellkultur juxtaglomerärer Zellen der Rattenniere) wurde ebenfalls eine Erhöhung der Reninsekretion durch Cromakalim festgestellt. Die Hyperpolarisierung durch Cromakalim und der dadurch bedingten Erhöhung der Plasmareninaktivität wurde durch Richer et al. (1990) und Pratz et al. (1991) bestätigt. Glibenclamid, ein Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals, führt zu einer Verminderung der Reninsekretion (Richer et al. (1990), Pratz et al. (1991)). Eine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Cromakalim und Glibenclamid konnte durch Russ et al. (1999) jedoch nicht festgestellt werden. Der Zusammenhang zwischen der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem Membranpotential und der Reninsekretion ist noch größtenteils unbekannt und bedarf weiterer Aufklärung.

### **1.3.1.5 Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf die Reninsekretion**

Die Niere ist das wichtigste Organ in der Regulation des Körperwassers, der Elektrolyte und des Blutdrucks (Churchill (1995)). Sie stellt damit auch das wichtigste Organ in der Regulation der extrazellulären Osmolarität dar. Die Reninsekretion wird durch Veränderungen der extrazellulären Osmolarität beeinflusst (Übersichten in Kurtz (1989) und Skøtt (1988)). Frederiksen et al. (1975) konnten an Rattenglomeruli mit anhängender afferenter Arteriole in vitro zeigen, dass die Reninsekretion durch Abnahme der extrazellulären Osmolarität gesteigert wird und vice versa. Skøtt und Taugner (1987) konnten dieses Ergebnis in ihren Experimenten bestätigen und untersuchten gleichzeitig ultrastrukturelle Veränderungen der mit Lösungen unterschiedlicher Osmolaritäten umspülten juxtaglomerulären Zellen. In den hypoosmolar behandelten Zellen zeigten sich die Reningranula aufgetrieben und waren nahe an der Zellmembran lokalisiert, was den Kontakt zur Zellmembran und die Exozytose wahrscheinlicher erscheinen ließ. Im Gegensatz dazu erwiesen sich

die Renin granula in hyperosmolar behandelten Zellen als kleiner und wiesen eine größere Distanz zur Zellmembran auf. Ein Zusammenhang zwischen der Schwellung und der Exozytose von Reninvesikeln wurde bereits durch Taugner et al. (1984) und Skøtt (1986b) in anderen Experimenten zuvor beschrieben. Park et al. (1992) fanden eine Verbindung zwischen der  $[Ca^{2+}]_i$  und der Schwellung von Reninvesikeln in juxtaglomerulären Zellen. Diese Schwellung konnte durch  $Ca^{2+}$ -Ionen verhindert und dadurch die Reninsekretion vermindert werden. Die Hemmung der Reninsekretion durch hyperosmolare Bedingungen wird jedoch nicht durch einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht (Skøtt (1988)). Die exakten Transduktionswege in der Regulation der Reninsekretion durch die extrazelluläre Osmolarität sind jedoch noch nicht bekannt.

### **1.3.2 Regulation der Reninsekretion durch Botenstoffe und Mediatoren**

#### **1.3.2.1 Regulation der Reninsekretion durch Angiotensin II**

Vander und Geelhoed (1965) beobachteten, dass beim anästhesierten Hund intravenös appliziertes ANG II, bei einem konstanten renalarteriellen Blutdruck, die basale und die stimulierte Reninfreisetzung hemmt. Sie vermuteten eine direkte Beeinflussung der Reninsekretion durch ANG II. Die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II wird als negativer Feedbackmechanismus bezeichnet (Blair West et al. (1971)). Shade et al. (1973) fanden heraus, dass dieser Mechanismus unabhängig von der Macula densa funktioniert, was die These der direkten Beeinflussung der juxtaglomerulären Zellen durch ANG II verstärkte. McDonald et al. (1975) konnten durch den kompetitiven ANG II-Inhibitor  $[Sar^1-Gly^8]$ Angiotensin II die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II aufheben und kamen dadurch dem Mechanismus des membranständigen Rezeptors näher. In der afferenten Arteriole der Rattenniere konnten bisher zwei unterschiedliche Subtypen von Angiotensin II-Rezeptoren gefunden werden, der  $AT_{1A}$  und der  $AT_{1B}$ -Rezeptor (Chatziantoniou und Arendshorst (1993), Chatziantoniou et al. (1994)). Die  $AT_1$ -Rezeptorfamilie

## Einleitung und Fragestellung

---

gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Sasaki et al. (1991), Murphy et al. (1991b)). Dieser G-Protein gekoppelte Signaltransduktionsweg wurde durch die Experimente von Hackenthal et al. (1985) gefestigt (s. Abb. 4). Über G-Proteine sind unterschiedliche Transduktionswege möglich: zum einen die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem  $\text{Ca}^{2+}$  über den  $\text{IP}_3$ -Signaltransduktionsweg zum anderen die intrazelluläre Synthese von cAMP durch die Adenylatzyklase. Kurtz und Penner (1989) konnten an juxtaglomerulären Zellen eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter ANG II messen. Vandongen et al. (1974) erklärten die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II über eine Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Beide second messenger,  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP, scheinen gleichzeitig vorhanden zu sein und könnten sich so gegenseitig beeinflussen. Timmermans et al. (1993) beschreiben durch ANG II eine Aktivierung der PLC mit intrazellulärer Erhöhung von  $\text{IP}_3$  mit der dadurch bedingten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern sowie gleichzeitig eine Hemmung der Adenylatzyklase (AC) mit Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Genaueres über die Regulation der Reninsekretion durch cAMP und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann den Kapiteln 1.3.1.1 und 1.3.1.2 entnommen werden. Eine Charakterisierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals unter ANG II in juxtaglomerulären Zellen der Mäuseniere fand durch Kurtz und Penner (1989) statt. Sie beobachteten einen schnellen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Peak), gefolgt von einer Phase mit konstant hoher  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Plateau). Kurtz und Penner (1989) vermuteten hinter dem zweiphasigen Verlauf eine unterschiedliche Herkunft der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Peakphase sollte durch die Öffnung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, die Plateauphase durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum entstehen. Dieser Effekt konnte durch Loutzenhiser und Loutzenhiser (2000) an der afferenten Arteriole der Rattenniere bestätigt werden. Sie konnten die Plateauphase durch Nifedipin, einem Blocker spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle), unterdrücken, während die Peakphase verkleinert aber noch vorhanden war. Dieses Ergebnis spricht für die Öffnung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen während der Plateauphase (Purdy und Arendshorst

(2001)). Die Aktivierung der SOCC's durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern wäre ebenfalls eine Möglichkeit für die Erklärung der Plateauphase. Sie wurde in Kap. 1.3.1.1.2.3 bereits ausführlich beschrieben. Kurtz und Penner (1989) beobachteten eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen unter ANG II und erklärten dies durch das Schließen einwärtsgerichteter  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{ir}$ ) bzw. durch das Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen. Der genaue Weg der Inhibition der Reninsekretion durch ANG II, die exakte Signaltransduktion bei der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sowie bei der Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen, ist nicht vollständig aufgeklärt.

### **1.3.2.2 Regulation der Reninsekretion durch Adenosin**

In der Niere kommt Adenosin physiologischerweise in einer Konzentration von ca.  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  mol/l vor. Es zirkuliert nicht systemisch und hat eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden, weshalb es als Gewebshormon zu betrachten ist. Die Bildung von Adenosin erfolgt durch die Hydrolyse aus S-Adenosylhomocystein und durch Dephosphorylierung aus 5'AMP. Adenosin kann sowohl intra- als auch extrazellulär entstehen und durch die Zellmembran aus dem Cytosol in das Interstitium gelangen. Aus dem Extrazellulärraum kann Adenosin, durch einen durch Dipyridamol hemmbaren bidirektionalen Transporter, in die Zelle aufgenommen werden. Sehr rasch wird es daraufhin durch die Adenosindesaminase desaminiert oder durch die Adenosinkinase zu 5'AMP phosphoryliert.

Osswald et al. (1978) beobachteten in vivo an Ratten eine Verminderung der Plasmeninkonzentration während der Infusion der Purinbase Adenosin. Die Hemmung der Reninsekretion war jedoch abhängig vom Aktivitätszustand des RAAS und gelang nur in salzarm ernährten Ratten mit hoher Aktivität des RAAS und der damit verbundenen erhöhten Reninsekretionsrate. Durch diese Ergebnisse vermuteten sie einen regulatorischen Einfluss von Adenosin auf die Reninsekretion. Adenosin wirkt direkt an den juxtaglomerulären Zellen über

## Einleitung und Fragestellung

---

Rezeptoren (Skøtt und Baumbach (1985)). Bisher konnten insgesamt vier Adenosinrezeptoren entdeckt werden; der  $A_1$ -,  $A_{2A}$ -,  $A_{2B}$ -, und der  $A_3$ -Rezeptor (Übersicht in Ralevic und Burnstock (1998)). Die wichtigste physiologische Rolle spielen nach bisherigem Kenntnisstand der Adenosin- $A_1$ -, der Adenosin- $A_{2A}$ -Rezeptor und der Adenosin- $A_{2B}$ -Rezeptor (Murray und Churchill (1984), Nishiyama et al. (2001), Jackson et al. (2002)). Die Stimulation des Adenosin- $A_1$ -Rezeptors durch den selektiven  $A_1$ -Rezeptor-Agonist  $N^6$ -Cyclohexaladenosin konnte in vivo an Ratten eine Verminderung der Plasmapreninaktivität verursachen, wobei die Stimulation der Adenosin  $A_2$ -Rezeptoren durch den spezifischen  $A_2$ -Rezeptor-Agonist 5'-N-Ethylcarboxamid-Adenosin eine Erhöhung der Plasmapreninaktivität hervorrief (Churchill und Churchill (1985), Churchill und Bidani (1987)). Churchill und Churchill (1985) beobachteten, dass die Hemmung der Reninsekretion durch  $N^6$ -Cyclohexaladenosin auf das Vorliegen von extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen angewiesen war. Gutiérrez et al. (1999) konnten eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in der isolierten afferenten Arteriole von Kaninchennieren unter Adenosinperfusion durch Fluoreszenzmessungen bestätigen. Adenosin  $A_1$ -Rezeptoren gehören zur Familie der pertussistoxinempfindlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Übersicht in Ralevic und Burnstock (1998)). Die Stimulation des  $A_1$ -Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit anschließender intrazellulärer Synthese von  $IP_3$  und DAG.  $IP_3$  bewirkt eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern mit Aktivierung Speicher-aktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle (SOCC's) (s. Abb. 7). Die Aktivierung der PLC wurde von Hansen et al. (2003) auch in der afferenten Arteriole der Maus beobachtet. Ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Stimulation mit Adenosin mit der Folge einer Inhibition der Reninsekretion, wie dies teilweise von Laske-Ernst (2003) an juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere beobachtet wurde, wäre konform mit dem von Churchill (1995) beschriebenen Calciumparadoxon. Veränderungen der intrazellulären Konzentration von cAMP durch die Stimulation von Adenosin-Rezeptoren wurden von Churchill und Churchill (1985) diskutiert. Freissmuth et al. (1987) konnten eine Aktivierung der

## Einleitung und Fragestellung

Adenylatzyklase durch Stimulation von  $A_2$ -Rezeptoren an der afferenten Arteriole der Kaninchenniere zeigen. Die Stimulation der  $A_1$ -Rezeptoren zeigte hier jedoch keine Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Olivera und Lopez Novoa (1992) bestätigten die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes durch Stimulation von  $A_2$ -Rezeptoren, konnten jedoch zusätzlich eine Verminderung der cAMP-Konzentration durch Stimulation von  $A_1$ -Rezeptoren messen. Man geht heute davon aus, dass die Stimulation der  $A_1$ -Rezeptoren zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  über den  $IP_3$ -Signaltransduktionsweg führt, gleichzeitig jedoch auch die Adenylatzyklase

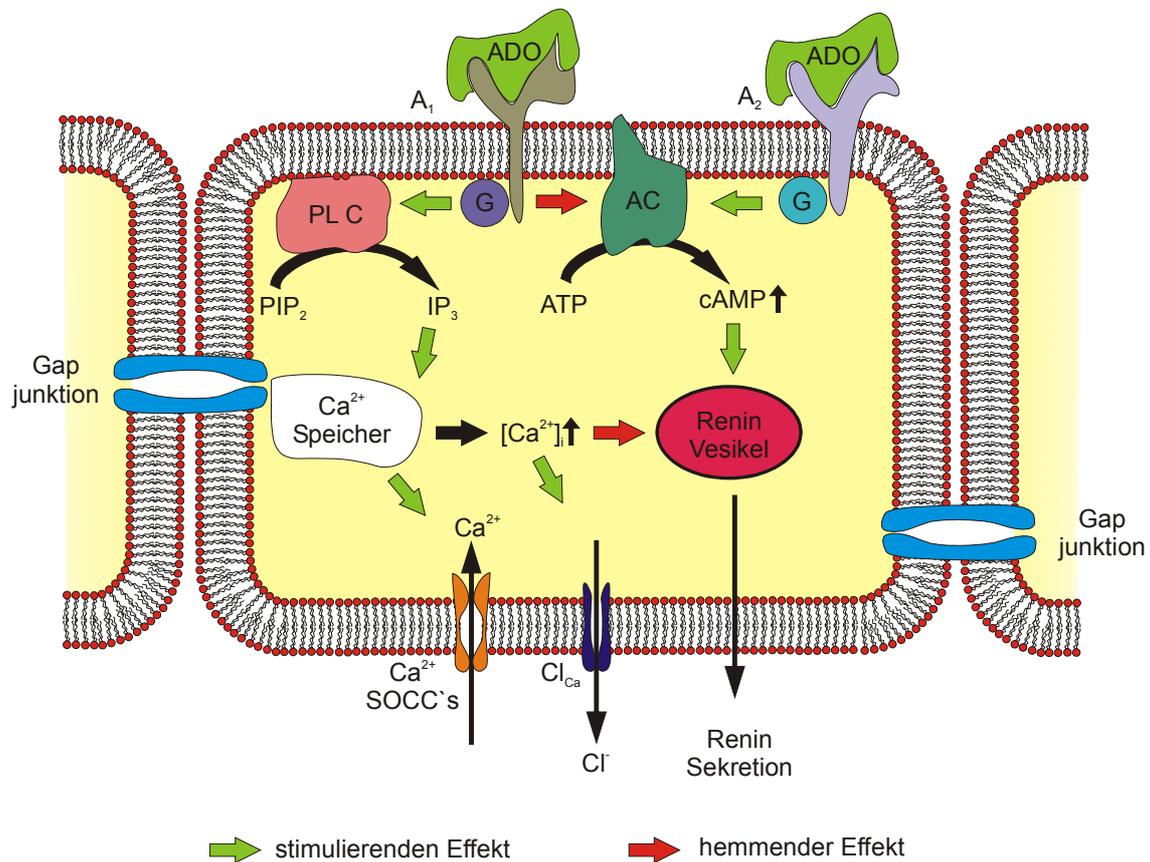


Abb. 7 Einfluss von Adenosin auf die Reninsekretion über den  $A_1$  und  $A_2$ -Rezeptor. Aktivierung des  $A_1$ -Rezeptors führt durch die PLC zu Synthese von  $IP_3$  und zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Weiterhin wird die AC durch den  $A_1$ -Rezeptor gehemmt. Beide Signaltransduktionswege führen zur Verminderung der Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen. Die Aktivierung des  $A_2$ -Rezeptors führt zur Aktivierung der AC und dadurch zur vermehrten Sekretion von Renin.

(AC) gehemmt wird und dadurch die Konzentration von cAMP intrazellulär gesenkt wird. Eine Stimulation der A<sub>2</sub>-Rezeptoren führt hingegen zu einer Aktivierung der AC mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären Konzentration von cAMP (Fredholm et al. (2001)). Beide Signaltransduktionswege arbeiten somit gegeneinander, in welcher Gewichtung sich die beiden Rezeptoren untereinander regulieren und gegenseitig interferieren, ist noch nicht bekannt.

### **1.3.2.3 Synergismus zwischen Adenosin und ANG II**

Spielman und Osswald (1979) beobachteten eine Verminderung der vasokonstriktorischen Wirkung von Adenosin auf intrarenale Widerstandsgefäße von salzarm ernährten Hunden unter Saralasin, einem kompetitiven Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten. Sie vermuteten daher einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Adenosin und ANG II in renalen präglomerulären Gefäßmuskelzellen auf Rezeptorebene. Hall und Granger (1986) schlossen aus ihren Messungen an der Hundeniere, dass Adenosin die vasokonstriktorische Wirksamkeit von ANG II auf die afferente Arteriole verstärkt. Rossi et al. (1987b) beobachteten an afferenten Arteriolen der Rattennieren einen unabhängig voneinander ablaufenden vasokonstriktorischen Effekt von ANG II und Adenosin. Weihprecht et al. (1994) beobachteten einen vasokonstriktorischen Effekt von Adenosin nur in Abwesenheit der Aktivierung von ANG II-Rezeptoren. Aki et al. (2002) zeigten in ihren Experimenten, dass Angiotensin II eine dosisabhängige Vasokonstriktion in Nieren von anästhesierten Hunden bewirkt. Die Infusion von Adenosin verstärkte die Vasokonstriktion zusätzlich. Eine Blockade von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren führte zur Abschwächung der durch ANG II verursachten renalen Vasokonstriktion. Sie diskutierten die Wirkung des Adenosin als eine Verstärkung des vasokonstriktorischen Effektes von ANG II. Diese Verstärkung geschah über die Aktivierung von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren. Traynor et al. (1998) beobachteten eine verminderte Vasokonstriktion, ausgelöst durch den spezifischen A<sub>1</sub>-Rezeptoragonist N<sup>6</sup>-Cyclohexyladenosin,

## Einleitung und Fragestellung

---

in Angiotensin-AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-knock-out-Mäusen. Aus diesen Resultaten schlossen sie auf eine funktionelle Interaktion zwischen Adenosin und ANG II in der Regulation des Tonus der afferenten Arteriole. Die Ergebnisse der oben genannten Arbeiten zeigen einen synergistischen Effekt von ANG II und Adenosin bei der Regulation der Reninsekretion, da beide Substanzen in der Lage sind, die Reninsekretion zu hemmen (s. Kap. 1.3.2.1 und Kap. 1.3.2.2). Gemäß der Theorie des Calciumparadoxons wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  in juxtaglomerulären Zellen von Rattennieren und in Nieren von Adenosin-A<sub>1</sub>-knock-out-Mäusen durch Laske-Ernst (2003) untersucht. In Rattennieren konnte keine Potentionierung der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  bei gleichzeitiger Gabe von ANG II und Adenosin festgestellt werden. In Adenosin-A<sub>1</sub>-knock-out-Mäusen konnte kein Unterschied in der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II im Vergleich zu Wildtypmäusen festgestellt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Entfernung von endogenem Adenosin eine Hemmung der Reninsekretion durch ANG II nicht mehr möglich war (Laske-Ernst (2003)).

### **1.3.2.4 Regulation der Reninsekretion durch Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid (NO) gehört zu den Gewebshormonen. Es wird intrazellulär durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert und erreicht seine Rezeptoren durch Diffusion. NO besitzt eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden (Hubbard et al. (1989)). Die juxtaglomerulären Zellen der Niere sind umgeben von Zellen mit hohen Konzentrationen von NOS-Isoenzymen (Kurtz und Wagner (1998), Wagner et al. (1998)). Mundel et al. (1992) fanden die NOS I (neuronal NOS) in hoher Konzentration im Zytoplasma von Macula densa Zellen der Rattenniere. Wilcox et al. (1992) fanden in diesen Zellen zusätzlich die NOS II (NOS Isoform von glatten Muskelzellen). Die endotheliale Isoform der NOS (NOS III) wurde von Pollock et al. (1993) im Endothel der afferenten Arteriole der Rinderniere durch immunhistochemische Verfahren entdeckt. Bachmann et al. (1995) unternahmen immunhistochemische Untersuchungen am menschlichen Nierengewebe. In Macula densa Zellen

## Einleitung und Fragestellung

---

konnten sie die NOS I in hoher Konzentration nachweisen, in der afferenten und efferenten Arteriole zeigten sie die Anwesenheit der NOS III, jedoch war die Konzentration dieses Isoenzymes in der efferenten Arteriole um ein Vielfaches höher als in der afferenten Arteriole. Mundel et al. (1992) sowie Bachmann et al. (1995) diskutierten den Einfluss der Macula densa auf die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen über die Freisetzung von NO als sehr wahrscheinlich. Ein Einfluss der NOS I der Macula densa Zellen auf die Reninsekretion konnte von Ren et al. (2001) und Castrop et al. (2004) an NOS I-knock-out-Mäusen jedoch nicht gezeigt werden. Ob und in welchem Ausmaß NO einen stimulatorischen bzw. inhibitorischen Effekt auf die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen ausübt ist nicht vollständig geklärt (Schrickler und Kurtz (1993), Kurtz und Wagner (1998)). NO aktiviert die zytosolische Guanylatcyclase und führt dadurch zu einer gesteigerten Synthese des second messengers cGMP in juxtaglomerulären Zellen (Feelisch und Noack (1987), Übersicht in Waldman und Murad (1987), Sayago und Beierwaltes (2001)). Der Einfluss von cGMP auf die Reninsekretion wurde in Kap. 1.3.1.3 bereits erläutert.

### **1.3.2.5 Regulation der Reninsekretion durch Arachidonsäure und deren Metabolite**

Metabolite der Arachidonsäure zählen zu den Gewebshormonen. Man unterscheidet drei Gruppen: die Prostaglandine, die Prostacycline und die Thromboxane. Um Prostaglandine zu synthetisieren, benötigt die Zelle die Cyclooxygenase (COX), ein Enzym, von dem bisher drei Isoformen bekannt sind: COX I-III (Chandrasekharan et al. (2002)). Jensen et al. (1996) konnten in Mesangiumzellen der Nieren von Mäusen die Isoenzyme COX I und COX II nachweisen. Sie untersuchten zusätzlich die Wirkung unterschiedlicher Prostaglandine (PG) und Thromboxane (TX) auf die Reninsekretion und Reningenexpression in juxtaglomerulären Zellen. Sie erreichten eine Erhöhung der Reninsekretion und Reningenexpression durch PG E<sub>2</sub> und PG I<sub>2</sub>. PG F<sub>2α</sub>

und TX B<sub>2</sub> konnten dagegen keinen Anstieg der Reninsekretionsrate bewirken. Sugimoto et al. (1994) konnten drei PG-Rezeptoren in der Niere identifizieren, wobei der PG EP<sub>2</sub>-Rezeptor im glomerulären Bereich lokalisiert wurde. Dieser Rezeptor verursacht nach seiner Aktivierung eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Jensen et al. (1996) vermuteten daher, dass die Erhöhung der Reninsekretionsrate durch PG E<sub>2</sub> und PG I<sub>2</sub> mit einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Aktivierung des PG EP<sub>2</sub>-Rezeptors einhergeht. Zyklisches Adenosinmonophosphat wird heute als ein stimulierender second messenger in der Regulation der Reninsekretion angesehen (s. Kap. 1.3.1.2.). Purdy und Arendshorst (2001) zeigten in ihren Untersuchungen eine Illoprost-vermittelte Verminderung des Anstiegs der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unter ANG II in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. Illoprost ist ein Prostacyclinanalogon. Sie vermuteten eine cAMP-vermittelte Hemmung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Ionenfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch Illoprost. Greenberg et al. (1993) konnten in ihren Messungen zeigen, dass Prostaglandine eine wichtige Rolle in der Regulation der Reninsekretion durch die Macula densa spielen. Die COX II in Macula densa Zellen nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein (Wagner et al. (1998), Castrop et al. (2001)).

### **1.3.3 Regulation der Reninsekretion durch physiologische Faktoren**

#### **1.3.3.1 Der Barorezeptormechanismus**

Der Barorezeptormechanismus stellt die Verknüpfung zwischen dem intravasalen Blutdruck in der afferenten Arteriole und der Reninsekretion dar. Eine Erhöhung des Perfusionsdrucks führt zur Dehnung der in der Tunica media liegenden juxtaglomerulären Zellen und zur Verminderung der Reninsekretion (Vander (1967), Hackenthal et al. (1990), Davis und Freeman (1976)). Die Regulation der Reninsekretion durch den Barorezeptormechanismus ist unabhängig von einer intakten Macula densa und unabhängig vom autonomen Nervensystem (Hackenthal et al. (1990)). Es

## Einleitung und Fragestellung

---

wurde zunächst vermutet, dass die juxtaglomerulären Zellen in ihrer Gesamtheit als Stretchrezeptoren fungieren (Hackenthal et al. (1990)). Fishman (1976) beobachtete in seinen Experimenten, dass eine mechanische Deformierung der juxtaglomerulären Zellen zur Depolarisation führt. Fray et al. (1986) knüpften an diese Ergebnisse an und vertraten die Hypothese, dass eine vermehrte Dehnung der juxtaglomerulären Zellen zu einer Depolarisation mit anschließendem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch VOCC's führt. Eine mechanische Entlastung der Zellen dagegen führt zur Verminderung der Depolarisation oder zur Hyperpolarisation der Zellen mit den Folgen einer Verminderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und damit zu einer Erhöhung der Reninsekretionsrate gemäß dem Calciumparadoxon. An isolierten perfundierten Rattennieren gelang es Jones Dombi und Churchill (1993) den Barorezeptormechanismus durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin, Verapamil und Diltiazem auszuschalten. Wie die Depolarisation der Zellen durch die Dehnung zustande kommt, ist jedoch bisher unklar. Eine Möglichkeit wäre die Öffnung von stretch-aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  direkt erhöhen oder stretch-aktivierte  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, die zu einer Depolarisation mit anschließender Öffnung von VOCC's führen (Fray et al. (1986)).

### **1.3.3.2 Der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus**

Ein wichtiger Mechanismus in der Kontrolle der glomerulären Filtrationrate (GFR) und der NaCl-Ausscheidung der Niere ist der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus (TGF) (Schnermann et al. (1973)). Hierbei wird die Harnzusammensetzung an der Macula densa gemessen und der Blutdruck bzw. der Tonus der afferenten und efferenten Arteriole wird den Erfordernissen zur Regulation der GFR und der NaCl-Ausscheidung angepasst. Der juxtaglomeruläre Apparat weist eine nahe anatomische Beziehung zwischen der Macula densa und den reninproduzierenden Zellen auf (s. Abb. 2). Die Macula densa Zellen sind jedoch nicht direkt mit den juxtaglomerulären Zellen in Verbindung, zwischen diesen beiden Zellpopulationen liegt das

## Einleitung und Fragestellung

---

extraglomeruläre Mesangium. Die Zellen des extraglomerulären Mesangium weisen eine hohe Dichte von Gap junctions untereinander sowie an den Grenzen zur afferenten und efferente Arteriole und an der Grenze zu den Macula densa Zellen auf (Lorenz et al. (1993)). Eine Regulation der Reninsekretion durch die Macula densa wurde von Goormaghtigh (1939) erstmalig beschrieben. Der dicke, aufsteigende Teil der Henle Schleife ist im wesentlichen impermeabel für Wasser, der Ionentransport geschieht hier durch den in der luminalen Zellmembran gelegenen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter. Die NaCl-Reabsorption führt in diesem Abschnitt des Tubulussystems zur Erzeugung eines hypotonen Harns (Gottschalk und Mylle (1959)). Dieser Reabsorptionsmechanismus ist abhängig von der Na-K-ATPase, die wiederum durch den Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration stimuliert wird (O'Grady et al. (1987)). Die NaCl-Konzentration und Osmolarität an der Macula densa liegt somit unter den Werten im Plasma (Vander und Miller (1964)). Osmolarität und NaCl-Konzentration scheinen eine entscheidende Rolle im TGF einzunehmen (Lorenz et al. (1990)). Vander (1967) vertrat die Hypothese, dass die Reninsekretionsrate im umgekehrten Verhältnis zur Na-Reabsorptionsrate der Macula densa steht. Kirchner et al. (1978) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration an der Macula densa im TGF die entscheidende Rolle spielt. Chlorid hemmte hier die Reninsekretion. Spielman und Thompson (1982) vertraten die metabolische Hypothese, eine erhöhte NaCl-Konzentration an der tubulären Seite der Macula densa führt zur Steigerung der Resorptionsrate. Diese erhöhte Resorptionsrate für NaCl führt zu einem Katabolismus der Zellen mit der Folge der Hydrolyse von ATP zu Adenosin und der Freisetzung von Adenosin aus den Macula densa Zellen. Adenosin bewirkt an den juxtaglomerulären Zellen eine Hemmung der Reninsekretion (s. Kap. 1.3.2.2). Lorenz et al. (1993) fanden durch ihre Experimente an der Kaninchenniere heraus, dass Adenosin nicht der einzige parakrine Faktor in der Regulation des TGF ist. Wilcox et al. (1992) entdeckten in den Macula densa Zellen die neuronale Isoform der NOS und schrieben Stickstoffmonoxid einen wichtigen Stellenwert in der Regulation des TGF zu

(s. Kap. 1.3.2.4). Castrop et al. (2004) konnten diese These nach Untersuchungen an der Mäuseniere jedoch nicht bestätigen. Greenberg et al. (1993) konnten durch die Hemmung der COX den TGF signifikant beeinflussen. Diese Ergebnisse räumten den Prostaglandinen einen Stellenwert im TGF ein. Kirchner et al. (1978) fanden durch Messung der Plasmareninaktivität von Ratten vor und nach der peripheren Infusion von chloridhaltigen und chloridfreien Salzlösungen heraus, dass Chloridionen einen inhibitorischen Effekt auf die Reninsekretionsrate ausüben. Scholz et al. (1994a) knüpften an diese Arbeit an und konnten an der Rattenniere den inhibitorischen Effekt von Anionen auf die Reninsekretion durch Hemmung des Chloridtransportes im extraglomerulären Mesangium des juxtaglomerulären Apparates aufheben. Heute geht man davon aus, dass mehrere Mediatorstoffe am TGF beteiligt sind, darunter Adenosin, ATP, NO, Cl<sup>-</sup>-Ionen und Prostglandine (Übersichten in Schnermann und Levine (2003) und Bell et al. (2003)) und dass die Empfindlichkeit des tubuloglomerulären Feedbackmechanismus durch ANG II gesteigert wird (Braam et al. (1995)). Die elektrische und chemische Kopplung zwischen den Macula densa Zellen und der afferenten Arteriole geschieht durch die Gap junctions des extraglomerulären Mesangium (EGM) (Yao et al. (2002)). Durch Unterbrechung dieser elektrochemischen Kopplung gelang es Ren et al. (2002) den TGF aufzuheben. Dies zeigt die wichtige Bedeutung der Gap junctions im TGF.

### **1.3.3.3 *Das sympathische Nervensystem***

Die Niere unterliegt der Innervation von vegetativen Nervenfasern. Einen Teil dieser Innervation übernehmen katecholaminhaltige sympathische Efferenzen. In zahlreichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Denervierung der Niere in vivo zu einer Verminderung der Reninsekretion führt, eine elektrische Stimulation der renalen Efferenzen dagegen erhöht die Reninsekretionsrate (Vander (1967), Keeton und Campbell (1980)). Wathen et al. (1965) zeigten am anästhesierten Hund eine Erhöhung der

## Einleitung und Fragestellung

---

Reninsekretionsrate durch Infusion von Katecholaminen und Norepinephrin in die Nierenarterie. Barajas (1979) beobachtete in histologischen Studien eine hohe Dichte vegetativer Nervenfasern im juxtaglomerulären Apparat. Aus den oben genannten Resultaten ergibt sich die Hypothese, dass eine Veränderung des Sympathikotonus eine Modulation der Reninsekretion verursacht (Osswald und Quast (1995)). Eine Erhöhung der Reninsekretionsrate geschieht durch  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation (Hackenthal et al. (1990)). Hierbei kommt es zur Aktivierung der AC mit der Folge der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (s. Kap. 1.3.1.2). Dieser Mechanismus führt zusätzlich zu einem verstärkten Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und dadurch zur Senkung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Churchill (1995)). Die Rolle der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren ist noch nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert (Hackenthal et al. (1990)). Hisa et al. (1984) sowie Takahashi et al. (1984) beobachteten an Hunden in vivo einen stimulierenden Effekt auf die Reninsekretion durch  $\alpha$ -Adrenozeptoragonisten. Kurtz et al. (1986) konnten die Reninsekretionsrate von juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere, durch hohe Konzentrationen von Norepinephrin, herabsetzen. Sie beobachteten eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Norepinephrin und vermuteten durch diese Substanz eine Aktivierung der PLC mit der Bildung von  $\text{IP}_3$  und der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Norepinephrin bewirkt in niedrigen Konzentrationen eine Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptoren, in hohen Konzentrationen überwiegt jedoch der  $\alpha$ -adrenerge Effekt (Kurtz et al. (1986)). Bührle et al. (1986) konnten mit der Patch-clamp-Methode eine Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonisten messen. Sie vermuteten daher einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch VOCC's in die reninsezernierenden Zellen, der gemäß dem Calciumparadoxon zu einer Verminderung der Reninsekretion führt. In zahlreichen Studien wurde die Rolle der  $\alpha$ -Rezeptoren weiter untersucht. So gibt es heute Anhaltspunkte, dass  $\alpha$ -Adrenozeptoren die Reagibilität des Barorezeptormechanismus beeinflussen. Die Stimulation von

$\alpha$ -Adrenorezeptoren führt vermutlich zur Erhöhung des Schwellenwertes für die Aktivierung des Barorezeptormechanismus (Hackenthal et al. (1990)).

### 1.4 Fragestellung

Das RAAS stellt für Blutdruck, Salz- und Wasserhomöostase ein wichtiges Regulationssystem im Körper dar (s. Kap. 1.1). Die Aktivität des RAAS wird durch die Sekretionsrate der Aspartylprotease Renin reguliert, was von einer Vielzahl von Faktoren abhängt (s. Kap. 1.3). Die exakten intrazellulären Signaltransduktionswege und Interaktionen dieser Faktoren sind bisher größtenteils nur unvollständig aufgeklärt. Die Reninsekretion stellt eine Besonderheit dar, weil hier - im Gegensatz zu anderen sekretorischen Systemen wie der  $\beta$ -Zelle oder der Synapse - die Sekretion mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration invers verknüpft ist: das sogenannte Calciumparadoxon (Kurtz (1989)). Ein entscheidender Rückkopplungsmechanismus im RAAS stellt die Hemmung der Reninsekretion durch ANG II dar (s. Kap. 1.3.2.1). ANG II führt zur Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen. Das von ANG II ausgelöste intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal besteht aus zwei Phasen, der Peakphase und der Plateauphase (Kurtz und Penner (1989)). Welche Ionenkanäle bei der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den jeweiligen Phasen aktiviert werden, ist jedoch bislang nicht vollständig geklärt. Bislang ist bekannt, dass eine Verbindung der juxtaglomerulären Zellen untereinander sowie mit dem Endothel und dem Mesangium durch Gap junctions besteht (Haefliger et al. (2004)). Gap junctions führen zur elektrochemischen Kopplung der Zellen (Ryan et al. (2003)). Welche Rolle die Gap junctions bei der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II spielen, ist jedoch bisher kaum untersucht. Ein weiterer wichtiger intrazellulärer sekundärer Botenstoff in der Regulation der Reninsekretion ist cAMP. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Steigerung der Reninsekretionsrate (s. Kap.

## Einleitung und Fragestellung

---

1.3.1.2). Die Rolle der Proteinkinase A (PKA) im Zusammenspiel von cAMP und  $[Ca^{2+}]_i$  in juxtaglomerulären Zellen ist bisher ebenfalls nicht vollständig geklärt. Durch die regulatorische Funktion des RAAS im Wasserhaushalt wurden bisher ebenfalls Rückkopplungsmechanismen zwischen der extrazellulären Osmolarität und der Reninsekretionsrate beschrieben (Skøtt (1988)). Die Rolle der  $[Ca^{2+}]_i$  in diesem Rückkopplungsmechanismus wurde jedoch nur unbefriedigend in der Literatur dargestellt (s. Kap. 1.3.1.5). Somit wurden in dieser Arbeit Untersuchungen angestellt, die zur Aufklärung folgender Fragen beitragen sollten:

- 1.) Als Kernpunkt der Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welche Funktion L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und SOCC's während der Peak- und der Plateauphase bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimulation reninsezernierender Zellen der Rattenniere mit ANG II übernehmen.
- 2.) Einfluss der Veränderung des Membranpotentials auf die unterschiedlichen Phasen des  $Ca^{2+}$ -Signals unter ANG II-Stimulation.
- 3.) Die Rolle der Gap junctions der afferenten Arteriole der Rattenniere im intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signal der ANG II Stimulation.
- 4.) Die Rolle der PKA bei der Interaktion der beiden intrazellulären second messenger cAMP und  $[Ca^{2+}]_i$ .
- 5.) Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in juxtaglomerulären Zellen durch Veränderung der extrazellulären Osmolarität.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Versuchstiere

#### 2.1.1 Substanzen

Substanz	Hersteller / Vertrieb
ANG II	Sigma, Taufkirchen
2-APB	Tocris, Köln
BaCl <sub>2</sub>	Fluka, Taufkirchen
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Boehringer, Mannheim
Cyclopiazonic Acid (CPA)	Sigma, Taufkirchen
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
db cAMP	Sigma, Taufkirchen
DIBAC <sub>4</sub> (3)	MoBiTec, Göttingen
DMSO	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Furosemid	Sigma, Taufkirchen
Fura-2 (Acetoxymethylester)	MoBiTec, Göttingen / Biotrend Köln
Fura-2 (Kaliumsalz)	MoBiTec, Göttingen
GdCl <sub>3</sub>	Sigma, Taufkirchen
18β-Glycyrrhetic Acid	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
1-Heptanol	Sigma, Taufkirchen
H-89	Sigma, Taufkirchen
3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX)	Sigma, Taufkirchen

## Material und Methoden

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller / Vertrieb</b>
Isoproterenol (ISO)	Sigma, Taufkirchen
Isradipin	Novartis, Basel
Immersionsöl (ne23 1,518)	Leica, Wetzlar
KCl	Merck, Darmstadt
KT5720	Calbiochem, Schwalbach
D-Mannitol	Sigma, Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MnCl <sub>2</sub>	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NPPB	Tocris, Köln
1-Octanol	Sigma, Taufkirchen
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	Biolog, Bremen
Pluronic-F127	Sigma, Taufkirchen
Poly-D-Lysine	Sigma, Taufkirchen
TEA	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.2 Lösungen

#### HEPES gepufferte physiologische Salzlösung (Na-HEPES-PS)

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	140 mM
KCl	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

## Material und Methoden

### K-HEPES gepufferte physiologische Salzlösung (K-HEPES-PS)

<b>Lösung</b>	<b>60 mM KCl</b>	<b>142 mM KCl</b>
<b>Substanz</b>		
<b>NaCl</b>	82,8 mM	2,8 mM
<b>KCl</b>	60 mM	142 mM

Die Konzentrationen der weiteren Substanzen entsprachen dem Na-HEPES-PS

### Poly-D-Lysin-Lösung

Die Substanz wurde als Stammlösung hergestellt (1 mg/1 ml in Aqua bidest.) und bei 8 °C aufbewahrt.

### **2.1.2.1      *Lösungen zur Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration***

#### ANG II in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 1mM Stammlösung (in Aqua bidest.) hergestellt, die je nach verwendeter Konzentration mit der jeweiligen HEPES-PS verdünnt wurde.

#### 2-APB in Na-HEPES-PS

10 mM Stammlösung in Ethanol/DMSO (1:1)

#### BaCl in Na-HEPES-PS

1 M Stammlösung in Aqua bidest.

#### CPA in K-HEPES-PS

10 mM Stammlösung in Ethanol/DMSO (1:1)

#### db cAMP + IBMX in Na-HEPES-PS

IBMX wurde direkt in Na-HEPES-PS eingewogen und 3 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde db cAMP in die Lösung eingewogen.

## Material und Methoden

### Fura-2-Färbelösung

Zu 1,91 ml Na-HEPES-PS wurden 40 µl einer 1 mM Fura-2-AM-Stammlösung (in DMSO) und 50 µl Pluronic (2 % in DMSO) gegeben. Die Lösungen wurden gemischt und für ca. 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Zu dieser Lösung wurde 500 µl Glomerula-Suspension (in Na-HEPES-PS) gegeben. Man erhielt eine 16 µM Fura-2-Färbelösung.

### GdCl<sub>3</sub> in Na-HEPES-PS

10 mM Stammlösung in Aqua bidest.

### 18β-Glycyrrhetic Acid in Na-HEPES-PS

100 mM Stammlösung in Ethanol/DMSO (1:1)

### H-89 in Na-HEPES-PS

10 mM Stammlösung (in Methanol) vom Hersteller geliefert.

### HEPES-PS + EGTA / HEPES-PS + EGTA ohne Ca<sup>2+</sup> (zur Kalibrierung)

<b>Lösung</b> <b>Substanz</b>	<b>HEPES-PS + EGTA</b>	<b>HEPES-PS + EGTA ohne Ca<sup>2+</sup></b>
<b>NaCl</b>	20 mM	20 mM
<b>KCl</b>	100 mM	100 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 mM	1 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	10 mM	0 mM
<b>HEPES</b>	20 mM	20 mM
<b>EGTA</b>	9 mM	9 mM
<b>Fura-2-Kaliumsalz</b>	5 µM	5 µM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

### 1-Heptanol in Na-HEPES-PS

1-Heptanol wurde direkt in die gewünschte Menge Na-HEPES-PS gegeben.

## Material und Methoden

### IBMX 100 $\mu$ M in Na-HEPES-PS

IBMX wurde direkt Na-HEPES-PS eingewogen, für 3 Minuten mit Ultraschall behandelt.

### Isoprenalin (Isoproterenol) in Na-HEPES-PS

Es wurde jeden Tag eine frische 10 mM Isoprenalin-Stammlösung (in Aqua bidest.) hergestellt.

### KT5720 in Na-HEPES-PS

Es wurde eine 2 mM Stammlösung (in DMSO) vom Hersteller geliefert.

### Na-HEPES-PS unterschiedlicher Osmolaritäten

	<b>Hypoosmaolar (232,6 mosmol)</b>	<b>Isoosmolar (312,6 mosmol)</b>	<b>Hyperosmolar (392,6 mosmol)</b>
<b>NaCl</b>	100 mM	100 mM	100 mM
<b>D-Mannitol</b>	0 mM	80 mM	160 mM

Die Konzentration aller weiteren Substanzen entsprach dem Na-HEPES-PS. Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 7,4 eingestellt.

### Na-HEPES-PS ohne $\text{Ca}^{2+}$

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	135 mM
KCl	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM
EGTA	5 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

## Material und Methoden

### Na-HEPES-PS + TEA

Substanz	Konzentration
NaCl	130 mM
KCl	2,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM
TEA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

### 1-Octanol in Na-HEPES-PS:

1-Octanol wurde direkt in die gewünschte Menge Na-HEPES-PS gegeben.

### 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in Na-HEPES-PS

Die Substanz wurde direkt in Na-HEPES-PS eingewogen.

## **2.1.2.2 Lösungen zur Messung des Membranpotentials**

### DiBAC<sub>4</sub>(3)-Färbelösung

Es wurden 25 µl einer 100 µM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung in (DMSO/Ethanol) mit 1,975 ml Na-HEPES-PS gemischt; zu dieser Lösung wurden 500 µl der Glomerula-Suspension (in Na-HEPES-PS) gegeben. Man erhielt eine 1 µM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Färbelösung.

### Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Es wurde eine 10 mM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung in Ethanol/DMSO (1:1) hergestellt, die Stammlösung wurde mit Na-HEPES-PS 1:10 000 verdünnt um eine 1 µM DiBAC<sub>4</sub>(3) Lösung zu erhalten.

## Material und Methoden

### Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) + ANG II

Die gewünschte Menge der 1 mM ANG II-Stammlösung wurde zu Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) gegeben.

### Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) + TEA

Es wurde ein Na-HEPES-PS + TEA hergestellt zu dem die entsprechende Menge der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung gegeben wurde.

### Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) + 18β-Glycyrrhetic Acid

Es wurde die gewünschte Menge 18β-Glycyrrhetic Acid-Stammlösung (100 mM in Ethanol/DMSO (1:1)) zu Na-HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3) hinzugegeben.

### **2.1.2.3 Lösungen zur Fluoreszenzmessung mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer**

#### Calciumchlorid in H<sub>2</sub>O

CaCl<sub>2</sub> wurde in A. bidest gelöst, eine 1 M Lösung wurde hergestellt.

#### Na-HEPES-PS +EGTA

Substanz	Konzentration
NaCl	20 mM
KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	3,6 mM
HEPES	20 mM
EGTA	9 mM
Fura-2-Kalium-Salz	5 μM

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

## Material und Methoden

---

### Na-HEPES-PS + EGTA + 1-Octanol

1-Octanol wurde direkt in die Stammlösung Na-HEPES-PS + EGTA in der gewünschten Menge gegeben.

### Na-HEPES-PS + EGTA + 1-Heptanol

1-Heptanol wurde in der gewünschten Menge direkt in Na-HEPES-PS + EGTA gegeben.

### Na-HEPES-PS + EGTA + 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid

18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid wurde als Stammlösung (0,1 M) in Ethanol/DMSO (1:1) angesetzt. Die gewünschte Menge der Stammlösung wurde in Na-HEPES-PS + EGTA zugegeben.

### Manganchlorid in H<sub>2</sub>O

Eine 1 M MnCl<sub>2</sub> Lösung in A. bidest wurde hergestellt.

### **2.1.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH) mit einem Körpergewicht von 200-500 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % und einem künstlichen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Der Zugang zu Trinkwasser war zu jeder Zeit frei gegeben. Die Tiere erhielten eine einmalige intraperitoneale Furosemid-Injektion (10 mg/kg Körpergewicht). Nach einer Furosemid-Behandlung erhielten die Ratten für mindestens zwei Wochen eine kochsalzarme Diät (Altromin C1036: 150 mg/kg Na<sup>+</sup>, 3 mg/kg Cl<sup>-</sup>).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole**

Die Ratten wurden durch zervikale Dislokation und Dekapitation getötet. Nach dem Ausbluten der Tiere wurden die Nieren nach einem medianen Bauchschnitt entnommen und im Na-HEPES-PS bei 37 °C aufbewahrt. Eine der Nieren wurde sofort verwendet, die zweite wurde in Na-HEPES-PS bei 8 °C ca. fünf Stunden aufbewahrt und dann ebenfalls präpariert.

Zur Vermeidung von Kontaminationen des Präparates (z.B. Proteasen, Keime) wurde immer mit Latex-Handschuhen (Kimberly-Clark SafeSkin Satin Plus) und unter dem Abzug gearbeitet.

Zur Isolierung der Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole wurde die enzymatische Präparation nach Kurtz und Penner (1989) bzw. Russ et al. (1999) verwendet:

- Nierenkapsel mit nicht benötigtem Gewebe von der Niere mit einer feinen Schere befreien
- Niere mit scharfer Rasierklinge halbieren
- Nierenbecken / -kelche mit Fettlager entfernen
- Nierenhälften mit Rasierklinge zerkleinern
- Zerkleinerte Nierenhälften in Na-HEPES-PS + Collagenase A (37 °C) für 60 Minuten inkubieren (im Schüttelwasserbad)

Nach dieser Inkubation wurde die Suspension über Siebe der Maschenweite 200 µm und 125 µm gefiltert. Als Letztes erfolgte das Auffangen der Glomerula mittels eines Siebes der Maschenweite 63 µm.

### **2.2.2 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie**

#### **2.2.2.1 Messapparatur**

Fluoreszenz ist ein Prozess, bei dem fluoreszierende Moleküle, sog. Fluorochrome, energiereiche Strahlung absorbieren (sog. Absorptionsspektrum) und anschließend diese aufgenommene Energie in Form energieärmerer

## Material und Methoden

Strahlung bei längeren Wellenlängen emittieren (sog. Emissionsspektrum). Bei diesem Vorgang werden durch die zugeführte Lichtenergie Elektronen in höhere Energiezustände angehoben und beim Rücksprung, der in Stufen erfolgt, energieärmeres Licht emittiert (sog. Stokes-Verschiebung); es resultiert ein Emissionsspektrum. Um Fluoreszenz auszunutzen, benötigt man eine Energiequelle zur Erzeugung von Anregungsstrahlung, ein Fluorochrom und einen Detektor zum Auffangen des Emissionslichtes. Zur Erzeugung der Anregungsstrahlung und zur Detektion des Emissionslichtes wurde eine von

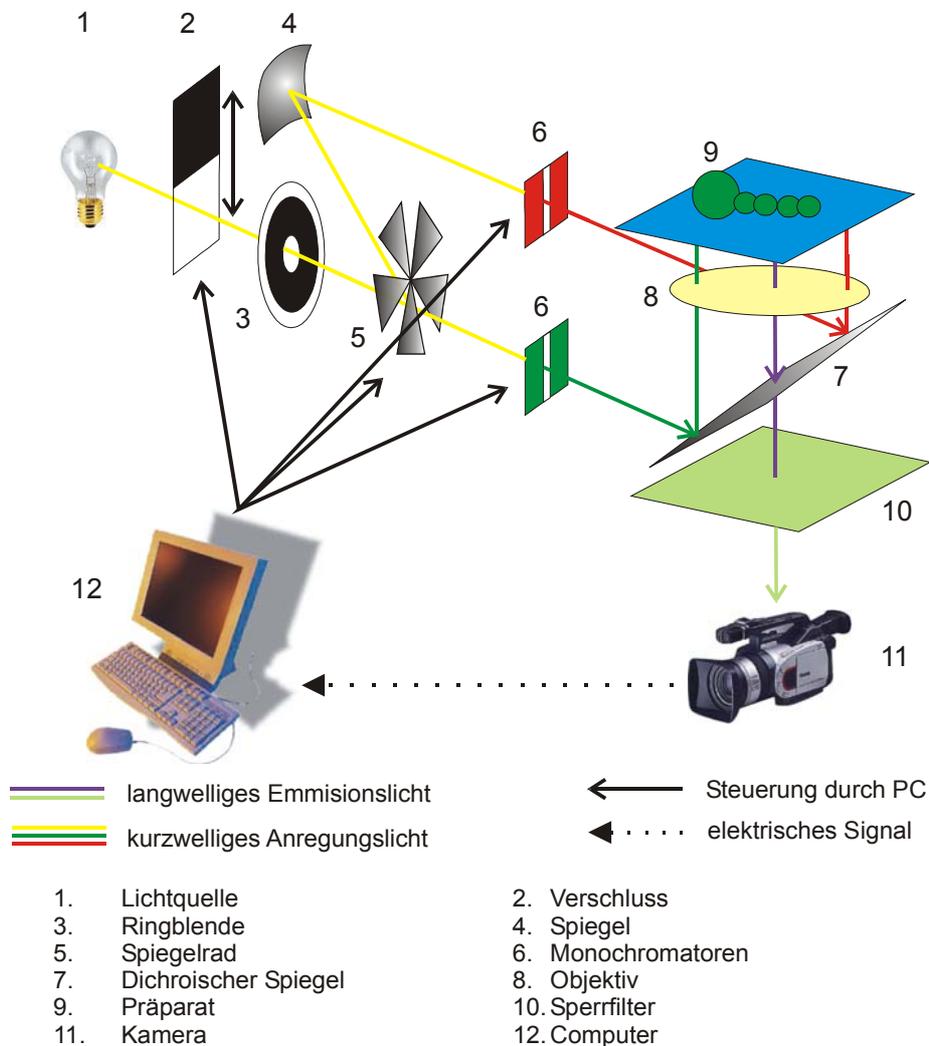


Abb. 8 Funktionsprinzip der Messapparatur

## Material und Methoden

---

Photon Technology International (PTI, NJ, U.S.A.) entwickelte Messapparatur verwendet. Der Strahlengang ist in Abb. 8 dargestellt. Der Lichtstrahl der 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (1) (XBO 75W / 2 OFR, Osram, D), der in diesem System als Lichtquelle dient, kann durch einen Verschluss (2) unterbrochen und die Lichtmenge durch eine Ringblende (3) reguliert werden. Wurde die Messung mit nur einer Wellenlänge benötigt, wie bei der Messung des Membranpotentials mit DiBAC<sub>4</sub>(3), so fiel der Lichtstrahl bei geöffnetem Verschluss durch die Ringblende in einen Monochromator. War die Anregung auf zwei Wellenlängen erforderlich, wie bei der Messung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mit Fura-2, so wurde das Licht abwechselnd mit Hilfe eines drehenden Spiegelrades (5), in die beiden Monochromatoren (6) gelenkt. Das Spiegelrad lässt je nach Stellung den Lichtstrahl in einen Monochromator passieren oder reflektiert ihn in den anderen Monochromator. Verwendet wurden Gitterchromatoren, die das auf das Beugungsgitter auftreffende Licht der Wellenlänge entsprechend auftrennen. Über die Software kann die Stellung des Gitters eingestellt und somit Licht der gewünschten Wellenlänge erzeugt werden. Sowohl die ein- als auch die austretende Lichtmenge kann über die Blenden an den Ein- und Ausgängen der Monochromatoren reguliert werden. Die Blenden waren so eingestellt, dass die Fluoreszenzintensitäten bei beiden Wellenlängen vergleichbar waren. An den Ausgängen waren die Blenden maximal geöffnet, um die gesamte Menge des Anregungslichtes für die Messung zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus kann an den Ein- und Ausgängen der Monochromatoren die Spaltbreite eingestellt werden, was zur Einstellung der Bandbreite des Lichtes dient. Von den Monochromatoren aus gelangt das Anregungslicht über einen Lichtleiter zu einem inversen Mikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan), in dem das kurzwellige Anregungslicht über einen dichroischen Spiegel (7) als Strahlteiler zu einem Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektiv (N.A.: 1.3, CF Flour 40 x, Nikon / N.A.: 1.3, Plan Fluor 100 x, Nikon) gelenkt wird, durch welches das Licht zum Präparat (9) gelangt. Das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Präparat wird durch das eintreffende Licht angeregt und emittiert einen Teil der Energie wieder als

## Material und Methoden

Emissionslicht. Dieses gelangt durch das Objektiv (8) zurück zum dichroischen Spiegel, durchdringt ihn und trifft auf einen nachgeschalteten Emissionsfilter (10), der das Streulicht und Reflektionen absorbiert, so dass nur das emittierte Licht durchtritt. Dieses wird mit einer Restlichtkamera (11) (IC-200, PTI) detektiert, welches die optischen Signale digitalisiert, verstärkt und an den Computer (12) weiterleitet. Der Computer dient zur Steuerung der Aufnahme, zur Datenspeicherung und Auswertung. Es wurden während des Experiments

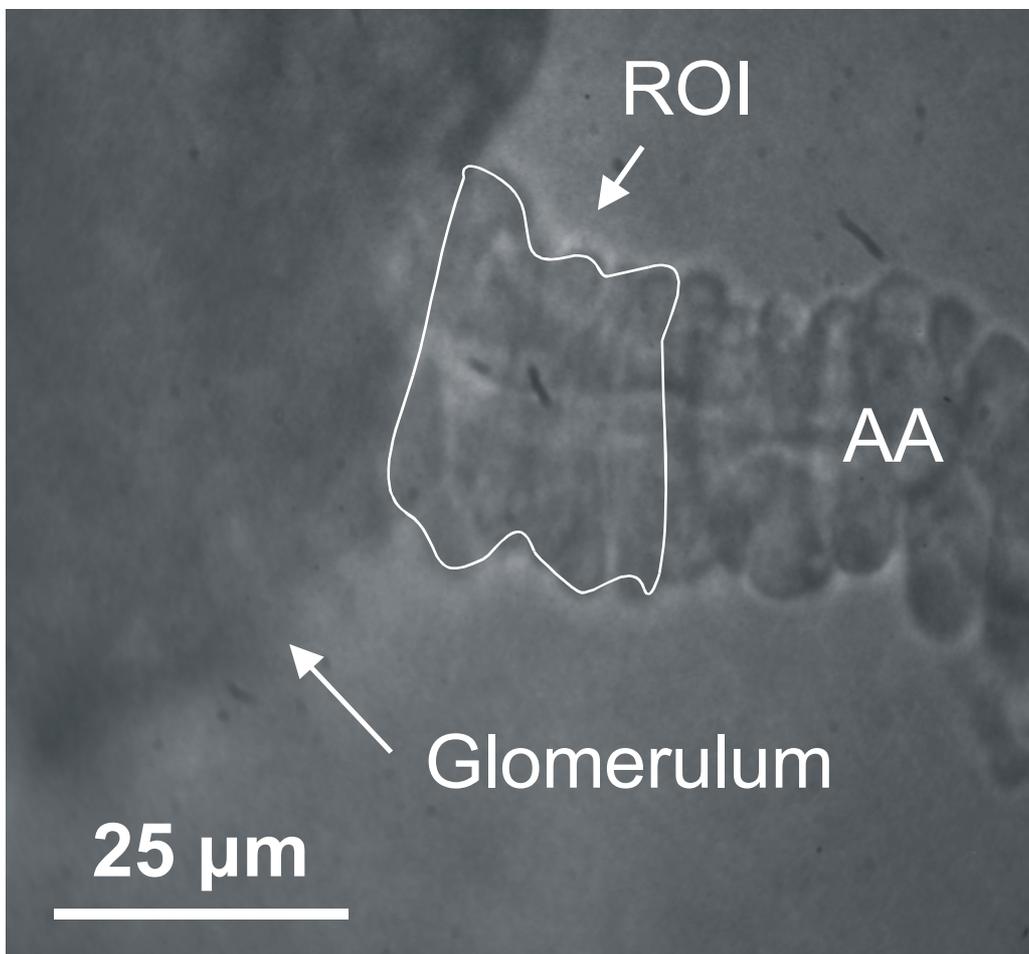


Abb. 9 Hellfeldbild eines isolierten Glomerulums mit anhängender afferenter Arteriole (AA) aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte. Im distalen Abschnitt, hier als ROI (region of interest) gekennzeichnet, sind die reninsezernierenden Zellen lokalisiert. In diesem Bereich, der variabel ausgewählt werden konnte, wurde das Fluoreszenzsignal gemittelt und in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Membranpotential) umgerechnet. Die Aufnahme erfolgte mit einer Restlichtkamera (IC-200, PTI) unter Verwendung eines 100 x Ölimmersionsobjektivs (N.A.: 1.3, CF Fluor Plan, Nikon).

## Material und Methoden

Bilder des gesamten Glomerulums inklusive afferenter Arteriole aufgenommen. Zur Auswertung wurde dann der Bereich der afferenten Arteriole direkt am Eintritt des Glomerulum ausgewählt und als ROI (Region of interest) festgelegt (s. Abb. 9). Nur in diesem Bereich, der 4-8 Zellen umfasste, wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Zu Beginn jedes Experiments wurde ein Hellfeldbild vom Glomerulum aufgenommen, um anschließend die ROI genau festlegen zu können. Dabei wurden zur Reduktion der Lichtintensität drei Graufilter (ND 2A, ND 16A, ND 32, Nikon) in den Strahlengang eingeführt. Für alle Fluoreszenzmessungen wurde eine speziell angefertigte Perfusionskammer aus Edelstahl (s. Abb. 10; Werkstatt des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen) verwendet. In diese wurden Deckgläser ( $\varnothing$  30 mm, Assistent, Sontheim) eingesetzt, die als Kammerboden dienten und zum besseren Haften der Zellen mit 120  $\mu$ l einer mit Aqua bidest.

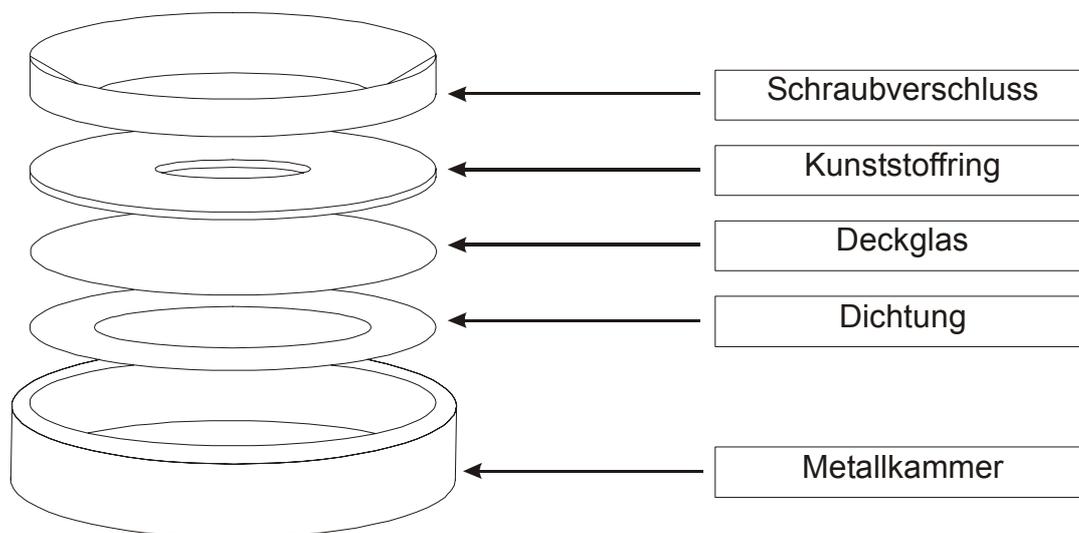


Abb. 10 Aufbau der Perfusionskammer

1:6 verdünnten Poly-D-Lysin-Stammlösung (1 mg/ml) beschichtet waren. Der Zulauf in die Kammer erfolgte über ein Schlauchsystem, das am Ende in eine Injektionsnadel mündete (s. Abb. 11). Die Vorratsgefäße waren über Schläuche mit einem Tropf verbunden, der einen blasenfreien konstanten Zulauf in die Kammer garantierte. Der Zulaufschlauch führte durch eine 50 ml

## Material und Methoden

Perfusorspritze, die mit einem Wasserbad verbunden war. So konnten die Lösungen auf 37 °C vorgewärmt werden. Als Vorratsbehälter dienten 50 ml Perfusorspritzen, die über elektromagnetisch betriebene Ventile geöffnet und geschlossen werden konnten. Die Perfusorspritzen waren über Klemmen an einer Metallplatte befestigt und befanden sich 20 cm oberhalb der Perfusionskammer, sodass die Gravitation als treibende Kraft für den Lösungsfluss diente. Die Absaugung aus der Perfusionskammer bestand aus einer Injektionsnadel, die über einen dünnen Schlauch in ein Auffanggefäß mündete. Dieses war mit einer Membranluftpumpe verbunden, über die ein Unterdruck erzeugt wurde, der ein gleichmäßiges Absaugen der Badlösung garantierte.

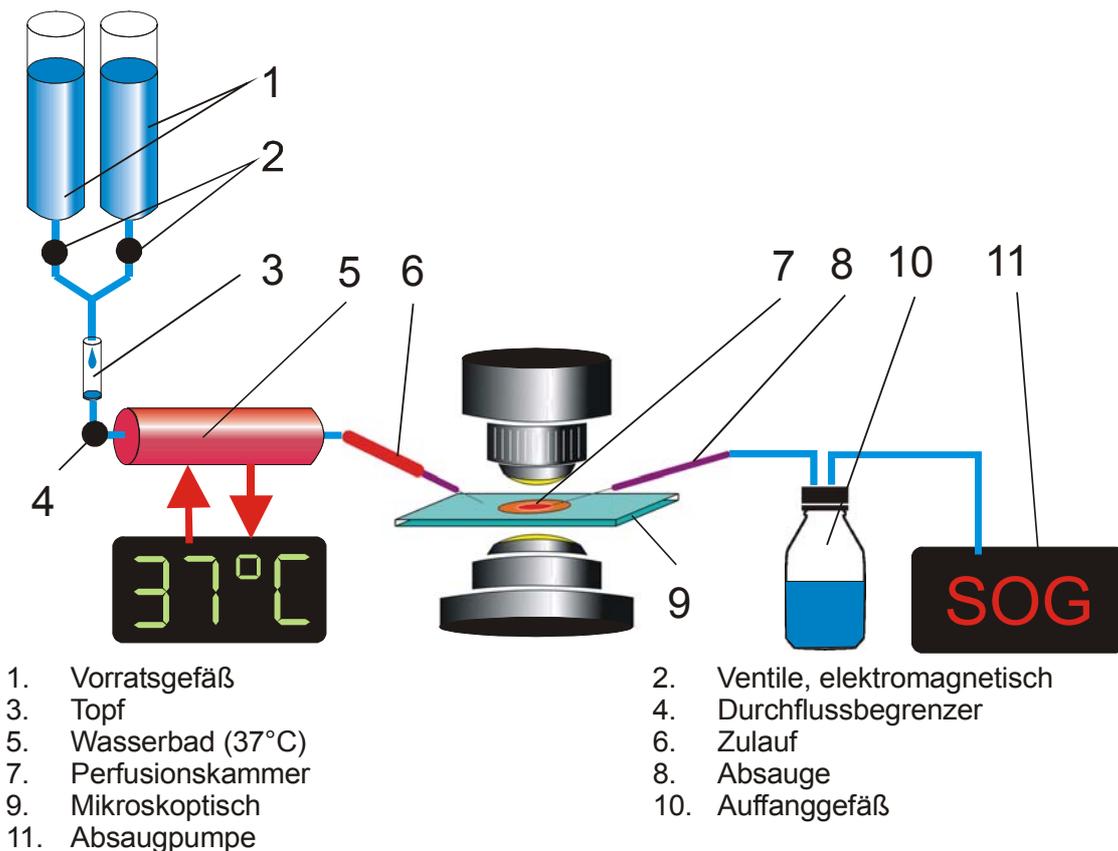


Abb. 11 Darstellung des Lösungsflusses

---

### **2.2.2.2      *Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration***

#### 2.2.2.2.1      Färbung der afferenten Arteriole und Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration

Das Mikroskop wurde für die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einem dichroischen Spiegel (430DCLPO2, Omega, VT, U.S.A.) und einem Interferenzsperrfilter (510WB40, Omega Optical) ausgestattet. Die Anregungswellenlänge betrug  $340 \pm 5$  nm und  $380 \pm 5$  nm; die Intensität des emittierten Lichtes wurde im Bereich von 490-530 nm gemessen. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mit Hilfe des  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), MoBiTec; s. Abb. 12) gemessen. Fura-2 ist ein  $Ca^{2+}$ -Chelator, der  $Ca^{2+}$  mit vier Carboxylgruppen komplexiert. Die Substanz ist sehr selektiv für  $Ca^{2+}$  gegenüber Magnesium und nahezu unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die  $Ca^{2+}$ -Affinität ist sehr günstig für physiologische Messungen, da die Dissoziationskonstante etwa bei  $0,14 \mu\text{M}$  liegt, also im Bereich der zellulären  $Ca^{2+}$ -Signale ( $0,1 \mu\text{M}$ ). Fura-2 wird als Azetoxymethylester (Fura-2-AM) in ungeladener, lipophiler und somit membrangängiger Form in die Zelle durch Diffusion eingebracht. Im Cytosol kommt es zur Anreicherung des Farbstoffs. Da der Azetoxymethylesterrest durch endogene, unspezifische Esterasen abgespalten wird kann nun Fura-2 in geladener Form nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren. Die Färbung der Glomerula-Suspension erfolgte mit  $16 \mu\text{M}$  Fura-2-AM + 0,04 % des Detergens Pluronic F-127 in der jeweiligen HEPES-PS für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Ende der Farbstoffbeladung wurde der Überstand der Färbelösung entfernt. Die Glomerula wurden vor der Messung noch 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Na-HEPES-PS gewaschen. Bei der Messung von  $[Ca^{2+}]_i$  mit Fura-2 macht man sich zunutze, dass die Bindung von  $Ca^{2+}$  das Anregungsspektrum des Farbstoffs zu kürzeren Wellenlängen verschiebt. In  $Ca^{2+}$ -freier Lösung (freier Farbstoff) liegt das Absorptionsmaximum bei 365 nm,

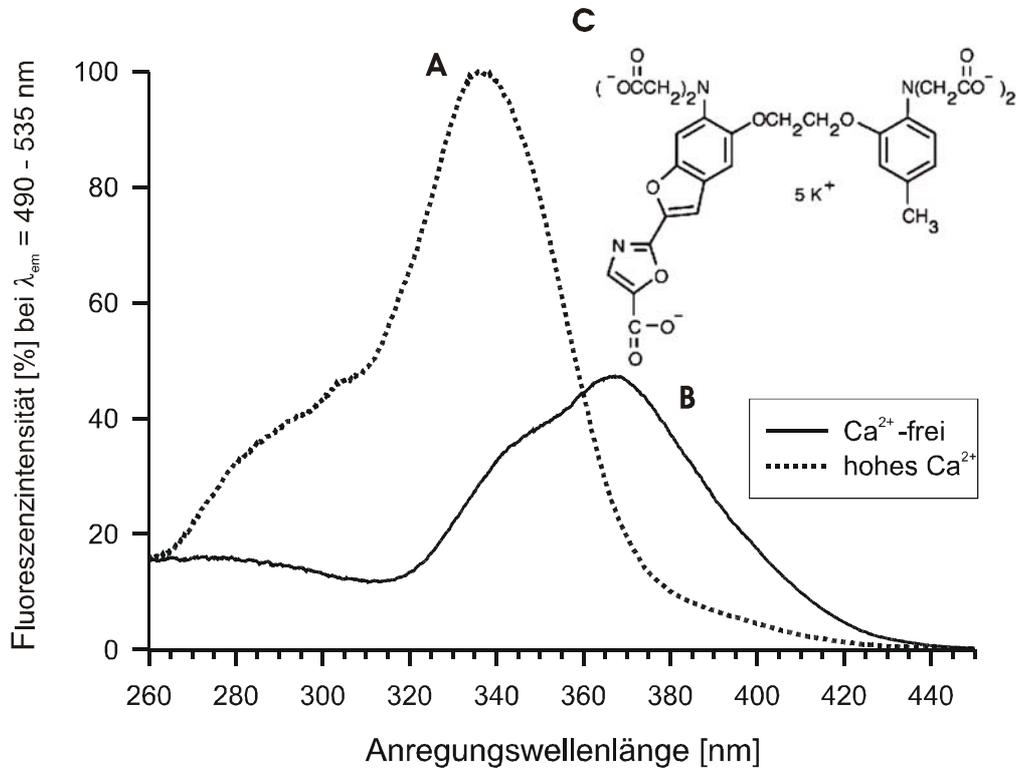


Abb. 12 Dargestellt ist das Anregungsspektrum von Fura-2 in Ca<sup>2+</sup>-gesättigter (A) und Ca<sup>2+</sup>-freier (B) Lösung bei pH 7,2, sowie die Strukturformel von Fura-2 (C). Bei Bindung von Ca<sup>2+</sup> wird das Anregungsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen verschoben (vgl. Text).

Anregungsspektren gemessen bei:  $\lambda_{em} = 490 - 535 \text{ nm}$

bei hoher Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Ca<sup>2+</sup>-Fura-2-Komplex) verschiebt sich das Maximum auf 340 nm; der isosbestische Punkt liegt bei 360 nm; hier ist die Fluoreszenz unabhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (s. Abb. 12). Angeregt wurde bei 340 nm und 380 nm; bei 340 nm fluoreszieren beide Spezies (wobei der Ca<sup>2+</sup>-Fura-2-Komplex mehr beiträgt), bei 380 nm sieht man überwiegend den freien Farbstoff (s. Abb. 12). Die sehr geringe Fluoreszenz des Ca<sup>2+</sup>-Fura-2-Komplexes bei 380 nm wird in diesen Kurven (Quelle: Molecular Probes, www.probes.com) nicht so deutlich wie in anderen Darstellungen (vgl. z.B. Grynkiewicz et al. (1985)), aber auch die in unserer Apparatur ermittelten hohen R<sub>max</sub>-Werte (s.u.) bestätigen die Charakteristik. Weiterhin wird die

## Material und Methoden

---

Fluoreszenzintensität durch die Zelldicke ( $d$ ), die Konzentration des Farbstoffs ( $c$ ) und die Konstante ( $K$ ) bestimmt, die die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst, wobei jedoch  $d$ ,  $c$  und  $K$  unbekannt sind. Wird aber in kurzer Zeitfolge die Intensität bei 340 nm und bei 380 nm gemessen, so kann man davon ausgehen, dass sich die unbekannt Parameter nicht unterscheiden. Aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden Anregungswellenlängen  $F_{340}$  und  $F_{380}$  kann anschließend der Quotient (Ratio  $R$ ) gebildet werden („Ratio“ Methode), der über die Gleichung nach Grynkiewicz et al. (1985) mit der  $Ca^{2+}$ -Konzentration verknüpft ist:

$$[Ca^{2+}] = \frac{K_D \times (R - R_{min})}{(R_{max} - R) \times \left( \frac{SF2}{SB2} \right)}$$

$K_D$	=	Dissoziationskonstante des Fura-2- $Ca^{2+}$ -Komplexes
$R$	=	$F_{340} / F_{380}$
$R_{max}$	=	$F_{340} / F_{380}$ bei sättigender $Ca^{2+}$ -Konzentration
$R_{min}$	=	$F_{340} / F_{380}$ bei $Ca^{2+}$ -freier Lösung
$\left( \frac{SF2}{SB2} \right)$	=	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm Anregung von $Ca^{2+}$ -freiem / $Ca^{2+}$ -gebundenem Farbstoff

### 2.2.2.2.2 Zellfreie Kalibrierung des Systems

Wie Carmines et al. (1993) durch Messungen an der Arteriole der Kaninchenniere und Rauch (2000, DA) durch Messungen an reninsezernierenden Zellen der Ratte beschrieben hatten, ist eine intrazelluläre Kalibrierung des Fura-2-Signals in glatten Muskelzellen mit Problemen behaftet, weshalb eine zellfreie Kalibrierung nach der von Grynkiewicz et al. (1985) beschriebenen Methode durchgeführt wurde.

Der  $K_D$ -Wert von Fura-2 wurde von Rauch (2000) mit unserer Apparatur ermittelt. Der so ermittelte  $K_D$ -Wert von 192 nM, ein Wert, der nahe am meist

## Material und Methoden

---

verwendeten Wert von 224 nM (Grynkiewicz et al. (1985)) liegt, wurde allen Berechnungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zugrunde gelegt.

Bestimmung von  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und  $\left(\frac{SF2}{SB2}\right)$  im Oktober 2003

Objektiv 100x

$R_{min}$ :	0,52
$R_{max}$ :	15,41
$\left(\frac{SF2}{SB2}\right)$ :	10,32

Diese Werte galten für alle Experimente.

### 2.2.2.2.3 Auswertung der $Ca^{2+}$ -Antworten - Bestimmung der Peakgröße und Fläche

Bei den meisten Experimenten wurde mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet, bei dem zuerst mit einer Standardsubstanz stimuliert wurde. Nach einer Auswaschphase wurde entweder mit oder unter der zu untersuchenden Substanz bzw. Substanzgemisch stimuliert (s. Abb. 13). Seltener wurde mit einem Einzelstimulationsprotokoll gearbeitet. Die Stimulationszeiträume wurden bei den kurzen Stimulationen auf eine Minute, bei den langen Stimulationen auf fünf Minuten festgelegt.

Der Wert der  $[Ca^{2+}]_i$  vor den Stimulationen wurde in den Tabellen als Basalwert (basal) bezeichnet. War vor den Stimulationen der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  ansteigend oder abfallend wurde eine Extrapolierung einberechnet. Stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  während der Stimulation über den basalen Wert hinaus, so wurde dies in den Tabellen als Peak bezeichnet. Bei langen Stimulationen, die sich über einen Zeitraum von fünf Minuten erstreckten, wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  am Ende der Stimulation nochmals gemessen und als  $[Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim bezeichnet. Bei diesen Protokollen wurde zusätzlich die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Dies geschah durch eine eigens verfasste Computerberechnung. Die

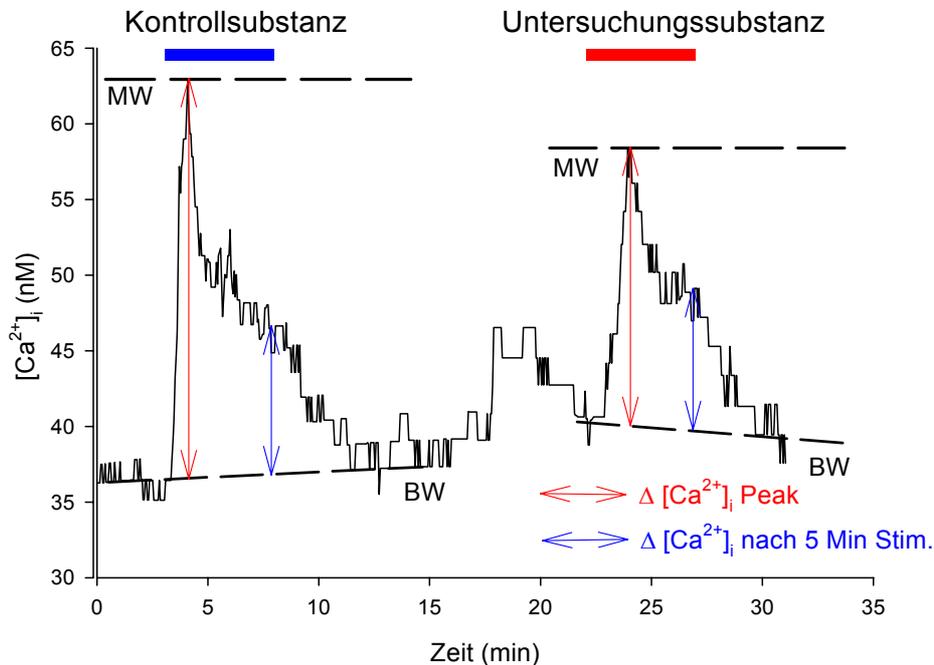


Abb. 13 Darstellung der Datenauswertung: Zunächst wurde für jeden Peak (= Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ ) eine individuelle Basislinie (BW) gezogen, bei exakt horizontalen Basiswertverläufen wurde ein Basiswert festgelegt. Anschließend wurde der Maximalwert (MW) der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in nM bestimmt. Bildet man die Differenz der beiden Messwerte (Maximalwert – Basiswert), so erhält man die Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$  in nM, die als  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak bezeichnet wurden. Mit Hilfe einer Computerberechnung (vgl. Text) wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt, also der Bereich zwischen den individuellen Basislinien bzw. des Basiswertes und der Kurve. Als  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. wurde der Wert der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Beenden der Stimulation bezeichnet.

Messapparatur benötigte für die Aufnahme zweier Bilder (340 nm und 380 nm) sowie den Pausen zwischen diesen Aufnahmen 4,67 Sekunden. Diese Zeitspanne wurde als Timebase für die Berechnungen verwendet. Man hatte dadurch ca. alle fünf Sekunden einen Messwert, den man mit der oben genannten Timebase multiplizierte um die AUC zu errechnen.

Bei den Doppelstimulationsprotokollen wurde jeweils die zweite Stimulation (Peak<sub>2</sub>), die in den Kontrollexperimenten mit der Standardsubstanz und in den Untersuchungsexperimenten mit bzw. unter der zu untersuchenden Substanz durchgeführt wurde, mit der ersten Stimulation (Peak<sub>1</sub>) verglichen und in den Tabellen prozentual dargestellt (in den Tabellen als % Standardpeak

bezeichnet), wobei die Werte des Peak<sub>1</sub> 100 % darstellten. Von allen Werten der Einzelergebnisse einer Experimentreihe wurden anschließend die Mittelwerte und der S.E.M. (standard error of the mean) berechnet und in einer Tabelle zusammengefasst.

### **2.2.2.3 Messung des Membranpotentials**

Das Membranpotential der reninsezernierenden Zellen wurde mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol, MoBiTec, Göttingen) in der oben beschriebenen Apparatur gemessen, die dazu mit dem dichroischen Spiegel DM 505 (Nikon) und dem Langpassfilter BA 520 (Nikon) ausgerüstet wurde. Die Anregungswellenlänge betrug hier  $488 \pm 4$  nm, das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von  $> 520$  nm gemessen.

Die Färbung der Glomerula-Suspension erfolgte mit  $1 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) in Na-HEPES-PS für 80 Minuten. Jeder zur Messung verwendeten Lösung wurde  $1 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) in Na-HEPES-PS zugesetzt, sodass während der Messung die Glomerula-Suspension kontinuierlich mit DiBAC<sub>4</sub>(3) umspült wurde. Dadurch wurde eine konstante Konzentration des Farbstoffs erreicht. Die Experimente wurden bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer Fließgeschwindigkeit von  $1 \text{ ml/min}$  durchgeführt. Wie Fura-2 gelangt auch DiBAC<sub>4</sub>(3) durch Diffusion in die Zelle (Waggoner (1976)). Der Farbstoff enthält negative Ladungen. In der Zelle bindet es an hydrophobe Bestandteile von Proteinen und Membranen, wobei die Fluoreszenzintensität ansteigt (Bräuner et al. (1984); Epps et al. (1994)). Der Depolarisationszustand der Zelle bestimmt den Umfang des Eindringens von DiBAC<sub>4</sub>(3) über die Plasmamembran in die Zelle; je positiver das Membranpotential ist, desto leichter kann der Farbstoff in die Zelle eindringen. Demzufolge bewirkt eine Depolarisation einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, Hyperpolarisation jedoch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, da der Farbstoff von der Zelle abgestoßen wird. Da freiliegender Farbstoff keine Fluoreszenz zeigt, hängt die Fluoreszenzintensität

direkt von der Menge an intrazellulär gebundenem Farbstoff ab. Da die Menge potentialabhängig ist, kann die Fluoreszenzintensität daher als Maß für das Membranpotential verwendet werden (Bräuner et al. (1984); Epps et al. (1994)).

### **2.2.2.4 Fluoreszenzintensitätsmessung mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer**

Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer 650-10S der Firma Perkin-Elmer (Überlingen, Deutschland) durchgeführt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in Einmalküvetten halbmicro PS (Roland Vetter Laborbedarf, Ammerbuch, Deutschland) pipettiert und in den Spectrophotometer gegeben. Die gewünschten Anregungswellenlängen wurden am Spectrophotometer eingestellt. Das Ergebnis der Emission wurde an ein Voltmeter ausgegeben und abgelesen.

### **2.2.3 Statistik**

Zur Datenauswertung wurde der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. angegeben. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zweier Stichproben erfolgte bei normalverteilten Daten mit dem Student's t-Test, bei nicht-normalverteilten Daten wurde der nicht-parametrische U-Test von Mann-Whitney herangezogen. Die Untersuchung auf Signifikanz bei Anwohnhäufigkeiten erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Die Berechnungen wurden mit Sigma Plot 2000 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL, U.S.A.) und Sigma-Stat (Statistical Product & Solutions Inc) durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

In allen Versuchen wurde mit Gefäßen aus Tieren gearbeitet, die nach einer einmaligen Applikation des Schleifendiuretikums Furosemid für mindestens 14 Tage eine Kochsalzarme Diät erhalten hatten. Grund hierfür ist, dass Kochsalzrestriktion das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) stimuliert und eine vermehrte Rekrutierung glatter Muskelzellen in reninsezernierende Zellen bewirkt. Der reninpositive Bereich wird zum einen weiter nach proximal ausgedehnt, zum anderen wird die Anzahl der reninpositiven Arteriolen erhöht. Da in den Experimenten  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen gemessen werden sollte, ist eine Erhöhung der Anzahl reninsezernierender Zellen von großem Vorteil. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde im distalen Anteil der afferenten Arteriole gemessen, genau am Eintritt der Arteriole in das Glomerulum, wo die reninsezernierenden Zellen lokalisiert sind (s. Kap. 2.2.2.1). Soweit nicht anders beschrieben wurde als Grundlösung für die Perfusion der Na-HEPES-Puffer (s. Kap. 2.1.2) verwendet.

#### **3.1 Effekt und Charakterisierung des Einflusses von Angiotensin II auf die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration der reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Rattenniere**

Angiotensin II (ANG II) wirkt vasokonstriktorisch und hemmt über ein negatives Feedback die Sekretion des Botenstoffs Renin aus den reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriolen der Niere. Beide Effekte werden vermutlich durch einen transienten  $Ca^{2+}$ -Anstieg bewirkt, der über den second messenger  $IP_3$  vermittelt wird. Ziel der hier dargestellten Versuche war es, die Antwort der reninsezernierenden Zellen auf ANG II zu charakterisieren. Hierzu wurden die Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume mit ANG II stimuliert. Es wurde über eine Minute (s. Abb. 14) oder fünf Minuten (s. Abb. 15) stimuliert. In den

## Ergebnisse

---

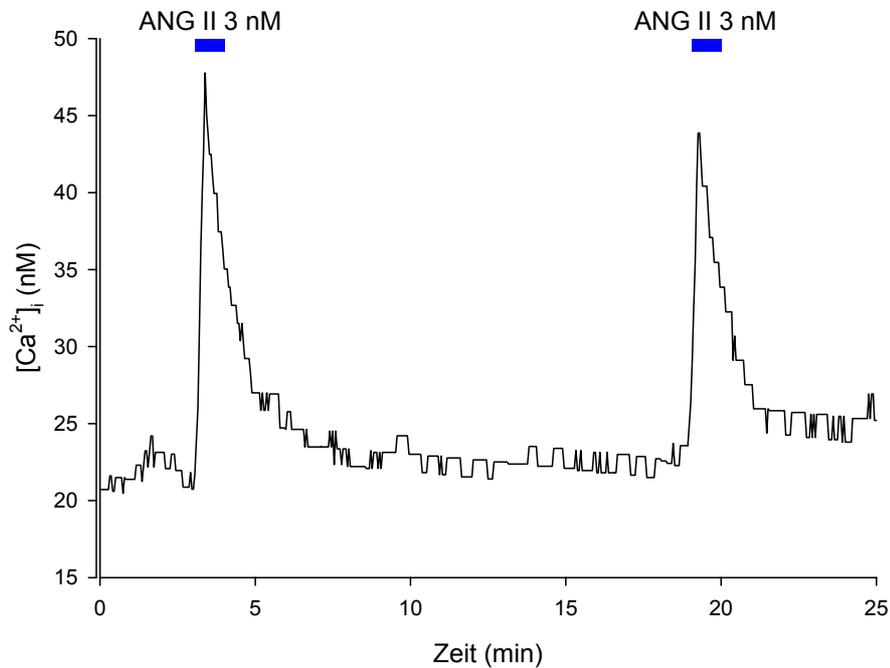


Abb. 14 Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II (3 nM) für jeweils eine Minute. Es wurde ein Doppelstimulationsprotokoll angewendet mit einer Auswaschzeit von 15 Minuten zwischen den Stimulationen. Charakteristisch war der schnelle Anstieg und der schnelle Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ . Der zweite Peak war typischerweise etwas kleiner ( $62 \pm 18 \%$ ,  $n = 4$ ) als der erste Peak.

Experimenten mit einminütigem Stimulationszeitraum konnte ein schneller Anstieg und ein schneller Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  festgestellt werden, was als Peak bzw. Peakphase bezeichnet wurde. Diese Experimente wurden in einem Einzel- oder Doppelstimulationsprotokoll durchgeführt. Es zeigte sich nur eine geringfügige Tachyphylaxie in den Doppelstimulationsprotokollen. In den Experimenten mit 5-Minuten-Stimulationszeitraum wurde, gleich den Experimenten mit 1-Minuten-Stimulationszeitraum, ein schneller Anstieg (Peak) der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet. Der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  unterschied sich in diesen Experimenten von den einminütigen Stimulationsprotokollen, dass sich eine Plateauphase ausbildete, d.h. es bildete sich ein stabiles höheres Niveau der  $[Ca^{2+}]_i$  aus. Diese Plateauphase lag unter dem Niveau des Maximalwertes des

## Ergebnisse

---

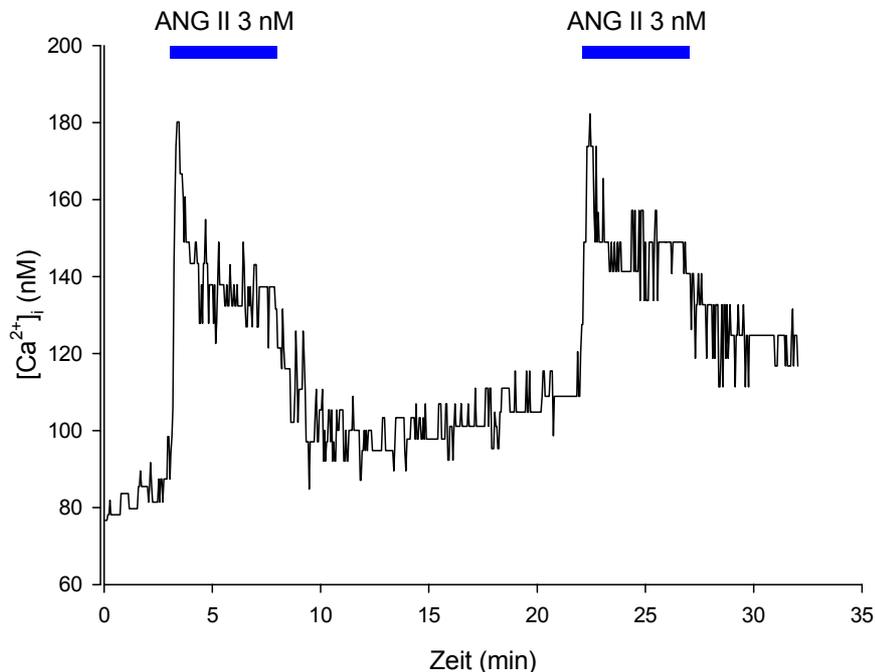


Abb. 15 Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II (3 nM) unter Anwendung des Doppelstimulationsprotokolls mit einem Stimulationszeitraum von fünf Minuten. Deutlich sichtbar war eine Plateauphase nach einem steilen Anstieg (Peak) der  $[Ca^{2+}]_i$ , deren Niveau unter dem maximalen Wert des Peaks lag. Nach der Plateauphase sank die  $[Ca^{2+}]_i$  in einem steilen Abfall wieder auf ein basales Niveau durch Auswaschen des ANG II ab.

Peak. Erst nach der Plateauphase, während des Auswaschens des ANG II, ging die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder in einem steilen Abfall auf ein basales Niveau zurück. Dieser Effekt konnte in der sich anschließenden zweiten Stimulation wiederholt beobachtet werden. Somit konnte der 5-Minuten-Stimulationszeitraum in zwei Phasen unterteilt werden: ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Peakphase) und eine Plateauphase mit anschließendem schnellem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ . Auch hier zeigte sich in den Doppelstimulationsprotokollen nur geringe Tachyphylaxie. Ziel der anschließenden Untersuchungen war es aufzuklären, durch welche physiologischen Mechanismen Peakphase und Plateauphase entstehen.

## **3.2 Pharmakologische Charakterisierung des Peak und der Plateauphase der $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung reninsezierender Zellen durch ANG II**

### **3.2.1 Einfluss des $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Isradipin auf Peak und Plateauphase**

#### **3.2.1.1 *Doppelstimulationsprotokoll***

Ziel dieser Versuche war es, zu untersuchen, ob Isradipin, als Antagonist für L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, einen Einfluss auf die Peakphase und die Plateauphase ausübt. Die hierfür unternommenen Versuche wurden in Doppelstimulationen durchgeführt, wobei in der Versuchsgruppe die zweite Stimulation in Anwesenheit von Isradipin (100 nM) stattfand. ANG II wurde während des fünfminütigen Stimulationszeitraums in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt. Diese niedrige Konzentration war nötig, um die Zellen über den langen Messzeitraum nicht zu stark zu belasten. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Um eine Veränderung der Peakphase durch Isradipin nachzuweisen, wurde der prozentuale Wert für  $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i \text{ Peak}_2$  zwischen der Kontrollgruppe (n = 4) und der Versuchsgruppe (n = 10) im t-Test miteinander verglichen. In der Versuchsgruppe unter Isradipin stieg  $\text{Peak}_2$  auf  $67 \pm 7 \%$  der Höhe des  $\text{Peak}_1$  dieser Gruppe, bei der Kontrollgruppe erreichte  $\text{Peak}_2$   $62 \pm 18 \%$  des  $\text{Peak}_1$ . Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Werten besteht nicht.

Die Charakterisierung der Plateauphase geschah durch die Werte  $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$  nach 5 Min  $\text{Stim}_2$  und durch die Fläche unter der Kurve ( $\text{AUC}_2$ ). Die Versuchsgruppe wurde dabei wieder mit der Kontrollgruppe durch einen t-Test verglichen. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen. Weder die Peakphase noch die Plateauphase ließen sich in den durchgeführten Experimenten durch Isradipin, also durch die Blockade von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, beeinflussen.

	Standardpeak				Testpeak			
	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak <sub>1</sub>	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> nach 5 Min Stim. <sub>1</sub>	AUC <sub>1</sub>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal <sub>2</sub>	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Peak <sub>2</sub>	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> nach 5 Min Stim. <sub>2</sub>	AUC <sub>2</sub>
<b>100 nM Isradipin n=10 (in nM)</b>	34 ± 4	26 ± 4	14 ± 3	75 ± 6	50 ± 6	17 ± 3	8 ± 3	48 ± 3
<b>% Standard peak</b>	100	100	100	100		67 ± 7	57 ± 15	64 ± 8
<b>Kontrollen n=4 (in nM)</b>	17 ± 5	17 ± 3	7 ± 1	46 ± 6	25 ± 5	10 ± 3	5 ± 2	23 ± 6
<b>% Standard peak</b>	100	100	100	100		62 ± 18	85 ± 38	54 ± 17

Tab. 2 Ergebnisse des Doppelstimulationsprotokolls: Stimulation mit ANG II (1 nM) über einen fünfminütigen Zeitraum in der Versuchs- und Kontrollgruppe. Peak<sub>2</sub> entstand in der Versuchsgruppe unter der Einwirkung von Isradipin (100 nM). Weder die Peak- noch die Plateauphase unterschieden sich bei Peak<sub>2</sub> zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant. Isradipin hatte keine Einfluss auf diese Phasen.

### 3.2.1.2 Einzelstimulationsprotokoll

Die Versuche des Einzelstimulationsprotokolls (s. Abb. 16) wurden als Ergänzung zu den Doppelstimulationsprotokollen aufgenommen. Bei den Doppelstimulationen hatten die Zellen in der zweiten Hälfte der Messung, vermutlich durch die sehr lange Messzeit bedingt, häufig nicht mehr adäquat bzw. deutlich genug auf die Stimulation mit ANG II reagiert. Der Stimulationszeitraum betrug bei den Einzelstimulationen ebenfalls fünf Minuten. Durch die kürzere Messzeit und die einzelne Stimulation konnte ANG II in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt werden, um ein deutliches Ca<sup>2+</sup>-Signal zu erhalten. Die Isradipinkonzentration betrug weiterhin 100 nM. Tab. 3 fasst die Ergebnisse aus der Versuchsreihe zusammen.

## Ergebnisse

	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim.	AUC
<b>Isradipin 100 nM n = 6 (in nM)</b>	20 ± 4	18 ± 4	13 ± 5	64 ± 21
<b>Kontrollen n = 4 (in nM)</b>	20 ± 10	38 ± 11	14 ± 6	89 ± 43

Tab. 3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Einzelstimulationsprotokollen der Kontrollen und der Versuche unter Isradipin (100 nM). Die Stimulation erfolgte durch ANG II in einer Konzentration von 10 nM über einen Zeitraum von fünf Minuten.

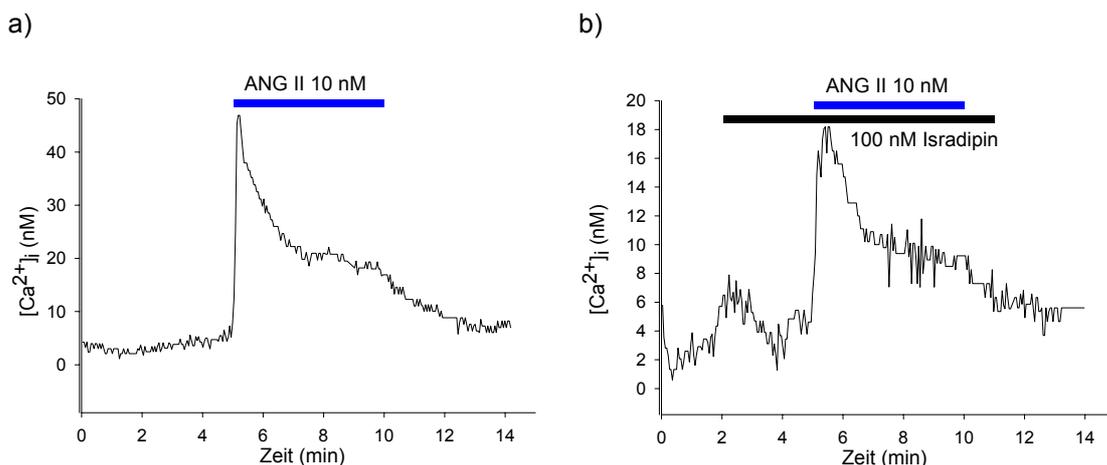


Abb. 16 zeigt die Versuche mit Isradipin (100 nM) und die Kontrollen der Stimulation mit ANG II (10 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten:

a) Kontrollexperiment: Zu sehen ist der Peak, der in die Plateauphase übergeht. Die  $[Ca^{2+}]_i$  fällt nach Absetzen des ANG II wieder auf ihren anfangs basalen Wert zurück.

b) Experiment der Versuchsgruppe: Stimulation mit ANG II (10 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten unter der Gabe von Isradipin (100 nM). Deutlich zu erkennen ist die unter Isradipin weiter bestehende Plateauphase im Anschluss an die Peakphase. Die  $[Ca^{2+}]_i$  fällt auch in diesem Experiment nach Absetzen des ANG II wieder auf den anfangs basalen Wert zurück. Bei der vermeintlichen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  bei Ansetzen des Isradipin handelt es sich um einen Wackelartefakt während der Messung.

Die Charakterisierung des Peak geschah, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, durch  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak. Im t-Test konnte hier zwischen der Versuchsgruppe (n = 6) mit Isradipin und der Kontrollgruppe (n = 4) ohne Isradipin kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## Ergebnisse

---

Zur Charakterisierung der Plateauphase wurden die Werte  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. und AUC verwendet. Auch diese Werte zeigten im Vergleich zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Da auch in dieser Experimentreihe die Peakphase und die Plateauphase nicht durch die Blockade von L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen mit Isradipin beeinflusst werden konnte bestätigen diese Resultate die Ergebnisse aus den Doppelstimulationsprotokollen des vorangegangenen Kapitels.

### **3.2.2 Einfluss von Speicher-aktivierten $Ca^{2+}$ -Kanälen auf den Peak und die Plateauphase der Stimulation durch ANG II**

#### **3.2.2.1 Einfluss der Blockade Speicher-aktivierter $Ca^{2+}$ -Kanäle durch Gadolinium auf den Peak und die Plateauphase**

Speicher-aktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle (SOCC`s) wurden in den reninsezernierenden Zellen der Niere bereits mehrfach nachgewiesen (s. Kap. 1.3.1.1.2.3). Welche Rolle diese Kanäle bei der Peak- und Plateauphase einnehmen war bisher nicht genau bekannt und gab Anlass zu den hier aufgeführten Untersuchungen. Die Experimente wurden als Einzelstimulation durchgeführt (s. Abb. 17). Die Stimulationszeit betrug fünf Minuten. Das Einzelstimulationsprotokoll wurde gewählt um die Messzeit zu verkürzen und um eine hohe ANG II-Konzentration (10 nM) verwenden zu können. Dadurch wurde ein deutliches  $Ca^{2+}$ -Signal erhalten. Die SOCC`s wurden durch Gadolinium in einer Konzentration von 50  $\mu$ M blockiert. Die Resultate der Experimente wurden in Tab. 4 zusammengefasst.

Die Peakphase wurde durch die Werte  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak charakterisiert. Die Kontrollgruppe (n = 7) und die Versuchsgruppe (n = 9), unter dem Einfluss von Gadolinium, wurden hier durch einen t-Test miteinander verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Plateauphase wurde durch die Werte  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. und die AUC charakterisiert.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. betrug in der Versuchsgruppe  $4 \pm 1$  nM und in der Kontrollgruppe  $9 \pm 1$  nM. Diese Werte zeigten im t-Test

## Ergebnisse

einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,019$ ). Die AUC blieb beim Vergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe ohne signifikanten Unterschied. Die oben erläuterten Ergebnisse zeigen, dass durch die Blockade der SOCC's mit Gadolinium die Plateauphase unter ANG II Stimulation signifikant verringert werden konnte.

	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim.	AUC
<b>Gadolinium 50 <math>\mu</math>M n = 9 (in nM)</b>	14 $\pm$ 2	23 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	42 $\pm$ 8
<b>Kontrollen n = 7 (in nM)</b>	17 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3	9 $\pm$ 1	54 $\pm$ 8

Tab. 4 Dargestellt sind die Ergebnisse ANG II Stimulation. In der Versuchsgruppe wurde die Stimulation mit ANG II unter gleichzeitiger Gabe von Gadolinium (50  $\mu$ M) durchgeführt, in der Kontrollgruppe wurde in Abwesenheit von Gadolinium stimuliert. Die Stimulationszeit betrug fünf Minuten.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. war in der Versuchsgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,019$ ).

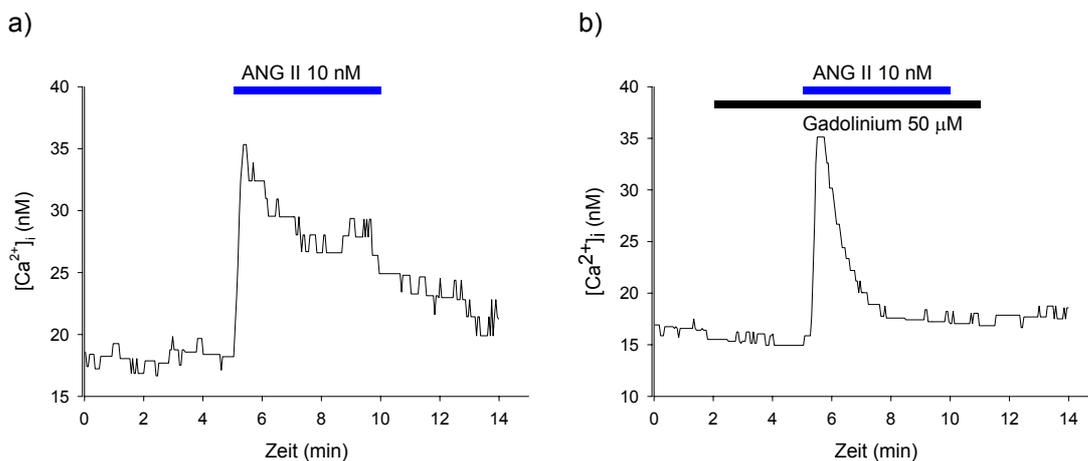


Abb. 17 zeigt den Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Stimulation mit ANG II (10 nM)

a) Kontrollversuch, die Stimulation erfolgte durch ANG II (10 nM). Deutlich erkennbar ist der Peak und die sich anschließende Plateauphase.

b) ANG II-Stimulation (10 nM) unter Blockade der SOCC's mit Gadolinium (50  $\mu$ M). Die Peakphase blieb unverändert, eine Plateauphase war hingegen nicht mehr vorhanden.

## Ergebnisse

### 3.2.2.2 Einfluss der Blockade Speicher-aktivierter $Ca^{2+}$ -Kanäle durch 2-APB auf den Peak und die Plateauphase

Die Versuchsreihe diente als Ergänzung und Bestätigung der Ergebnisse aus Kap. 3.2.2.1. 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylboran) blockiert, wie Gadolinium, die Speicher-aktivierten  $Ca^{2+}$ -Kanäle (SOCC's) (s. Abb. 18). Es wurde wiederum mit einem Einzelstimulationsprotokoll gearbeitet. 2-APB wurde in einer Konzentration von 30  $\mu$ M eingesetzt. Die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigt Tab. 5.

	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim.	AUC
<b>2-APB 30 <math>\mu</math>M n = 7 (in nM)</b>	27 $\pm$ 6	19 $\pm$ 4	-4 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3
<b>Kontrollen n = 5 (in nM)</b>	23 $\pm$ 10	29 $\pm$ 10	7 $\pm$ 2	64 $\pm$ 11

Tab. 5 Ergebnisse aus den Stimulationen mit ANG II 10 nM. Die SOCC's wurden mit 2-APB (30  $\mu$ M) blockiert. Es wurde mit einem Einzelstimulationsprotokoll gearbeitet. In der Versuchsgruppe war  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. signifikant kleiner gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,014$ ). Weiterhin war die AUC der Versuchsgruppe signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe ( $p = 0,001$ ).

Die Versuchs- und die Kontrollgruppe wiesen bei der Peakphase keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Plateauphase wurde durch die Höhe der Werte  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. und AUC charakterisiert.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 min Stim. wurde in der Versuchsgruppe unter 2-APB mit - 4  $\pm$  3 nM errechnet und ist damit signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe (7  $\pm$  2 nM;  $p = 0,014$ ). Die AUC war in der Versuchsgruppe ebenfalls signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,001$ ). Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe bestätigen und unterstützen die Resultate aus Kap. 3.2.2.1. Die Plateauphase wird durch die Blockade der SOCC's signifikant in ihrer Höhe verkleinert bzw. völlig unterdrückt.

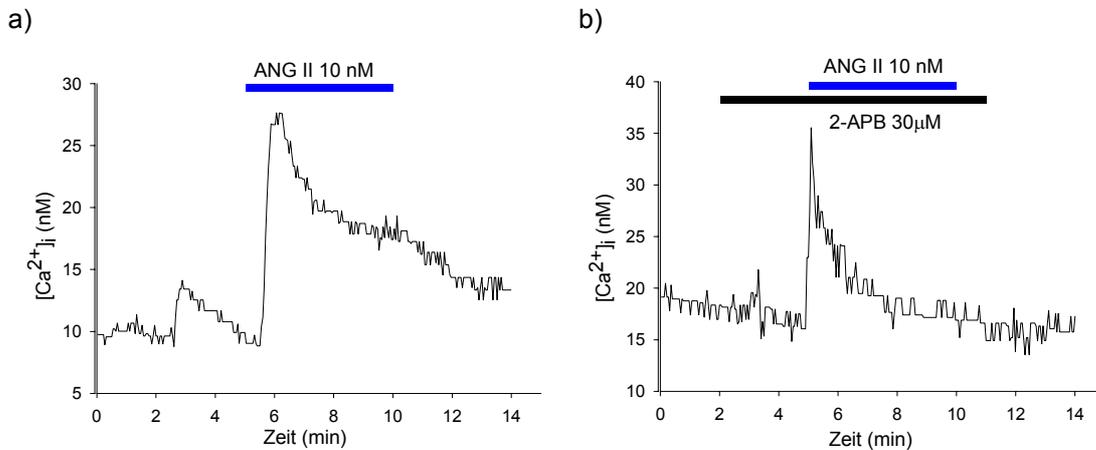


Abb. 18 Einfluss des SOCC's Blocker 2-APB auf die Peak- und die Plateauphase der Stimulation mit ANG II (10 nM):

a) Kontrollexperiment, Stimulation durch ANG II (10 nM). Die Plateauphase im Anschluss an die Peakphase ist deutlich zu erkennen.

b) Blockade der SOCC's mit 2-APB (30  $\mu$ M). Die Plateauphase im Anschluss an die Peakphase unter ANG II Stimulation (10 nM) ist bei Blockade der SOCC's nicht mehr sichtbar.

### 3.2.3 Beeinflussung des Peak und der Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ unter ANG II Stimulation durch Veränderungen des Membranpotentials

#### 3.2.3.1 Beeinflussung des Peak durch Veränderung des Membranpotentials

Die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II führt zur Depolarisation. Dies wurde von Laske-Ernst (2003), Bührle et al. (1984) und Kurtz und Penner (1989) an reninsezernierenden Zellen der Rattenniere bereits demonstriert. Unklar war bislang, ob für die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter der Stimulation dieser Zellen mit ANG II eine Depolarisation nötig ist, oder ob die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig vom Membranpotential stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen bereits vor der Stimulation mit ANG II depolarisiert. Eine weitere Depolarisation war, aufgrund der intra- und extrazellulären Elektrolytverteilung, in diesem Zustand nur minimal bzw. nicht mehr möglich. Wäre die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  im depolarisierten Zustand durch ANG II

## Ergebnisse

weiterhin möglich, so wäre dieses Signal nicht obligat auf eine Veränderung des Membranpotentials angewiesen. ANG II würde dann andere zelluläre Vorgänge zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  verwenden. In den Versuchen wurde die Depolarisation durch hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen erreicht. Um einen Eindruck davon zu bekommen wie die Zellen auf diese Verhältnisse reagieren wurden die ersten Versuche mit einer extrazellulären  $K^+$ -Konzentration von 60 mM durchgeführt (n = 10). Im Anschluss an diese Versuchsreihe wurden die Experimente mit einer extrazellulären  $K^+$ -Konzentration von 142 mM durchgeführt (n = 10). Zur Stimulation wurde ANG II in einer Konzentration von

	Standardpeak		Depolarisation	Testpeak	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Depol.	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>
<b>60 mM <math>K^+</math></b> n = 10 (in nM)	44 ± 10	37 ± 13	23 ± 8	77 ± 23	26 ± 5
<b>% Standardpeak</b>	100	100	79 ± 19	178 ± 16	98 ± 31
<b>142 mM <math>K^+</math></b> n = 10 (in nM)	69 ± 30	67 ± 28	93 ± 39	140 ± 47	117 ± 46
<b>% Standardpeak</b>	100	100	152 ± 35	276 ± 45	222 ± 94
<b>Kontrollen</b> n = 7 (in nM)	18 ± 3	18 ± 3	-	19 ± 4	17 ± 3
<b>% Standardpeak</b>	100	100	-	112 ± 17	113 ± 28

Tab. 6 Darstellung der Ergebnisse der Stimulation mit ANG II (3 nM) unter depolarisierten Verhältnissen. Die Depolarisation der Zellen erfolgte mit einer extrazellulären  $K^+$ -Konzentration von 60 mM 142 mM. Die Zellen reagierten auch unter Depolarisation auf die Stimulation mit ANG II mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

## Ergebnisse

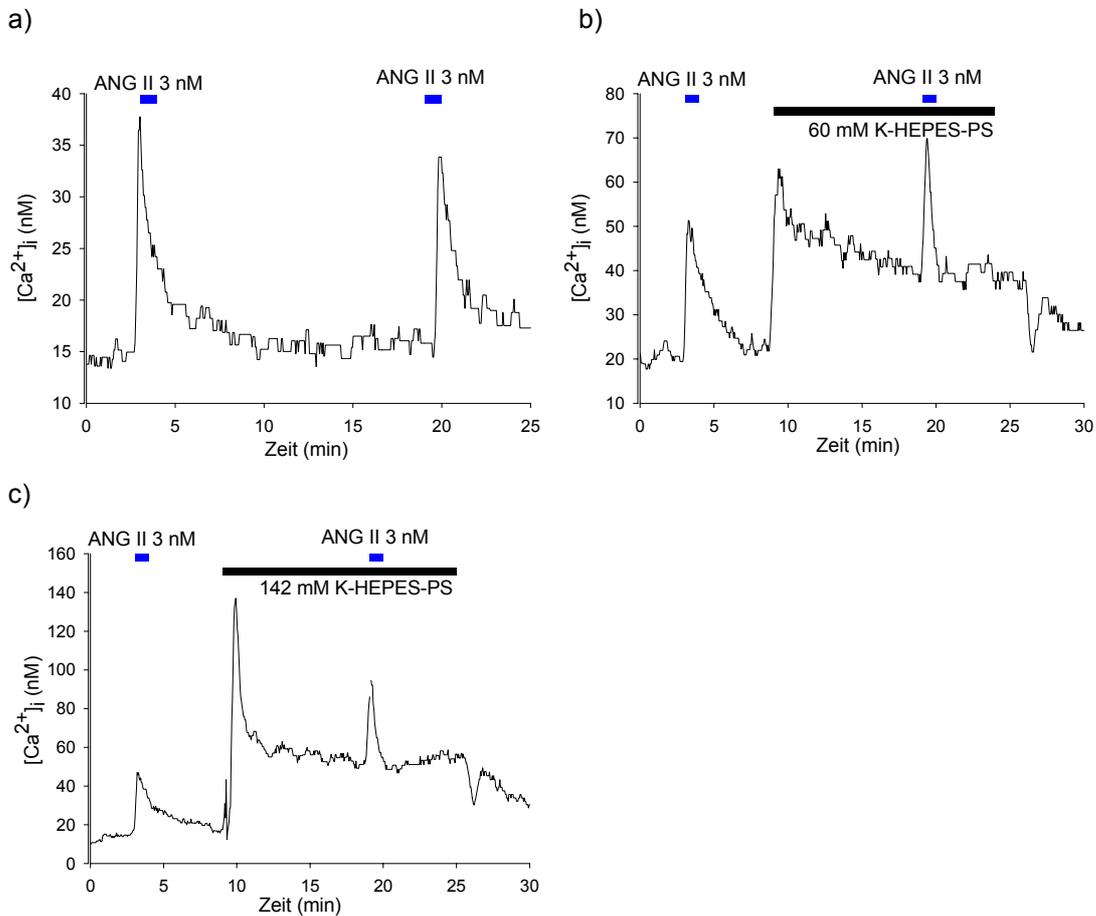


Abb. 19 zeigt die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II (3 nM) in Kontrollexperimenten und unter depolarisierten Zuständen. Es wurde ein Doppelstimulationsprotokoll angewendet.

a) Kontrollexperiment, Doppelstimulation der Zellen mit ANG II (3 nM).

b) Versuch mit der Depolarisation der Zellen durch 60 mM K-HEPES-PS und Stimulation der Zellen mit ANG II unter depolarisierten Verhältnissen. Zu erkennen ist, dass sich Peak<sub>2</sub> von Peak<sub>1</sub> in der Höhe nicht unterscheidet.

c) Versuch mit der Depolarisation der Zellen durch 142 mM K-HEPES-PS und Stimulation der Zellen mit ANG II (3 nM) unter depolarisierten Verhältnissen. In den Experimenten ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Peaks der beiden ANG II Stimulationen errechnen.

3 nM eingesetzt. Es wurde mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst. Peak<sub>1</sub> wurde sowohl in den Versuchsgruppen, als auch in der Kontrollgruppe (n = 7) bei physiologischen Ionenkonzentrationen durchgeführt. Peak<sub>2</sub> wurde dann in den Versuchsgruppen unter depolarisierten Verhältnissen (extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration von 60 mM

## Ergebnisse

---

und 142 mM) gemessen. Die Höhe des Peak<sub>2</sub> wurde durch die prozentualen Werte für  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak<sub>2</sub> charakterisiert. Hier erreichten die Versuchsgruppe mit 60 mM K<sup>+</sup>-Depolarisation  $98 \pm 31$  % des Peak<sub>1</sub> dieser Gruppe, die Versuchsgruppe mit 142 mM K<sup>+</sup>-Depolarisation  $222 \pm 94$  % und die Kontrollgruppe  $113 \pm 28$  %. Der ANOVA-Test zeigte zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 19). Diese Resultate sprechen dafür, dass die durch ANG II verursachte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Rattenniere nicht obligat auf eine Depolarisation angewiesen ist. Des Weiteren werden die intrazellulären Signaltransduktionswege des ANG II durch die Depolarisation nicht merklich beeinflusst. Die durchgeführten Versuche ließen jedoch nur eine Aussage über die Peakphase zu, Untersuchungen zur Plateauphase folgten (s. Kap. 3.2.3.2).

### **3.2.3.2 *Beeinflussung der Plateauphase durch Veränderung des Membranpotentials***

In Kap. 3.2.3.1 konnte gezeigt werden, dass die Peakphase der ANG II Stimulation durch eine Depolarisation unbeeinflusst blieb. Ein Einfluss auf die Plateauphase konnte mit dem dabei verwendeten Doppelstimulationsprotokoll nicht quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Versuchsreihe ein Doppelstimulationsprotokoll mit einem Stimulationszeitraum von fünf Minuten angewendet. Zwei Versuchsreihen wurden durchgeführt wobei lediglich die Konzentration des ANG II variiert wurde (3 nM und 1 nM). Bedingt durch den langen Messzeitraum wurde in der ersten Versuchsreihe (s. Abb. 20) die ANG II-Konzentration gering gewählt (1 nM). Um auszuschließen, dass die ANG II-Konzentration für das Auslösen einer Plateauphase zu gering gewählt wurde, entstand eine zweite Versuchsreihe (s. Abb. 21) mit einer ANG II Konzentration von 3 nM. Die Resultate der ersten Versuchsreihe wurde in Tab. 7, die der zweiten Versuchsreihe in Tab. 8 zusammengefasst.

## Ergebnisse

	Standardpeak				Depol.	Testpeak			
	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim. <sub>1</sub>	AUC <sub>1</sub>		$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Depol	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim. <sub>2</sub>
<b>142 mM K<sup>+</sup></b> <b>n = 5</b> <b>(in nM)</b>	19 ± 5	25 ± 6	13 ± 5	97 ± 30	18 ± 3	32 ± 5	15 ± 4	1 ± 1	30 ± 7
<b>% Standardpeak</b>	100	100	100	100	98 ± 33	191 ± 24	67 ± 13	15 ± 7	44 ± 16
<b>Kontrollen</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	26 ± 8	25 ± 3	10 ± 1	82 ± 6	-	31 ± 8	15 ± 2	7 ± 3	54 ± 15
<b>% Standardpeak</b>	100	100	100	100	-	123 ± 5	65 ± 11	70 ± 25	63 ± 16

Tab. 7 Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Doppelstimulationen mit ANG II (1 nM). Die Versuchsgruppe wurde vor der zweiten Stimulation mit 142 mM K<sup>+</sup> depolarisiert.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> stellte sich in der Versuchsgruppe signifikant kleiner dar als in der Kontrollgruppe (p = 0,001).

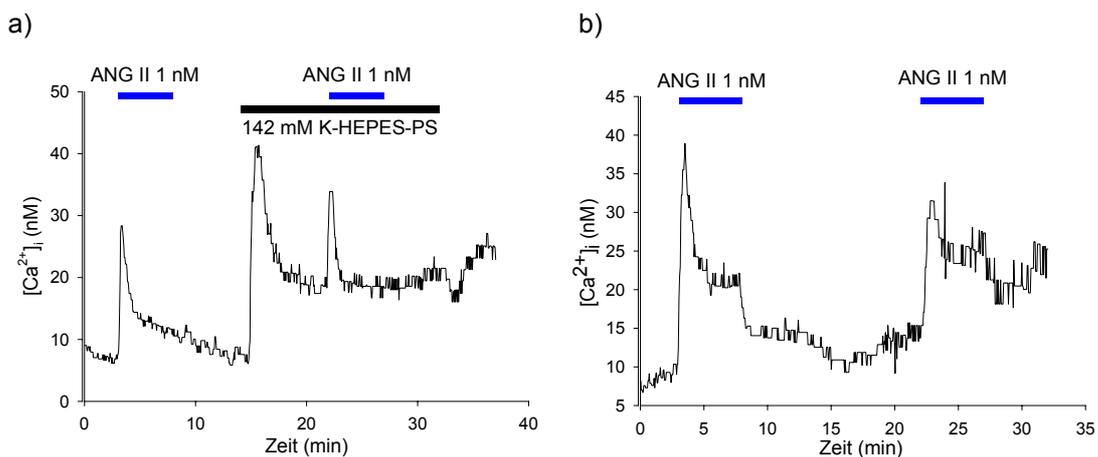


Abb. 20 Stimulation der reninsezernierenden Zellen durch ANG II (1 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten.

a) In der Versuchsgruppe wurde die zweite Stimulation der Zellen unter Depolarisation (142 mM K<sup>+</sup> extrazellulär) durchgeführt. Eine Plateauphase war während der zweiten Stimulation nicht zu erkennen.

b) In der Kontrollgruppe ist bei beiden aufeinander folgenden Stimulationen eine Plateauphase vorhanden.

## Ergebnisse

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus Kap. 3.2.3.1 wurde nochmals der Einfluss der Depolarisation auf die Peakphase bei den Stimulationen mit 1 nM ANG II überprüft. Hierfür wurden die Werte von  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak<sub>2</sub> der Versuchs- und Kontrollgruppe einem t-Test unterzogen. Ein signifikanter Unterschied stellte sich hierbei nicht heraus, womit die Ergebnisse aus Kap. 3.2.3.1 bestätigt wurden.

Die Plateauphase wurde durch die Werte der  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> und die AUC<sub>2</sub> charakterisiert.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> wurde einem t-Test unterzogen und damit Versuchs- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,001$ ). Bezüglich der AUC<sub>2</sub> konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (s. Tab. 7).

	Standardpeak				Depol.	Testpeak			
	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim. <sub>1</sub>	AUC <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Depol	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim. <sub>2</sub>	AUC <sub>2</sub>
<b>142 mM K<sup>+</sup> n = 9 (in nM)</b>	40 ± 6	39 ± 6	17 ± 3	125 ± 28	32 ± 6	73 ± 11	25 ± 4	5 ± 2	49 ± 11
<b>% Standardpeak</b>	100	100	100	100	87 ± 10	192 ± 19	87 ± 20	22 ± 5	44 ± 6
<b>Kontrollen n = 6 (in nM)</b>	53 ± 13	50 ± 16	13 ± 3	141 ± 51	-	66 ± 15	26 ± 10	9 ± 3	75 ± 32
<b>% Standardpeak</b>	100	100	100	100	-	127 ± 6	53 ± 6	65 ± 13	62 ± 18

Tab. 8 Ergebnisse des Doppelstimulationsprotokolls unter Stimulation mit ANG II (3 nM) für jeweils fünf Minuten.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> war in der Versuchsgruppe signifikant kleiner als  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> der Kontrollgruppe ( $p = 0,003$ ). Die AUC<sub>2</sub> unterschied sich zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe nicht.

## Ergebnisse

Auch in der zweiten Versuchsgruppe (ANG II 3 nM) wurde, analog zur ersten Versuchsgruppe, die Peakphase unter Depolarisation untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe festgestellt werden.

Die Plateauphase konnte, wie in der ersten Versuchsgruppe (ANG II 1 nM), durch die Depolarisation unterdrückt werden.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.<sub>2</sub> war in der Versuchsgruppe unter Depolarisation mit 142 mM K<sup>+</sup> signifikant kleiner ( $p = 0,003$ ). Die AUC<sub>2</sub> unterschied sich zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe nicht (s. Tab. 8).

Durch diese Resultate konnten die Ergebnisse der Experimente aus Kap. 3.2.3.1 bestätigt werden. Es konnte mit ANG II immer ein Peak unter Depolarisation ausgelöst werden. Eine Plateauphase unter Depolarisation war nie zu erkennen. Es wäre möglich, dass die Plateauphase in diesen Experimenten schlecht zu beurteilen war, da eine hohe Ca<sup>2+</sup>-Beladung der Zellen durch die vorherrschende Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VOCC`s) bestand.

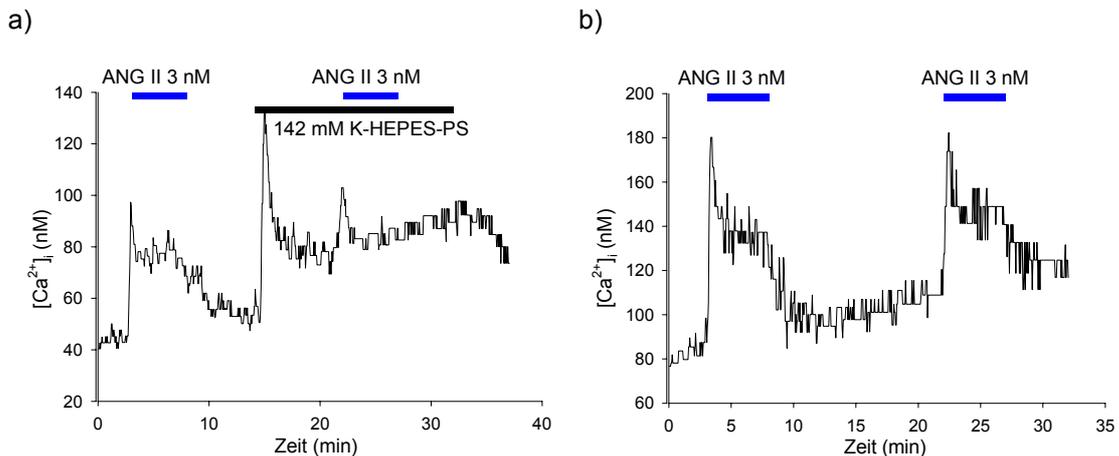


Abb. 21 Doppelstimulationsprotokoll der Stimulationen mit ANG II (3 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten.

a) Versuchsgruppe: Die zweite Stimulation wurde unter Depolarisation mit einer extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration von 142 mM durchgeführt. Eine Plateauphase ist bei der zweiten Stimulation nicht sichtbar.

b) Kontrollgruppe: Bei beiden aufeinander folgenden Stimulationen mit ANG II ist eine Plateauphase deutlich sichtbar.

---

### **3.2.3.3      *Beeinflussung der Peak- und Plateauphase der Stimulation mit ANG II durch CPA unter Depolarisation***

Während der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II kommt es zu einer Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern. Ein bislang ungeklärtes Signal verursacht die Öffnung von SOCC's und bewirkt damit einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Zellmembran (s. Kap. 1.3.2.1). Sinn dieses Einstromes könnte die Auffüllung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher sein (McFadzean und Gibson (2002), Schweda et al. (2000)). In den Experimenten des vorhergehenden Kapitels konnte unter Depolarisation bei der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II keine Plateauphase mehr beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine Überladung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über VOCC's. Unter diesen Umständen wäre ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch SOCC's zur Wiederauffüllung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speiche ohne Sinn. Um eine Überladung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu verhindern, und damit wieder eine Öffnung der SOCC's unter ANG II Stimulation zu provozieren, wurde in den hier durchgeführten Versuchen die endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) durch CPA (10  $\mu\text{M}$ ) blockiert. Unter CPA-Perfusion und damit mit entleerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern, könnte eine Plateauphase möglicherweise wieder erkennbar sein.

Die Experimente wurden als Einzelstimulationen durchgeführt. ANG II wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Grund für diese hohe Konzentration war der späte Applikationszeitpunkt. Des Weiteren sollte eine eindeutige Reaktion der Zellen erreicht werden. Die Depolarisation der Zellen geschah wieder durch eine extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration von 142 mM. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst.

In den durchgeführten Experimenten konnte durch die Gabe von CPA (10  $\mu\text{M}$ ) ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $19 \pm 3$  nM erreicht werden. Dieser Wert lag im Bereich der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die durch die Stimulation mit ANG II (10 nM) verursacht wurde. Auch unter der Blockade der SERCA (n = 4) reagierten die Zellen mit einer gegenüber der Kontrollgruppe (n = 4) unveränderten

## Ergebnisse

Peakphase. Die Werte  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak unterschieden sich zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe nicht signifikant. Weshalb selbst nach Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher durch CPA eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II möglich ist,

	Depolarisation		CPA (10 $\mu$ M)		ANG II (10 nM)			AUC
	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Depol.	$[Ca^{2+}]_i$ basal CPA	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ CPA	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ nach 5 Min Stim.	
<b>CPA 10 <math>\mu</math>M</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	41 $\pm$ 15	49 $\pm$ 17	39 $\pm$ 10	19 $\pm$ 3	46 $\pm$ 12	21 $\pm$ 3	0 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2
<b>Kontrollen</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	20 $\pm$ 2	40 $\pm$ 7	-	-	26 $\pm$ 3	27 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	52 $\pm$ 4

Tab. 9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Stimulation mit ANG II (10 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten unter Depolarisation. In der Versuchsgruppe erfolgte die Stimulation unter der Gabe des SERCA-Inhibitors CPA (10  $\mu$ M).  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. ist in der Versuchsgruppe nach Blockade der SERCA signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,037$ ), ebenso die AUC ( $p < 0,001$ ).

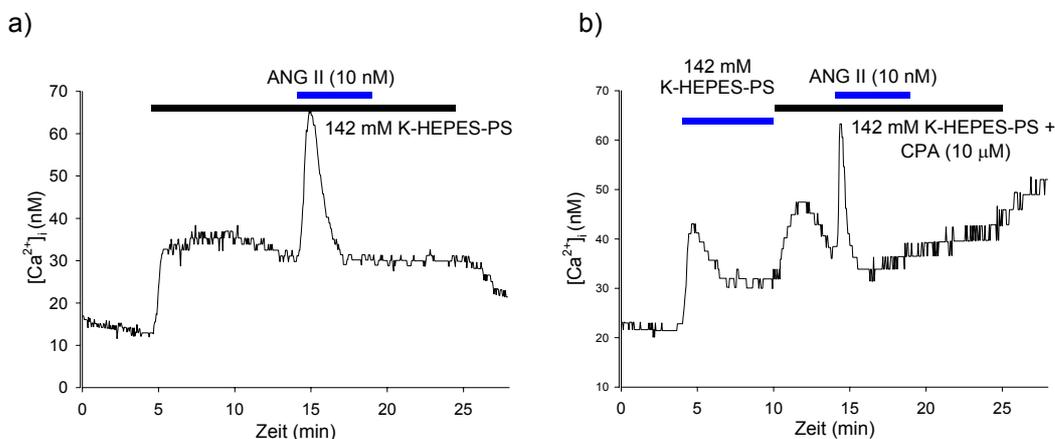


Abb. 22 Einzelstimulationsprotokoll der Versuche mit CPA (10  $\mu$ M) und Kontrollen.

a) Kontrollexperiment der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II (10 nM) über einen Zeitraum von fünf Minuten unter Depolarisation mit 142 mM K-HEPES-PS. Wie in Kap. 3.2.3.2 bereits beschrieben, blieb eine Plateauphase nach der Peakphase aus.

b) Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II (10 nM) unter Depolarisation mit 142 mM K-HEPES-PS bei gleichzeitiger Hemmung der SERCA durch CPA (10  $\mu$ M). Deutlich zu erkennen ist die durch SERCA-Hemmung ausgelöste intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Erhöhung. Auch in diesen Experimenten blieb die Plateauphase nach der Peakphase aus.

## Ergebnisse

wäre beispielsweise durch eine unvollständige Speicherentleerung unter CPA zu erklären. Die kleinere AUC und die Kürze des Pulses (s. Abb. 22 b) deuten auf eine solche Teilentleerung hin.

Eine Plateauphase konnte unter CPA ebenfalls nicht beobachtet werden.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim. und die AUC waren bei der Versuchsgruppe sogar signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 23). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zellen unter Depolarisation bereits maximal ist und durch die Öffnung von SOCC's nicht mehr gesteigert werden kann. Soweit wäre mit und ohne CPA nicht mit einer Plateauphase zu rechnen gewesen.

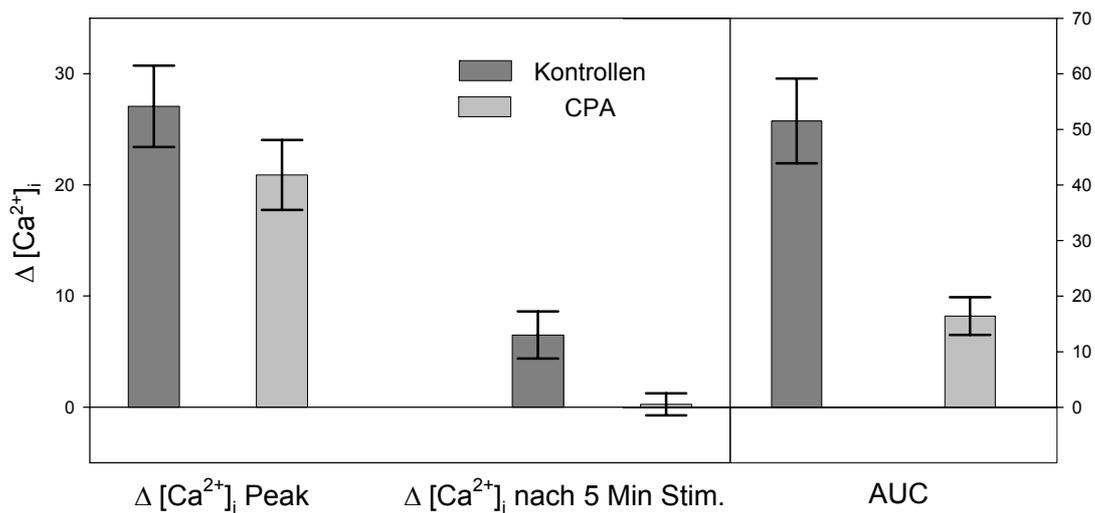


Abb. 23 Darstellung der Peak- und Plateauphase der Stimulation reninsezernierender Zellen mit ANG II (10 nM) unter Depolarisation mit 142 mM K-HEPES-PS. In der Versuchsgruppe (hellgrau) wurden die Zellen mit CPA (10  $\mu$ M) vorbehandelt, in der Kontrollgruppe (dunkelgrau) fiel diese Behandlung weg. Die Peakphase ( $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak) wurde durch die Blockade der SERCA nicht beeinflusst, sie zeigte im t-Test zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Die Plateauphase ( $\Delta [Ca^{2+}]_i$  nach 5 Min Stim.) wurde durch die SERCA-Blockade mit CPA in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verkleinert ( $p = 0,037$ ). Auch die AUC war in der Versuchsgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).

### **3.2.4 Verhalten der $[Ca^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen bei Blockade von $K^+$ -Kanälen durch TEA**

#### **3.2.4.1 *Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ durch TEA unter physiologischen Verhältnissen sowie unter Stimulation mit ANG II***

Die Substanz TEA (Tetraethylammoniumchlorid) ist ein relativ unspezifischer Blocker von  $K^+$ -Kanälen. Durch TEA werden vorwiegend spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_v$ -Kanäle) und  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanäle ( $BK_{Ca}$ ) blockiert. Im Institut für "Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler" (Fakultät für Chemie und Pharmazie) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in der AG von Prof. Ruth ist eine  $BK_{Ca}$ -knock-out-Maus vorhanden, die von unserer AG bei begründetem experimentellen Konzept genutzt werden könnte.  $BK_{Ca}$  Kanäle sind in reninsezernierenden Zellen vorhanden (Friis et al. (2003), Leichtle et al. (2004)). Um festzustellen, ob diese Kanäle in unserem Modell von funktioneller Bedeutung sind, wurden die hier aufgeführten Experimente durchgeführt.

In der ersten Untersuchungsreihe sollte geklärt werden, ob durch die Blockade dieser  $K^+$ -Kanäle eine Depolarisation der Zellen mit anschließendem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch spannungsaktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle auszulösen ist. In der zweiten Versuchsreihe sollte die Rolle dieser  $K^+$ -Kanäle bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  während der Stimulation der Zellen durch ANG II untersucht werden. Für alle Versuche wurde TEA in einer Konzentration von 10 mM und ANG II in einer Konzentration von 3 nM eingesetzt.

In der ersten Versuchsreihe (s. Abb. 24) wurden insgesamt 23 Versuche durchgeführt. Ausgewertet wurden nur Versuche, deren Zellen abschließend noch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auf die Stimulation mit ANG II zeigten ( $n = 13$ ). Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  unter der Stimulation mit ANG II wurde als Funktionskontrolle der Zellen angesehen. In dieser Gruppe konnte in 11 der 13 Experimente (ca. 85 %) kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch TEA verursacht werden. In den verbliebenen zwei Experimenten bewegte sich das Glomerulum unter dem Lösungsfluss während der Messung. Diese Experimente wurden wegen Wackelartefakten aus der Auswertung genommen. Aus den genannten

## Ergebnisse

Resultaten konnte gezeigt werden, dass TEA alleine die Zellen nicht depolarisierte und daher keinen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch VOCC's verursachte.

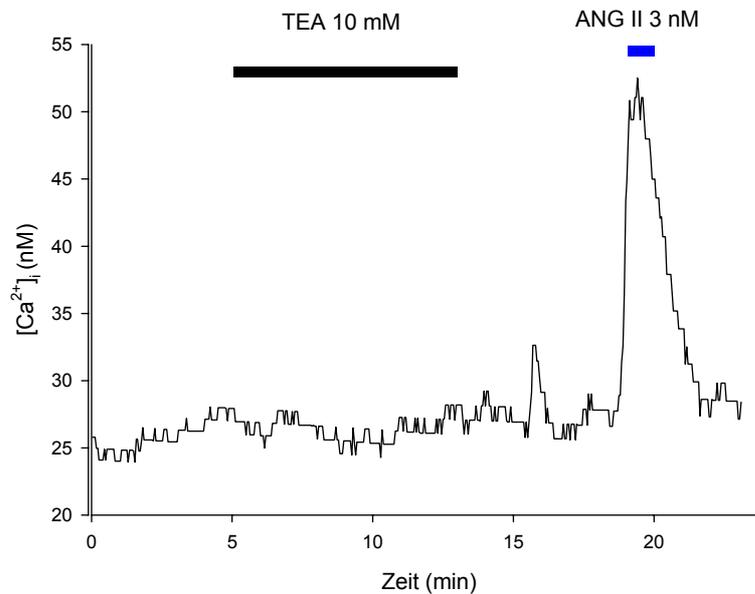


Abb. 24 Reaktion der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere auf die Blockade von  $K^+$ -Kanälen durch TEA (10 mM). In ca. 85 % der Versuche konnte kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch TEA ausgelöst werden. Die Stimulation durch ANG II diente dem Beweis der Reaktionsfähigkeit der Zellen.

In der zweiten Versuchsreihe (s. Abb. 25) sollte geklärt werden, ob durch die Blockade der  $K^+$ -Kanäle die Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II beeinflusst werden kann. Hierzu wurde ein Doppelstimulationsprotokoll angewendet. Die Stimulation mit ANG II erfolgte für jeweils eine Minute. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Peak<sub>1</sub> entstand sowohl in der Versuchs- (n = 3) als auch in der Kontrollgruppe (n = 3) in Abwesenheit von TEA. Peak<sub>2</sub> wurde in der Versuchsgruppe unter TEA durchgeführt. Die Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II blieb durch TEA unbeeinflusst.  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak<sub>2</sub> der Versuchsgruppe unterschied sich nicht signifikant von  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  Peak<sub>2</sub> der Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

	Standardpeak		Testpeak	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>
<b>TEA (10 mM)</b> n = 3 (in nM)	24 ± 4	16 ± 3	25 ± 2	12 ± 2
<b>% Standardpeak</b>	100	100	105 ± 10	77 ± 12
<b>Kontrollen</b> n = 3 (in nM)	17 ± 4	16 ± 8	17 ± 5	12 ± 7
<b>% Standardpeak</b>	100	100	70 ± 15	75 ± 2

Tab. 10 Dargestellt sind die Ergebnisse des Doppelstimulationsprotokolls. Peak<sub>2</sub> wurde in der Versuchsgruppe unter Blockade von K<sup>+</sup>-Kanälen durch TEA (10 mM) durchgeführt.

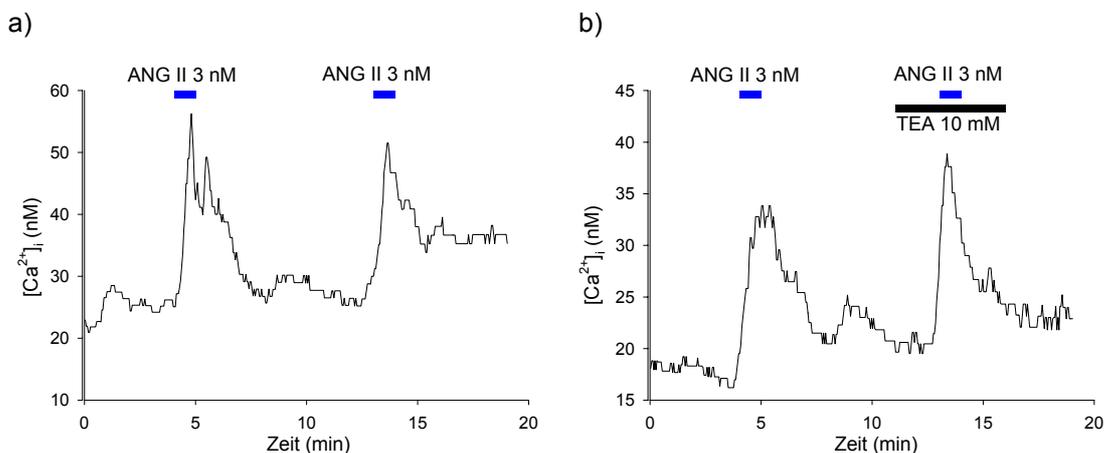


Abb. 25 Dargestellt sind Kontrollen und Versuche der Experimente mit TEA (10 mM), es wurde mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet. Die Stimulationszeit betrug jeweils eine Minute.

a) Kontrollen: Die Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II (3 nM) konnte zweimal in Folge ausgeführt werden.

b) Versuche: Der Peak<sub>2</sub> wurde unter gleichzeitiger Perfusion mit TEA durchgeführt. TEA hatte keinen Einfluss auf die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II (3 nM).

---

**3.2.4.2      *Beeinflussung                      des                      Membranpotentials                      der***  
***reninsezernierenden Zellen durch TEA***

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) sollten Veränderungen des Membranpotentials untersucht werden, die durch TEA verursacht werden könnten. Durch Blockade der K<sup>+</sup>-Kanäle mit TEA wäre eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen denkbar. Diese Experimente dienen als Ergänzung zu den in Kap. 3.2.4.1 durchgeführten Versuchen, bei denen lediglich eine Aussage über die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> gemacht werden konnte und die daher nur indirekt Rückschlüsse auf das Membranpotential zuließen.

Da DiBAC<sub>4</sub>(3) sich abhängig vom Membranpotential in die Zellmembran einlagert, musste dieser Farbstoff ständig über den Lösungszufluss extrazellulär präsent sein. Diese extrazelluläre Präsenz hatte jedoch zur Folge, dass sich DiBAC<sub>4</sub>(3) über den gesamten Zeitraum der Messung stetig in die Membranen einlagerte und es somit zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität kam. Bei Depolarisation hingegen stieg die Fluoreszenzintensität steil an (s. Abb. 26 b). Eine quantitative Auswertung des Membranpotentials konnte aus den Messungen nicht erfolgen, die Experimente dienen lediglich der Fragestellung, ob TEA die reninsezernierenden Zellen depolarisiert oder ob, wie in Kap. 3.2.4.1 bereits vermutet, das Membranpotential unbeeinflusst bleibt.

Es wurden 10 Experimente (s. Abb. 26 a) mit der Fragestellung untersucht, ob TEA (10 mM) eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen verursacht. In keinem der 10 Experimente konnte eine Depolarisation der Zellen unter TEA beobachtet werden, wobei lediglich in 60 % der Fälle eine anschließende Depolarisation der Zellen durch ANG II möglich war. ANG II diente hier erneut als Funktionskontrolle der Zellen. Dies bestätigt die Resultate aus Kap. 3.2.4.1, in denen es nicht gelungen war, mittels TEA eine Depolarisation und dadurch eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu verursachen.

## Ergebnisse

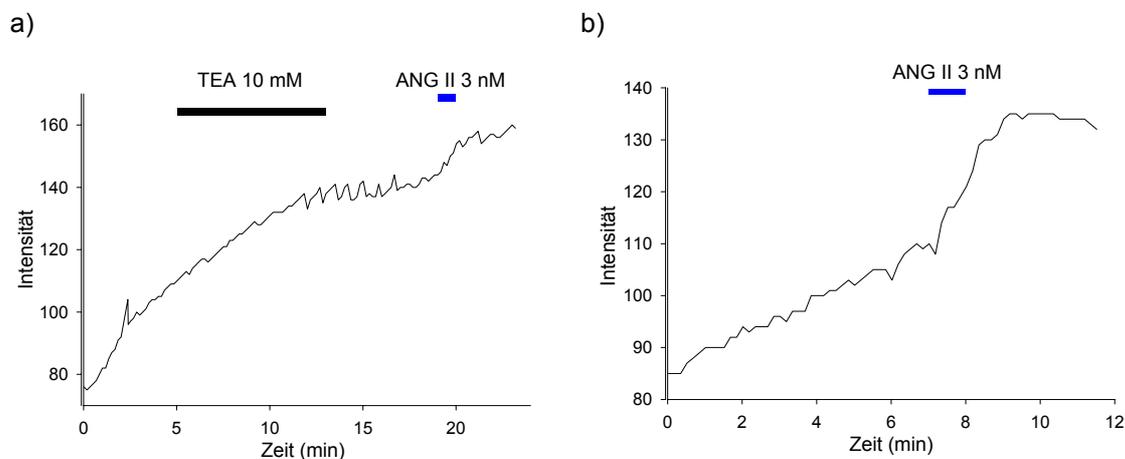


Abb. 26 Intensitätsverlauf der Fluoreszenz in Experimenten zur Messung des Membranpotentials mit DiBAC<sub>4</sub>(3).

a) Verlauf der Fluoreszenzintensität unter TEA (10 mM) und ANG II (3 nM). Zu erkennen ist, dass sich durch TEA keine Veränderung des Membranpotentials einstellte. Die Stimulation mit ANG II hingegen ließ die Fluoreszenzintensität steil ansteigen. Eine Depolarisation unter ANG II konnte jedoch nur in 60 % der Fälle beobachtet werden.

b) Demonstration der Depolarisation der reninsezernierenden Zellen durch ANG II (3 nM). Es zeigte sich ein steiler Anstieg der Fluoreszenzintensität unter Stimulation mit ANG II und der damit verbundenen Depolarisation.

### 3.2.5 Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Blockade einwärts gleichrichtender $K^+$ -Kanäle durch Barium

Barium blockiert unter anderem einwärts gleichrichtende  $K^+$ -Kanäle vom Typ  $K_{ir} 2.1$ , die auch in der afferenten Arteriole der Rattenniere vorkommen (Leichtle et al. (2004)). In den durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob durch Barium eine Depolarisation mit anschließendem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zellen verursacht werden kann.

In Kap. 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass durch eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht wurde. Dies geschah durch die Öffnung spannungsaktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VOCC's). Es wurden insgesamt vier Experimente durchgeführt. In allen vier Experimenten konnte unter Einfluss des Barium eine scheinbare Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  aus den Fluoreszenzintensitätsverläufen errechnet werden (s. Abb. 27). In keinem dieser Experimente konnte ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden.

## Ergebnisse

Dieses Resultat macht eine für die Aktivierung der VOCC's ausreichende Depolarisation der reninsezernierenden Zellen durch Barium unwahrscheinlich. Darüber hinaus konnte in allen Experimenten kein stabiles Niveau der  $[Ca^{2+}]_i$  erreicht werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff nicht selektiv für  $Ca^{2+}$ -Ionen ist, sondern auch weitere, zweiwertig positive Ionen komplexiert (mit Ausnahme von Magnesium), dürfte der Anstieg des Fluoreszenzratios durch eine intrazelluläre Akkumulation von  $Ba^{2+}$ -Ionen in den reninsezernierenden Zellen

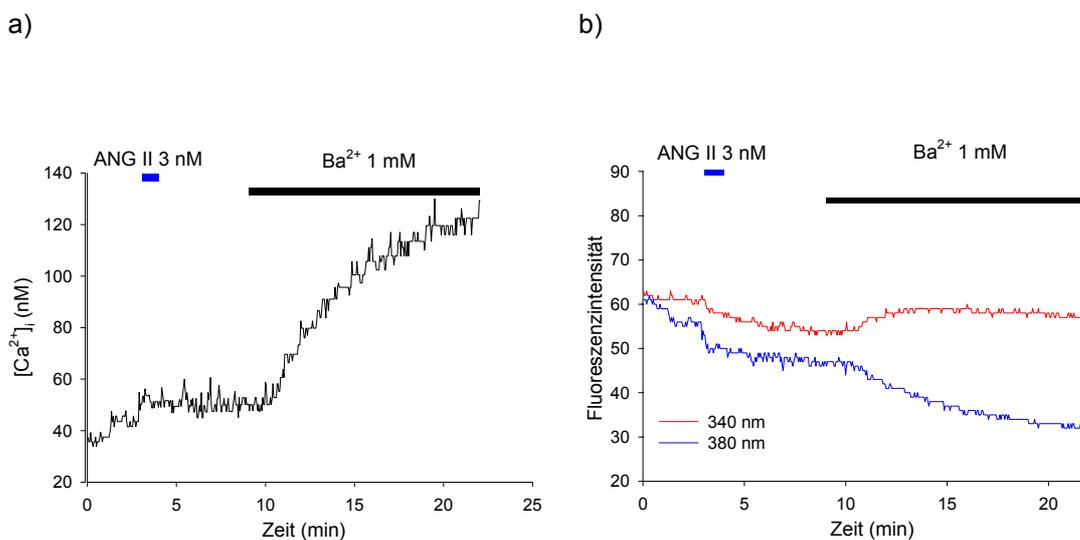


Abb. 27 Experimente mit dem Versuch der Depolarisation der Zellen mit Barium (1 mM).

a) Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  bei der Stimulation mit ANG II (3 nM) und dem Versuch der Depolarisation mit Barium. Die  $[Ca^{2+}]_i$  stieg unter Barium kontinuierlich an. Man muss davon ausgehen, dass der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durch einen Barium-Einstrom in die Zellen beeinflusst wurde. Dadurch konnte keine Aussage über die  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgen.

b) Verlauf der Fluoreszenzintensitäten für die gemessenen Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Unter Barium divergiert der Verlauf der Intensität beider Wellenlängen langsam auseinander. Dies ist ein Zeichen dafür, dass nicht die schnelle Depolarisation einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom verursacht, sondern dass der Farbstoff Fura-2 mit  $Ba^{2+}$ -Ionen Komplexe bildet, welche sich in den Zellen anreicherten.

und anschließender Komplexbildung mit dem Farbstoff Fura-2 verursacht worden sein. Zur Festigung dieser Hypothese wurden Messungen mit dem Fluoreszenz Spectrophotometer unternommen (s. Tab. 11). Barium wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.  $Ca^{2+}$  wurde zu den jeweiligen Lösungen im Überschuss gegeben (11 mM). Zur Funktionskontrolle des

## Ergebnisse

Farbstoffs wurde Mangan (11 mM) eingesetzt. Mangan bindet ebenfalls an den Farbstoff Fura-2 und unterdrückt die Fluoreszenz nahezu vollständig (Tinel et al. (2002)). In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Barium eine Intensitätszunahme bei der Anregungswellenlänge 340 nm von 40,4 V auf 78,2 V stattfand, bei der Anregungswellenlänge 380 nm eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz von 32,6 V auf 16,3 V erfolgte. Dieses Verhalten ist vergleichbar mit der Reaktion des Fura-2 auf den Überschuss an  $\text{Ca}^{2+}$ . Dies bestätigt die oben genannte Vermutung, dass in den Messungen nicht alleine das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gemessen wurde, sondern die Messergebnisse durch die intrazelluläre Anreicherung von  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen verfälscht wurden. Auf Grund der oben genannten Erkenntnisse wurde die Experimentreihe eingestellt.

Wellenlänge	- Barium - Fura-2	+ Barium - Fura-2	- Barium + Fura-2	+ Barium + Fura-2	- Barium + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	+ Barium + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	- Barium + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$	+ Barium + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$
	340 nm	0 V	0 V	40,4 V	78,2 V	67,8 V	80,6 V	4 V
380 nm	0 V	0 V	32,6 V	16,3 V	4,1 V	5,1 V	1,3 V	1,7 V

Tab. 11 Dargestellt sind die Fluoreszenz Spectrophotometermessungen der Kalibrierlösung unter unterschiedlichen Bedingungen. Barium wurde in einer Konzentration von 1 mM verwendet,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  wurden in einer Konzentration von 11 mM verwendet. Zu erkennen ist, dass unter Barium und unter  $\text{Ca}^{2+}$  die Fluoreszenzintensität bei Wellenlänge 340 nm gleichermaßen zunimmt und bei 380 nm gleichermaßen abnimmt. Barium komplexiert mit Fura-2 und verändert dadurch die Fluoreszenzeigenschaften ebenso wie  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3 Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Osmolaritäten auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reninsezernierender Zellen der Rattenniere

#### 3.3.1 Einfluss von extrazellulären hypoosmolaren Verhältnissen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen

Die Osmolarität des extrazellulären Mediums beeinflusst direkt die Reninsekretion (Skøtt (1988)). Eine solche Beeinflussung könnte durch Barorezeptoren oder durch Osmorezeptoren der reninsezernierenden Zellen

## Ergebnisse

vermittelt werden. Als Rezeptormolekül für beide Phänomene sind TRP-Kanäle beschrieben worden (Clapham et al. (2003)). Ob unterschiedliche extrazelluläre Osmolaritäten zu einer Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  führen, um  $Ca^{2+}$ -Ionen z.B. als second messenger zu nutzen, wurde bisher nicht untersucht und sollte mit den durchgeführten Experimenten aufgeklärt werden. ANG II wurde in den Experimenten ( $n = 4$ ) in einer Konzentration von 3 nM als Kontrollsubstanz für die Reaktionsfähigkeit der Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimentreihe wurden in Tab. 12 zusammengefasst.

	Standardpeak		Testpeak	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>
<b>232,6 mosmol n = 4 (in nM)</b>	41 ± 9	56 ± 15	44 ± 15	28 ± 6
<b>% Standardpeak</b>	100	100	111 ± 9	58 ± 13

Tab. 12 Ergebnisse aus den Experimenten der Stimulation mit 3 nM ANG II (Peak<sub>1</sub>) und Stimulation mit hypoosmolarem Na-HEPES-PS (Peak<sub>2</sub>). Die  $[Ca^{2+}]_i$  stieg unter hypoosmolaren Verhältnissen signifikant an ( $p = 0,021$ ).

Unter extrazellulär hypoosmolaren Bedingungen konnte man einen signifikanten Anstieg  $[Ca^{2+}]_i$  über die Formel von Grynkiewicz berechnen (s. Abb. 28 a,  $p = 0,021$ ). Ob diese Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  eine reale Erhöhung darstellt ist nicht abschließend zu beweisen, da ein Verdünnungsartefakt denkbar wäre. Während der Messung erfolgte unter niedriger extrazellulärer Osmolarität eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden gemessenen Wellenlängen (s. Abb. 28 b). Diese Beobachtung ist durch einen Wassereinstrom in die Zellen zu erklären, bei dem der Farbstoff verdünnt wurde. Für eine reale Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  spricht die Tatsache, dass bei der Berechnung nach Grynkiewicz das Ratio, also das Verhältnis der

## Ergebnisse

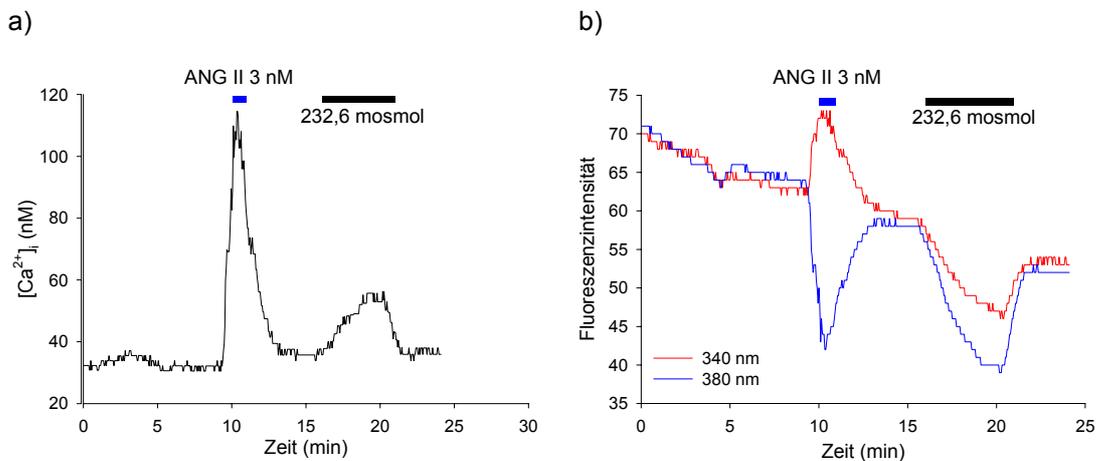


Abb. 28 Stimulation der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere mit 3 nM ANG II und mit hypoosmolarer Lösung (232,6 mosmol).

a) Verhalten der  $[Ca^{2+}]_i$  auf die Stimulation mit ANG II (3 nM) und auf extrazellulär hypoosmolare Verhältnisse. Es konnte in allen vier durchgeführten Experimenten eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch extrazellulär hypoosmolare Verhältnisse über die Formel von Grynkiewicz berechnet werden. Ob es sich dabei um einen realen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  handelt, war nicht sicher nachzuweisen.

b) Verlauf der Fluoreszenzintensität unter Stimulation mit ANG II (3 nM) und unter extrazellulär hypoosmolaren Verhältnissen. Deutlich zu erkennen ist, dass bei einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ANG II die Fluoreszenzintensitäten der beiden Wellenlängen auseinander divergieren, bei hypoosmolaren Verhältnissen dagegen sinken beide Wellenlängen gleichsinnig ab. Über die Formel von Grynkiewicz konnte dabei jedoch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  berechnet werden. Ob diese Erhöhung real war konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden.

Fluoreszenzintensitätswerte bei 340 nm und 380 nm, einbezogen wird. Dieses Verhältnis sollte bei einer Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden gemessenen Wellenlängen, wie dies in den durchgeführten Versuchen unter hypoosmolaren Bedingungen beobachtet wurde, gleich bleiben. Zur sicheren Beurteilung dieser Experimente wären weitere Kontrollversuche nötig.

### 3.3.2 Einfluss von extrazellulären hyper- und hypoosmolaren Verhältnissen auf die $[Ca^{2+}]_i$

Die Experimentreihe stellte eine Weiterführung der Versuche aus Kap. 3.3.1 dar. Von Interesse war das Verhalten der  $[Ca^{2+}]_i$  der reninsezernierenden Zellen auf eine erhöhte extrazelluläre Osmolarität sowie der Verlauf der

## Ergebnisse

Fluoreszenzintensitäten unter diesen Bedingungen. Hierzu wurden zwei Experimentreihen aufgenommen. In beiden Experimentreihen wurde mit einem Doppelstimulationsprotokoll gearbeitet. In der Experimentreihe 1 wurden die Zellen zuerst mit hypoosmolarem Na-HEPES-PS (232,6 mosmol) stimuliert, die zweite Stimulation erfolgte mit hyperosmolarem Na-HEPES-PS (392,6 mosmol) (s. Abb. 29.a). In der Experimentreihe 2 wurde die Reihenfolge der Stimulationen umgekehrt (s. Abb. 29 b), um die Reaktionsfähigkeit der reinsezernierenden Zellen in unterschiedlichen Bedingungen zu testen. Die Ergebnisse der Versuchsreihe wurden in Tab. 13 zusammengefasst.

	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>2</sub>
<b>Experimentreihe 1</b> (n = 4)	51 ± 5	32 ± 4	73 ± 10	- 2 ± 1
<b>Experimentreihe 2</b> (n = 6)	22 ± 4	3 ± 3	27 ± 8	14 ± 5

Tab. 13 Ergebnisse der Reaktion reinsezernierender Zellen auf unterschiedlich extrazelluläre Osmolaritäten. In Experimentreihe 1 wurde Stim<sub>1</sub> unter extrazellulär hypoosmolarer Lösung durchgeführt, Stim<sub>2</sub> unter hyperosmolarer Lösung. In Experimentreihe 2 wurde die zeitliche Abfolge der Lösungspertusion vertauscht. In beiden Versuchsanordnungen konnte unter hypoosmolaren Bedingungen eine signifikante Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  berechnet werden (Experimentreihe 1:  $p = 0,003$ , Experimentreihe 2:  $p = 0,029$ ), unter hyperosmolaren Bedingungen reagierten die Zellen nicht mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Insgesamt wurden 11 Versuche durchgeführt, davon fünf in der Experimentreihe 1 und sechs in der Experimentreihe 2. Von den fünf Versuchen der Experimentreihe 1 wurde ein Versuch aus der Auswertung ausgeschlossen. Während der Aufnahmen wackelte das Glomerulum im Lösungsfluss. In beiden Experimentreihen konnte mit der Formel nach Grynkiewicz eine signifikante Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter extrazellulär hypoosmolaren Bedingungen errechnet werden (Experimentreihe 1:  $p = 0,003$ , Experimentreihe 2:  $p = 0,029$ ). Unter diesen Verhältnissen verringerte sich die Fluoreszenzintensität bei beiden

## Ergebnisse

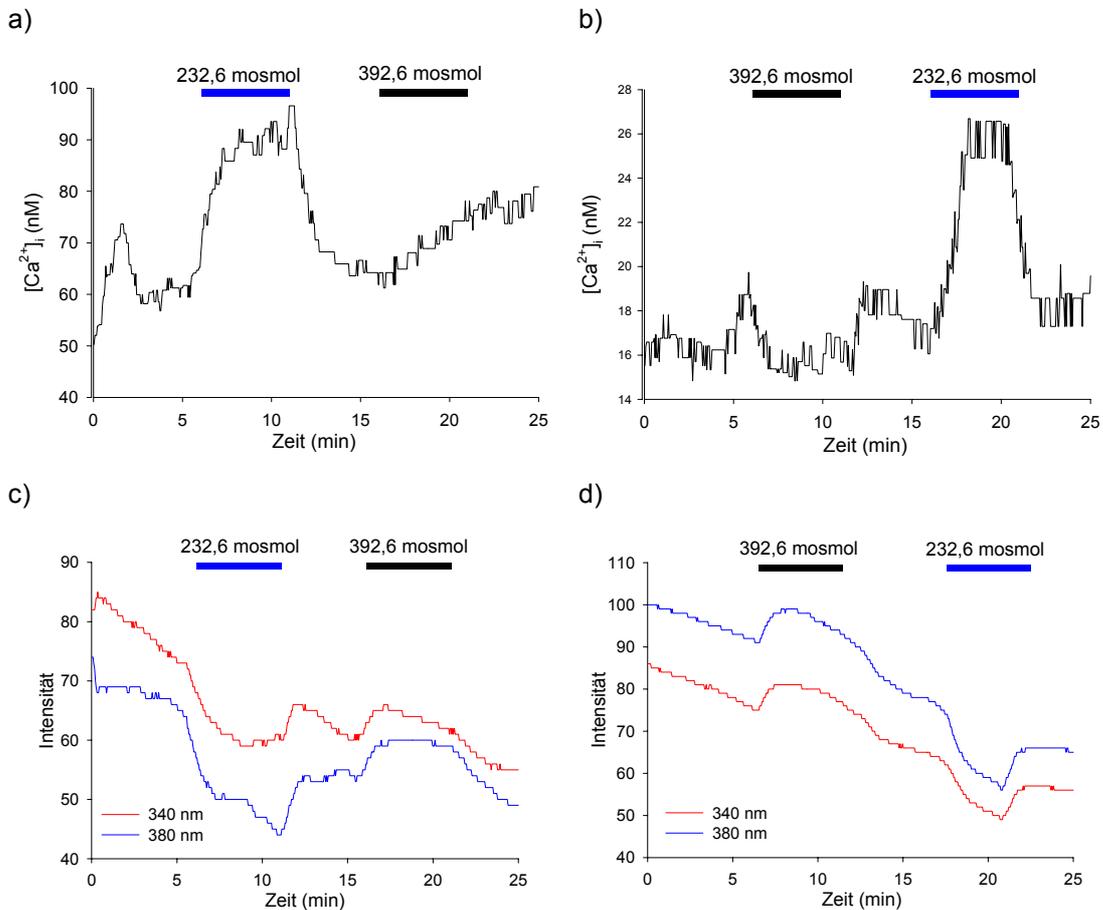


Abb. 29 Beide Experimentreihen mit dem Versuch der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit hypoosmolarer Lösung (232,6 mosmol) und hyperosmolarer Lösung (392,6 mosmol) im Doppelstimulationsprotokoll. Zusätzlich sind die Fluoreszenzverläufe dargestellt.

a) Experimentreihe 1: Im Doppelstimulationsprotokoll wurde die erste Stimulation unter extrazellulär hypoosmolaren Bedingungen, die zweite Stimulation unter hyperosmolaren Bedingungen durchgeführt. Unter hypoosmolaren Bedingungen hatten alle vier ausgewerteten Experimente mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  reagiert, unter hyperosmolaren Bedingungen konnte in keinem der Experimente eine signifikante Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  errechnet werden.

b) Experimentreihe 2: Der zeitliche Ablauf der Stimulationen aus der Experimentreihe 1 wurde vertauscht. Die Reaktionen der reninsezernierenden Zellen auf die unterschiedlichen Osmolaritäten entsprach den Reaktionen aus Experimentreihe 1.

c) Verlauf der Fluoreszenzintensität der Experimentreihe 1: Zu erkennen ist der gleichsinnige Fluoreszenzverlauf unter unterschiedlichen extrazellulären Osmolaritäten, der als Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsartefakt zu werten war. Nur unter extrazellulär niedriger Osmolarität war ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  über die Formel von Grynkiewicz zu berechnen.

d) Verlauf der Fluoreszenzintensität der Experimentreihe 2: Diese dienen der Reproduktion der Ergebnisse aus Experimentreihe 1, die Reaktionen der reninsezernierenden Zellen waren hier vergleichbar mit den Reaktionen aus Experimentreihe 1.

## Ergebnisse

---

gemessenen Wellenlängen (s. Abb. 29 c und d) durch Verdünnung des intrazellulären Farbstoffs, wie dies bereits in Kap. 3.3.1 beschrieben wurde. Unter hyperosmolaren extrazellulären Bedingungen konnte keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden. Hier erhöhte sich die Fluoreszenzintensität erwartungsgemäß bei beiden gemessenen Wellenlängen. Dies ist als Zellschrumpfungphänomen bei gleichzeitiger Konzentrierung des intrazellulären Farbstoffs zu werten. Für die Vermutung aus Kap. 3.3.1., dass es sich bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter extrazellulär hypoosmolaren Bedingungen um einen real gemessenen Wert handelt spricht die Tatsache, dass es bei den hier durchgeführten Versuchen unter hoher extrazellulärer Osmolarität ebenfalls zu einer gleichsinnigen Veränderung der Fluoreszenzintensitäten kam, wie dies auch unter hypoosmolaren extrazellulären Bedingungen beobachtet wurde. Durch die Verwendung des Ratio bei der Berechnung nach Grynkiewicz ergab sich bei hyperosmolaren Verhältnissen jedoch kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Beobachtung spricht gegen einen reinen Zellvolumenartefakt bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter hypoosmolaren extrazellulären Bedingungen.

### **3.3.3 Einfluss von Gadolinium auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter extrazellulären hypoosmolaren Verhältnissen**

SOCC's (store operated  $Ca^{2+}$ -channels) gehören zu der Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential) (Ma et al. (2000)) und werden durch Gadolinium gehemmt (s. Kap. 3.2.2). Einige der TRP-Kanäle reagieren auf die extrazelluläre Osmolarität und verursachen einen Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle (Clapham et al. (2003)). Dadurch wird die  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht. In den Experimenten der Kap. 3.3.1 und Kap. 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass es unter extrazellulär hypoosmolaren Bedingungen wahrscheinlich zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  kommt. Die Herkunft dieser  $Ca^{2+}$ -Ionen ist unklar. Eine Möglichkeit könnte der Einstrom von extrazellulär durch Aktivierung von Gadolinium-empfindlichen TRP-Kanälen sein. Ziel der Experimente war

## Ergebnisse

herauszufinden, ob durch eine Blockade dieser TRP-Kanäle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg - verursacht durch die extrazellulär hypoosmotische Situation - verhindert werden kann. In den Experimenten wurde mit einem Einzelstimulationsprotokoll gearbeitet. Gadolinium wurde in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  verwendet.

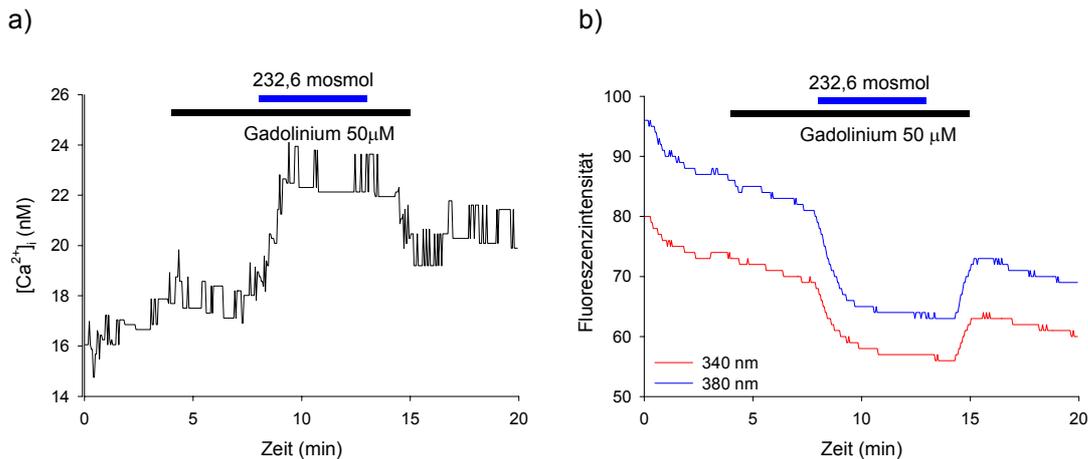


Abb. 30 Einzelstimulationsprotokoll der Stimulation mit hypoosmolarer extrazellulärer Lösung (232,6 mosmol) unter Gadolinium ( $50 \mu\text{M}$ ).

a) Verlauf der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter hypoosmolaren extrazellulären Verhältnissen. Der Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konnte in keinem der Experimente durch Gadolinium verhindert werden ( $n = 5$ ).

b) Verlauf der Fluoreszenzintensität beider gemessenen Emissionswellenlängen. Zu erkennen ist der Verdünnungseffekt unter hypoosmolaren extrazellulären Bedingungen durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen. Dieser Verdünnungseffekt entsteht durch den Einstrom von Wasser in die Zellen mit dem Resultat der Zellschwellung.

Insgesamt wurden fünf Experimente aufgenommen. Zwei der Experimente wurden nicht in die Auswertung einbezogen, sie wackelten im Lösungsfluss während der Aufnahme und ließen dadurch keine verlässliche Aussage zu. In allen drei Experimenten, die zur Auswertung standen, konnte eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Gadolinium nicht verhindert werden (s. Abb. 30). Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Stimulation mit extrazellulär hypoosmolarer Lösung scheint daher nicht durch Gadolinium-empfindliche TRP-Kanäle bewirkt zu werden.

### 3.4 Charakterisierung der durch $\beta$ -Rezeptor-Stimulation verursachten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

#### 3.4.1 Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Isoprenalin/IBMX

Die Sekretion des Botenstoffs Renin aus den Zellen der afferenten Arteriole der Niere kann durch  $\beta$ -Rezeptoragonisten, wie Isoprenalin (ISO), stimuliert werden (Keeton und Campbell (1980), Kurtz et al. (1984), Della Bruna et al. (1991)). Durch die Stimulation des  $\beta$ -Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch zur Erhöhung des intrazellulären Gehaltes des zyklischen Nukleotides cAMP. Durch das Enzym Phosphodiesterase wird cAMP intrazellulär inaktiviert. Durch Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase, z.B. durch IBMX, kann die intrazelluläre Konzentration von cAMP gesteigert werden und dadurch die Reninsekretion erhöht werden (Friis et al. (2002)). Laske-Ernst (2003) konnte zeigen, dass unter ISO/IBMX, entgegen der Theorie des Kalziumparadoxons, eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  stattfindet.

Die Versuche wurden in einem Doppelstimulationsprotokoll (s. Abb. 31) durchgeführt. Die erste Stimulation ( $Stim_1$ ) erfolgte durch ANG II (3 nM), die

	Stimulation mit ANG II		Stimulation mit ISO/IBMX	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>2</sub>
<b>ISO/IBMX n = 8 (in nM)</b>	25 ± 4	20 ± 4	30 ± 6	11 ± 2
<b>% Standardpeak</b>	100	100	115 ± 6	75 ± 20

Tab. 14 Ergebnisse aus den Experimenten des Doppelstimulationsprotokolls.  $Stim_1$  wurde durch Stimulation mit ANG II (3 nM) ausgelöst,  $Stim_2$  wurde durch ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100 $\mu$ M) ausgelöst. ISO/IBMX war in der Lage einen signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zu verursachen ( $p = 0,001$ ). Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimulation mit ANG II war signifikant größer als der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  unter ISO/IBMX ( $p = 0,044$ ).

## Ergebnisse

---

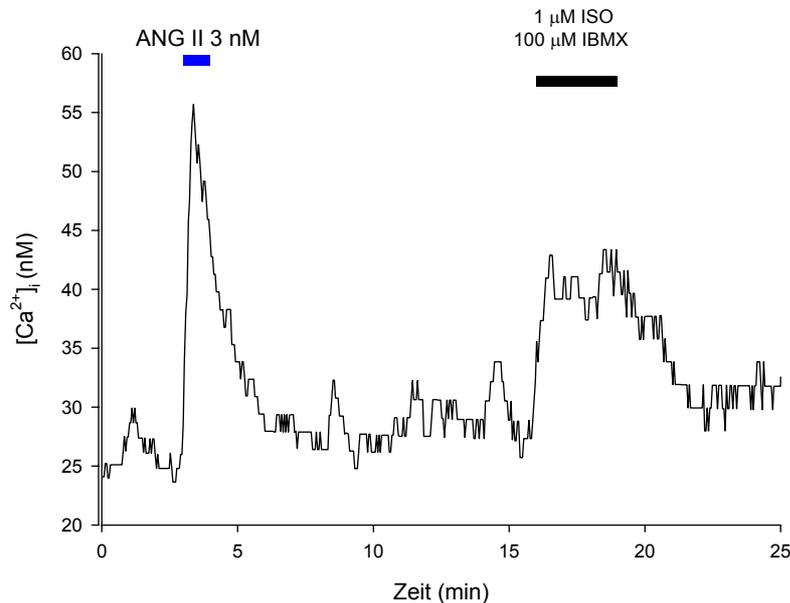


Abb. 31 Doppelstimulationsprotokoll: Die erste Stimulation wurde mit ANG II (3 nM) durchgeführt, die zweite Stimulation mit ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100  $\mu$ M). Isoproterenol ist ein  $\beta$ -Rezeptoragonist und führt zu einer Erhöhung des cAMP in den reninsezernierenden Zellen. Durch die Erhöhung des cAMP wird die Reninsekretion gesteigert, IBMX, als Hemmstoff der Phosphodiesterase, erhöht zusätzlich das cAMP und verstärkt dadurch die Sekretion des Renin. Unter ISO/IBMX konnte ein deutlicher Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen werden.

zweite Stimulation (Stim<sub>2</sub>) wurde mit Isoprenalin und IBMX (ISO 1  $\mu$ M / IBMX 100  $\mu$ M) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefasst. ISO/IBMX verursachte in den Experimenten eine signifikante Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen ( $p = 0,001$ ). Diese Reaktion fiel jedoch kleiner aus, als die Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit ANG II ( $p = 0,044$ ). Dies bestätigt die Resultate von Laske-Ernst (2003).

### 3.4.2 Einfluss der Proteinkinase A auf die durch Isoprenalin/IBMX verursachte Erhöhung $[Ca^{2+}]_i$

In Kap. 3.4.1 wurde beschrieben, dass es durch Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren zu einer Erhöhung von cAMP in den reninsezernierenden Zellen kommt. Die Erhöhung von cAMP wurde durch Isoprenalin in Verbindung mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX erzielt. cAMP führt intrazellulär zur

## Ergebnisse

Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA beginnt nach ihrer Aktivierung mit der Phosphorylierung von weiteren Proteinen bzw. Kanälen, die daraufhin ebenfalls aktiviert werden (Dousa (1999)).

	Standardpeak		Testpeak	
	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal Stim <sub>1</sub>	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Stim <sub>1</sub>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal Stim <sub>2</sub>	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Stim <sub>2</sub>
<b>H 89 (1 μM)</b> n = 11 (in nM)	29 ± 5	14 ± 3	32 ± 4	11 ± 2
<b>% Standardpeak</b>	100	100	121 ± 8	79 ± 5
<b>KT 5720 (1 μM)</b> n = 4 (in nM)	20 ± 5	8 ± 1	21 ± 3	7 ± 1
<b>% Standardpeak</b>	100	100	116 ± 17	86 ± 6
<b>Kontrollen</b> n = 7 (in nM)	26 ± 6	14 ± 2	28 ± 5	10 ± 2
<b>% Standardpeak</b>	100	100	114 ± 7	74 ± 13

Tab. 15 Resultate des Doppelstimulationsprotokolls. Stimuliert wurde mit ISO/IBMX (1 μM/100 μM). In den Versuchsgruppen wurden die Proteinkinase A Inhibitoren H-89 und KT5720 während der zweiten Stimulation (Stim<sub>2</sub>) eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten keine Verkleinerung der Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ISO/IBMX unter gleichzeitiger Blockade der Proteinkinase A.

Chijiwa et al. (1990) hatte die Substanz H-89 als spezifischen Hemmstoff für die PKA beschrieben. Die Substanz KT5720 wurde von Ellershaw et al. (2002) und Hansen et al. (2003) als spezifischer Hemmstoff der PKA bereits eingesetzt. Durch die Untersuchungen sollte aufgeklärt werden, ob die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> während der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ISO/IBMX durch

## Ergebnisse

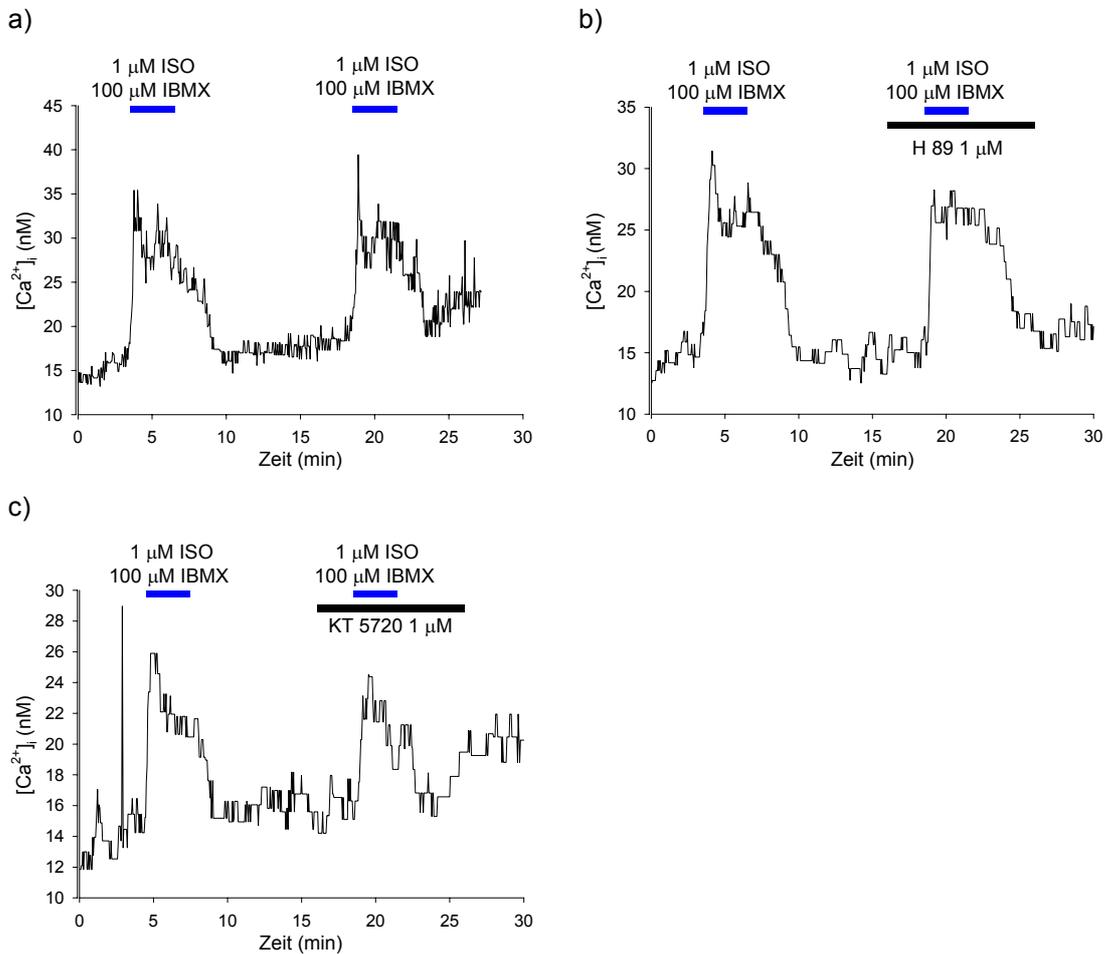


Abb. 32 Dargestellt sind die Experimente des Doppelstimulationsprotokolls. Stimuliert wurde mit ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100  $\mu$ M) über jeweils 3 Minuten.

a) Kontrollelexperiment: Doppelstimulation der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere. Durch die Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren mit Isoprenalin bei gleichzeitiger Gabe des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX wurde der cAMP-Gehalt der Zelle erhöht. Die dadurch verursachte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  war bei beiden Stimulationen in ihrer Höhe vergleichbar.

b) Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO/IBMX unter Blockade der Proteinkinase A mit H-89. Eine Verkleinerung der Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ISO/IBMX konnte unter H-89 nicht festgestellt werden.

c) Bestätigungsexperiment der Versuche mit H-89. KT5720 blockiert, wie H-89, die PKA. Durch diese Experimente sollten die Resultate der Versuche mit H-89 bestätigt werden. Auch unter gleichzeitiger Blockade der PKA mit KT5720 konnte keine Verkleinerung der Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ISO/IBMX beobachtet werden.

eine Aktivierung der PKA und der damit verbundenen Phosphorylierung weiterer Funktionsproteine verursacht wurde. Zur Hemmung der PKA wurden die Substanzen H-89 (1  $\mu$ M) oder KT5720 (1  $\mu$ M) verwendet. In den

## Ergebnisse

Experimenten wurde ein Doppelstimulationsprotokoll (s. Abb. 32) angewendet, die Stimulationszeit mit ISO/IBMX betrug drei Minuten. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Die zweite Stimulation (Stim<sub>2</sub>) erreichte in allen drei Gruppen eine Höhen von ca. 80 % der ersten Stimulation (Stim<sub>1</sub>). Ein signifikanter Unterschied stellte sich hier im ANOVA-Test nicht heraus. Die Hemmung der PKA hatte daher keinen Einfluss auf die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch ISO/IBMX. Phosphorylierungsprozesse der PKA sind hierbei nicht für den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  verantwortlich.

### 3.4.3 Die $[Ca^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen bei der Stimulation mit einem Epac-Aktivator

Der cAMP-Signaltransduktionsweg kann nicht nur durch die PKA, sondern auch durch die Aktivierung von Epac (cAMP-regulierter Guaninnukleotid Austauschfaktor) zu intrazellulären Regulationseffekten führen. Eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern konnte von Kang et al. (2003) an menschlichen  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch die Aktivierung des Epac provoziert werden. Sie verwendeten hierzu die Substanz 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein cAMP-Analogon, welches lediglich den Epac, jedoch nicht die PKA, aktiviert. Da die Resultate aus Kap. 3.4.2 keinen Hinweis

	$[Ca^{2+}]_i$ basal	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim
db cAMP/IBMX (1 mM/100 $\mu$ M) n = 3 (in nM)	10 $\pm$ 3	9 $\pm$ 1
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (200 $\mu$ M) n = 3 (in nM)	12 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1

Tab. 16 Ergebnisse aus den Experimenten mit 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (200  $\mu$ M, Versuche) und db cAMP/IBMX (1 mM/100  $\mu$ M, Kontrollen). Durch die Anwendung des Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP konnte keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie dies bei db cAMP/IBMX der Fall war, erreicht werden.

## Ergebnisse

auf eine Rolle der PKA bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  der reninsezernierenden Zellen erbrachte, sollte in den folgenden Experimenten der Signaltransduktionsweg über die Aktivierung des Epac untersucht werden. Hierfür wurde die von Kang et al. (2003) verwendete Substanz 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in einer Konzentration von 200  $\mu$ M eingesetzt. Die Kontrollversuche wurden mit dem membrangängigen cAMP-Analogen db cAMP (dibutyryl cAMP) in Kombination mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX durchgeführt. Die Konzentration des db cAMP betrug 1 mM, die des IBMX 100  $\mu$ M. Die Ergebnisse wurden in Tab. 16 zusammengefasst. Die Kombination aus db cAMP und IBMX (1 mM/100  $\mu$ M) führte in allen Fällen ( $n = 3$ ) zu einer signifikanten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p = 0,002$ , s. Abb. 33 a). Im Gegensatz dazu konnte in der Versuchsgruppe ( $n = 3$ ) unter Perfusion von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden (s. Abb. 33 b, Abb. 34).

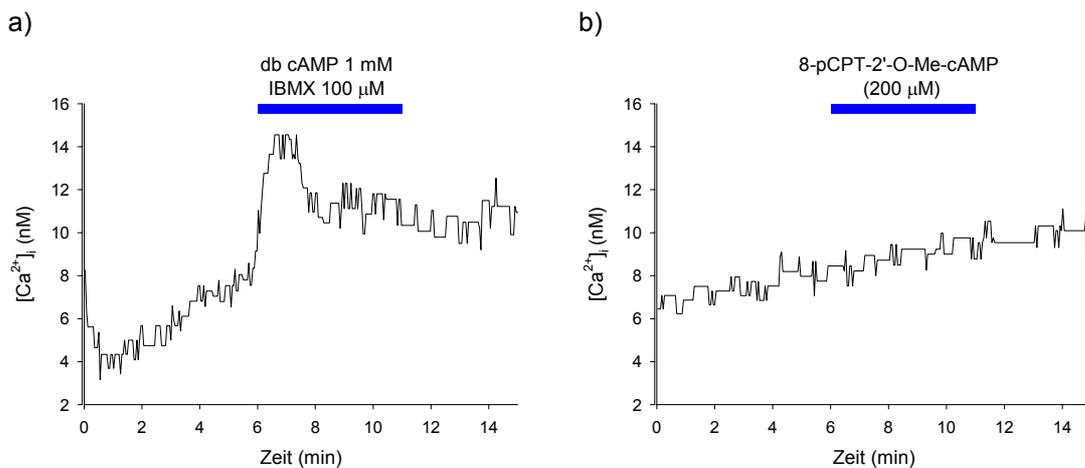


Abb. 33 Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit cAMP-Analoga.

a) Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen unter der Stimulation mit dem membrangängigen cAMP-Analogen db cAMP (1 mM) in Kombination mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100  $\mu$ M). In allen drei Experimenten konnte eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erreicht werden.

b) Einsatz des Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (200  $\mu$ M) auf die  $[Ca^{2+}]_i$ . Unter dieser Substanz reagierten die Zellen nicht mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die  $[Ca^{2+}]_i$  verblieb auf basalen Werten.

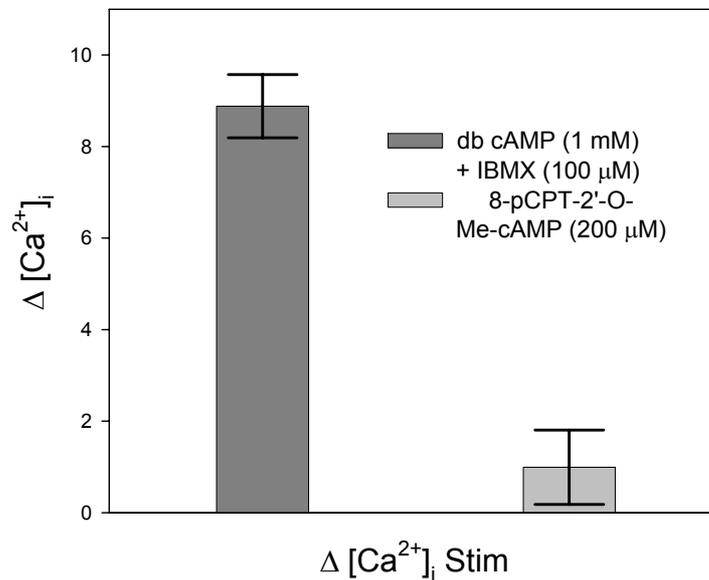


Abb. 34 Darstellung der Werte der Stimulation mit db cAMP/IBMX (1 mM/100 μM) im Vergleich zu den Experimenten mit 8-pCPT-2'-o-Me-cAMP (200 μM). In der Kontrollgruppe wurde eine Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung beobachtet, die in der Versuchsgruppe ausblieb. Daher stellte sich Δ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Stim hier signifikant größer dar (p = 0,005).

### 3.5 Einfluss von Zell-Zell-Kontakten auf die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch die Stimulation mit ANG II im Zellverband

#### 3.5.1 Substanzen zur Blockade der Gap junctions

Gap junctions sind spezielle Regionen in der Zellmembran, die aus Proteinen bestehen und benachbarte Zellen miteinander in Verbindung bringen. Diese Verbindungen sind wichtig für die interzelluläre Kommunikation (Ryan et al. (2003)). Solche Zell-Zell-Kontakte wurden bereits in den reninsezernierenden Zellen nachgewiesen (Taugner und Hackenthal (1989), Haefliger et al. (2004)). Ziel unserer Experimente war es herauszufinden, ob Gap junctions an der Reaktion der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II beteiligt sind. Hierzu sollten die Gap junctions der Zellen blockiert werden. 18β-Glycyrrhetic Acid wurde von Yamamoto et al. (1998) als sehr potenter

## Ergebnisse

Gap junctions Blocker beschrieben, 1-Heptanol und 1-Octanol hingegen, wurden als weniger potent beschrieben und mussten in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Um Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs Fura-2 durch die Substanzen 1-Heptanol, 1-Octanol und 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid auszuschließen, wurden zunächst Fluoreszenzmessungen des Farbstoffes im Fluoreszenz Spectrophotometer unternommen. Die Anregungswellenlängen betragen 340 nm und 380 nm ( $\lambda$ ). Die Fluoreszenzintensität wurde bei der Emissionswellenlänge 510 nm gemessen. Die Messungen erfolgten unter Zugabe der Gap junctions Blocker jeweils in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung und in einer Lösung mit einem Überschuss an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Zur Überprüfung des Farbstoffs auf seine Reaktionsfähigkeit wurde ein Zusatz Mangan zugegeben, der die Fluoreszenz vollständig aufhebt. Die Ergebnisse der Messungen wurden in Tab. 17 zusammengefasst.

$\lambda$	- Glyc. A. - Fura-2	+ Glyc. A. - Fura-2	- Glyc. A. + Fura-2	+ Glyc. A. + Fura-2	- Glyc. A. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	+ Glyc. A. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	- Glyc. A. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$	+ Glyc. A. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$
340 nm	0 V	0 V	41,5 V	43,2 V	79,1 V	72,9 V	6,6 V	6,1 V
380 nm	0 V	0 V	34,2 V	32,6 V	10,1 V	9,6 V	2,4 V	2,6 V
$\lambda$	- Hept. - Fura-2	+ Hept. - Fura-2	- Hept. + Fura-2	+ Hept. + Fura-2	- Hept. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	+ Hept. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	- Hept. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$	+ Hept. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$
340 nm	0 V	0 V	45,7 V	48,2 V	81,2 V	82,5 V	8,2 V	7,4 V
380 nm	0 V	0 V	35,4 V	36,4 V	10,4 V	10,5 V	4,2 V	3,8 V
$\lambda$	- Oct. - Fura-2	+ Oct. - Fura	- Oct. + Fura-2	+ Oct. + Fura-2	- Oct. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	+ Oct. + Fura-2 + $\text{Ca}^{2+}$	- Oct. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$	+ Oct. + Fura-2 + $\text{Mn}^{2+}$
340 nm	0 V	0 V	46,4 V	46,7 V	81,8 V	81,0 V	7,7 V	6,7 V
380 nm	0 V	0 V	35,2 V	34,0 V	10,7 V	10,6 V	2,8 V	3,0 V

Tab. 17 Dargestellt sind die Ergebnisse der Fluoreszenz Spectrophotometermessungen. Gemessen wurden die Intensitäten bei den Wellenlängen ( $\lambda$ ) 340 nm und 380 nm. 1-Heptanol (Hept.), 1-Octanol (Oct.) und 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (Glyc. A.) zeigten keine Eigenfluoreszenz und keine Veränderung der Reaktionsfähigkeit des Farbstoffs Fura-2 auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss.

## Ergebnisse

Der Farbstoff Fura-2 zeigte keine Veränderungen seiner Fluoreszenzeigenschaften nach Zugabe von 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid, 1-Heptanol und 1-Octanol. Eine adäquate Reaktion des Fura-2 auf den Zusatz von Ca<sup>2+</sup>-Ionen konnte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der Gap junctions Blocker beobachtet werden. Durch den Zusatz von Mn<sup>2+</sup>-Ionen, die Fura-2 quenchen, sollte darüber hinaus die Reaktionsfähigkeit des Farbstoffs Fura-2 ausgetestet werden. Mn<sup>2+</sup>-Ionen führten in allen Fällen zum starken Abfall der Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen.

### **3.5.2 Einfluss von 1-Heptanol, 1-Octanol und 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**

Um die Substanzen 1-Heptanol, 1-Octanol und 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid in weiteren Experimenten einsetzen zu können sollte untersucht werden, ob es in den reninsezernierenden Zellen durch die Blockade der Gap junctions mit diesen Substanzen zu einer Veränderung der Basiskalziumkonzentration kommt. Hierfür wurden zunächst Vorversuche unternommen, bei denen 1-Heptanol (5 mM) eingesetzt wurde. Die Zellen wurden zur Funktionskontrolle nach der Gabe von 1-Heptanol mit ANG II (3 nM) stimuliert. In beiden durchgeführten Experimenten konnte eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unter 1-Heptanol beobachtet werden (s. Abb. 35).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde 1-Octanol (5 mM) nach dem selben Schema untersucht. Hierbei zeigte sich unter 1-Octanol ein Abfall der Fluoreszenzintensitäten auf 0 (n = 3). Die Versuche wurden daraufhin eingestellt. Der Farbstoff Fura-2 wurde vermutlich aus den Zellen ausgewaschen.

Als Letzte der drei Substanzen wurde 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M) untersucht (s. Abb. 36). Die Substanz verursachte, wie 1-Heptanol, einen signifikanten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (n = 6, p = 0,011). Die Höhe dieses Anstiegs war vergleichbar mit der Höhe des Anstiegs unter Stimulation der Zellen mit ANG II (s. Tab. 18).

## Ergebnisse

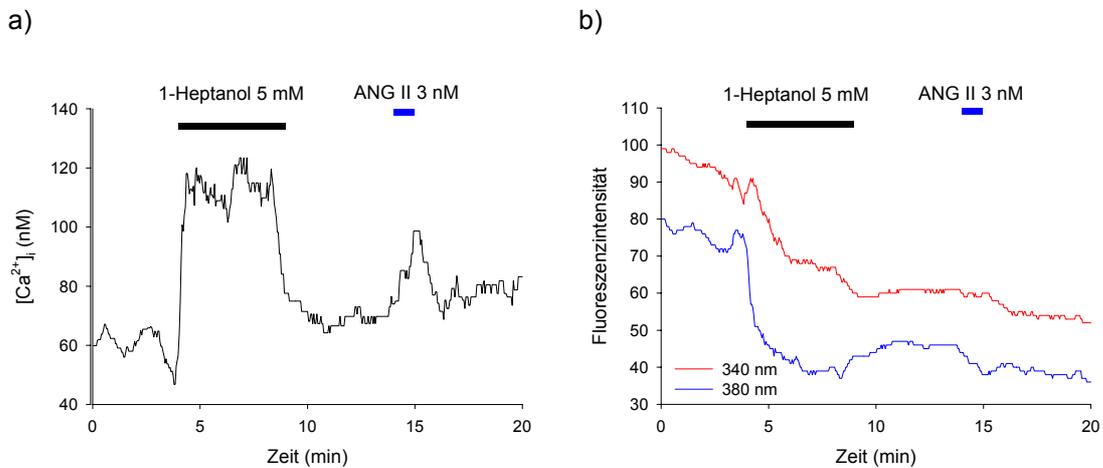


Abb. 35 Voruntersuchung mit 1-Heptanol (5 mM). Die anschließende Stimulation der Zellen mit ANG II (3 nM) diente als Funktionskontrolle.

a) Der Gap junctions Blocker 1-Heptanol verursachte eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen.

b) Der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten ließ eine Abnahme der Intensität bei beiden gemessenen Wellenlängen unter 1-Heptanol erkennen. Diese Abnahme war reversibel, die Fluoreszenzintensität stieg bei beiden Wellenlängen nach Absetzen des 1-Heptanol wieder an. Eine intrazelluläre Verdünnung des Farbstoffs durch Einströmen von Wasser in die Zelle und der damit verbundenen Zellschwellung könnte einen solchen Effekt verursacht haben.

	18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50 $\mu$ M)		ANG II (3 nM)	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal Stim <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Stim <sub>2</sub>
<b>Doppelstimulation</b> n = 6 (in nM)	27 $\pm$ 5	33 $\pm$ 8	39 $\pm$ 8	28 $\pm$ 6
<b>In % von Stim<sub>1</sub></b>	100	100	150 $\pm$ 14	85 $\pm$ 27

Tab. 18 Ergebnisse der Voruntersuchungen mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid. Die erste Stimulation (Stim<sub>1</sub>) erfolgte unter 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M), die zweite Stimulation (Stim<sub>2</sub>) wurde mit ANG II (3 nM) durchgeführt. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid verursachte einen signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (p = 0,011).

## Ergebnisse

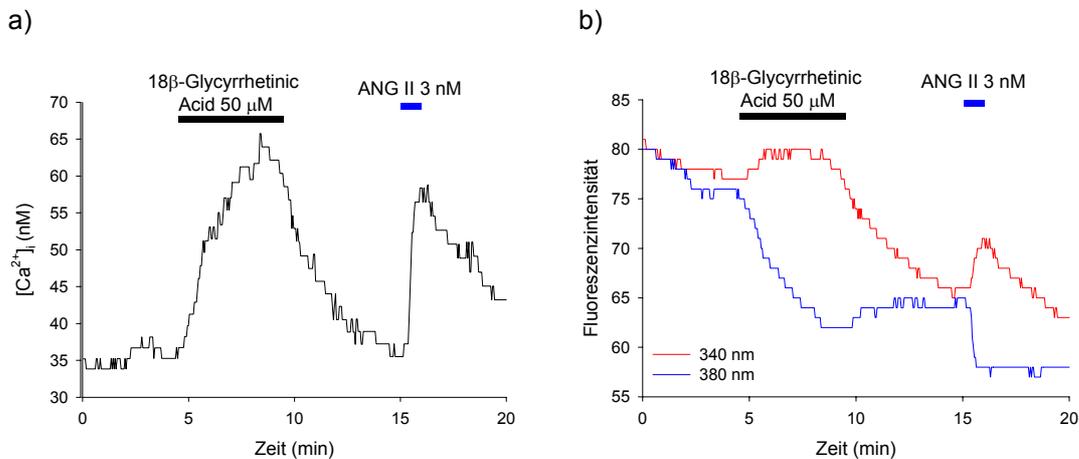


Abb. 36 Voruntersuchung des Gap junctions-Blocker 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid.

a) Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Gabe von 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M). Deutlich zu erkennen ist ein signifikanter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  unter 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid ( $p = 0.011$ ).

b) Verlauf der Fluoreszenzintensitäten der Wellenlängen 340 nm und 380 nm während des Doppelstimulationsprotokolls. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ist durch einen Anstieg der Intensität bei 340 nm und einen Abfall der Intensität bei 380 nm gemessen worden. Es wurde kein Abfall bei beiden Wellenlängen wie unter 1-Heptanol (5 mM) oder 1-Octanol (5 mM) gemessen.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit 1-Heptanol (5 mM) in ihrer Hohre vergleichbar mit der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimulation mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M) war. Hierzu wurde ein Doppelstimulationsprotokoll angewendet ( $n = 4$ ). Die erste Stimulation (Stim<sub>1</sub>) erfolgte durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid, die zweite Stimulation (Stim<sub>2</sub>) durch 1-Heptanol (s. Abb. 37 a). Die Hohre des Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$  war unter beiden Substanzen vergleichbar (s. Tab. 19).

Aus den genannten Ergebnissen geht hervor, dass durch die Blockade der Gap junctions mit zwei unterschiedlichen Substanzen (1-Heptanol, 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid) ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden konnte. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid verursachte in einer Konzentration von 50  $\mu$ M einen vergleichbaren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  wie 1-Heptanol in einer Konzentration von 5 mM. Dies könnte die von Yamamoto et al. (1998) beschriebene höhere Wirksamkeit der Substanz 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid im Vergleich zu 1-Heptanol

## Ergebnisse

	18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (5 $\mu$ M)		1-Heptanol (5 mM)	
	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal Stim <sub>1</sub>	$\Delta$ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Stim <sub>1</sub>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal Stim <sub>2</sub>	$\Delta$ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Stim <sub>2</sub>
<b>Doppelstimulation n = 4 (in nM)</b>	46 $\pm$ 8	100 $\pm$ 41	73 $\pm$ 20	45 $\pm$ 16
<b>in % von Stim<sub>1</sub></b>	100	100	158 $\pm$ 46	45 $\pm$ 35

Tab. 19 Ergebnisse des Doppelstimulationsprotokolls der Stimulation mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (Stim<sub>1</sub>) und 1-Heptanol (Stim<sub>2</sub>). 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid wurde in einer Konzentration von 50  $\mu$ M, 1-Heptanol in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Höhe der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> unter der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid und 1-Heptanol unterschied sich nicht.

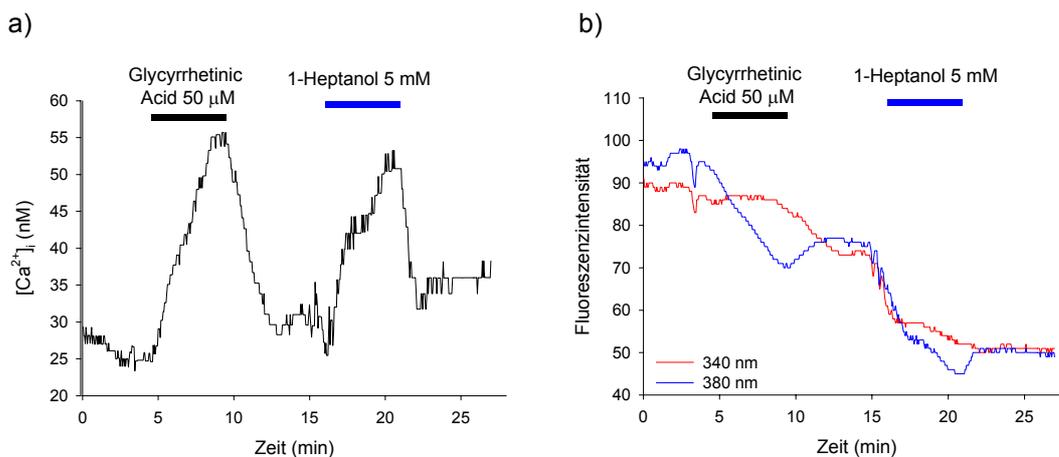


Abb. 37 Experimente mit der Stimulation der reninsezernierenden Zellen durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (Stim<sub>1</sub>) und 1-Heptanol (Stim<sub>2</sub>).

a) Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch die Stimulation mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M) und 1-Heptanol (5 mM). Zwischen Stim<sub>1</sub> und Stim<sub>2</sub> wurde kein signifikanter Unterschied im t-Test gefunden. Beide Peaks waren dadurch in ihrer Höhe vergleichbar.

b) Verlauf der Fluoreszenzintensitäten beider gemessener Wellenlängen (340 nm und 380 nm). Zu erkennen ist ein Anstieg der Intensität bei 340 nm und ein Abfall der Intensität bei 380 nm unter 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid. Unter 1-Heptanol dagegen kommt es zu einem Abfall der Intensitäten bei beiden Wellenlängen, was für eine intrazelluläre Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2, verursacht durch einen Einstrom von extrazellulärem Wasser, spricht.

## Ergebnisse

---

und 1-Octanol bestätigen. Bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wäre ein unterschiedlicher Wirkmechanismus beider Substanzen nicht auszuschließen, da sich der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten unter der Stimulation mit beiden Substanzen deutlich unterscheidet (s. Abb. 37 b).

Die Mechanismen der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  sind jedoch bisher unbekannt und sollten der Grund für weiterführende Experimente sein. Messungen mit 1-Octanol zeigten keinen Erfolg und wurden daher abgebrochen.

### **3.5.3 Veränderung des Membranpotentials der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere durch Stimulation mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid**

In Kap. 3.5.2 wurde gezeigt, dass unter dem Einfluss von 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid eine Erhöhung der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht wird. Durch eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid könnten intrazelluläre Signaltransduktionswege mit dem Resultat des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert werden. Eine Depolarisation glatter Muskelzellen der Schwanzarterie von Ratten durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid wurde von Tare et al. (2002) beschrieben. Ziel der durchgeführten Experimente war die Aufklärung der Frage, ob 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid einen Einfluss auf das Ruhemembranpotential von reninsezernierenden Zellen der Rattenniere ausübt. Die Zellen wurden zuerst mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M), dann mit ANG II (10 nM) stimuliert (s. Abb. 38), wobei ANG II als Funktionskontrolle diente.

Insgesamt wurden fünf Experimente mit der Messung des Membranpotentials durch DiBAC<sub>4</sub>(3) durchgeführt. Die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II diente als Beweis für die intakte Reaktionsfähigkeit der Zellen. Vier dieser Experimente reagierten unter ANG II mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität und wurden damit in die Auswertung genommen. In allen vier Experimenten konnte eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, d.h. eine Depolarisation unter 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M) nachgewiesen werden.

## Ergebnisse

Die Depolarisation der reninsezernierenden Zellen durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid könnte daher Anlass für die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  gewesen sein.

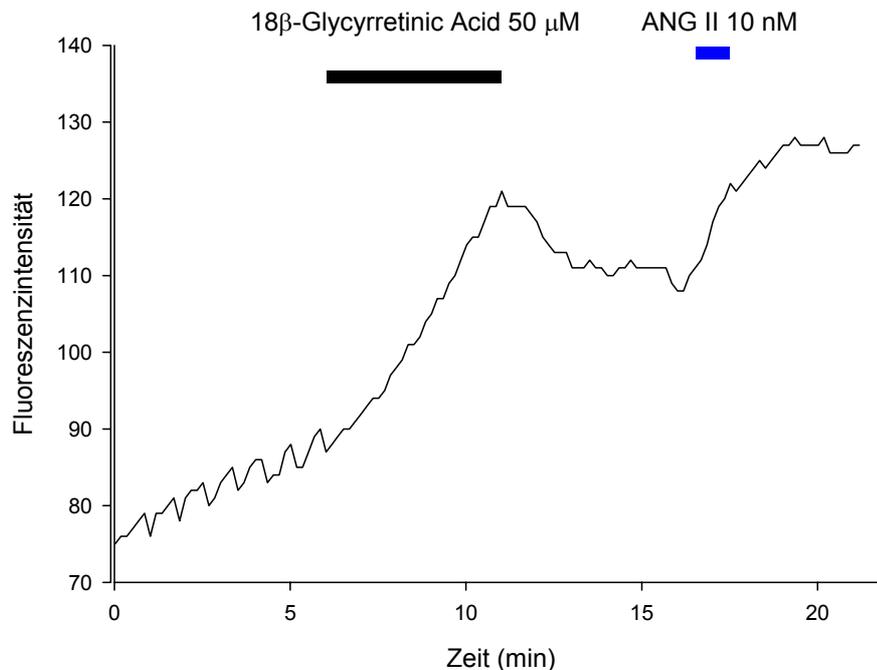


Abb. 38 zeigt das Doppelstimulationsprotokoll der Membranpotentialmessungen mit DiBAC<sub>4</sub>(3). Die erste Stimulation erfolgte durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M), die zweite Stimulation diente zum Nachweis der Reaktionsfähigkeit der Zellen und wurde mit ANG II (10 nM) durchgeführt. In allen vier Experimenten konnte eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen durch 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid gemessen werden.

### 3.5.4 Einfluss von 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid auf die $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen der Rattenniere in $Ca^{2+}$ -freiem Medium

In Kap. 3.5.2 konnte gezeigt werden, dass es durch die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit dem Gap junctions Blocker 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  kam. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre der Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum. In den durchgeführten Experimenten sollte die Rolle der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimulation mit

## Ergebnisse

---

	Einzelstimulation	
	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> basal	Δ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Stim
<b>Ca<sup>2+</sup>-frei</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	28 ± 5	11 ± 1
%	100	60 ± 14
<b>Kontrollen</b> <b>n = 5</b> <b>(in nM)</b>	35 ± 6	22 ± 5
%	100	67 ± 15

Tab. 20 Ergebnisse der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit 18β-Glycyrrhethinic Acid (50 μM) in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium und unter physiologischen Bedingungen. Die Zellen reagierten unverändert auch in Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer mit einer signifikanten Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auf die Stimulaion mit 18β-Glycyrrhethinic Acid (p < 0,001).

18β-Glycyrrhethinic Acid untersucht werden. Hierzu wurde die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit 18β-Glycyrrhethinic Acid in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium durchgeführt (n = 4). Wäre die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bei der Stimulation durch 18β-Glycyrrhethinic Acid ausschließlich auf extrazellulär vorhandenes Ca<sup>2+</sup> angewiesen, so dürfte in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium keine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> messbar sein. Die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurde im Ca<sup>2+</sup>-freien Puffer unverändert beobachtet (s. Tab. 20).

Aus den oben genannten Ergebnissen geht hervor, dass der Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in seiner Höhe durch die Stimulation mit dem Gap junctions Blocker 18β-Glycyrrhethinic Acid durch die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration unbeeinflusst blieb (s. Abb. 39). Eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch den Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum ist daher unwahrscheinlich.

## Ergebnisse

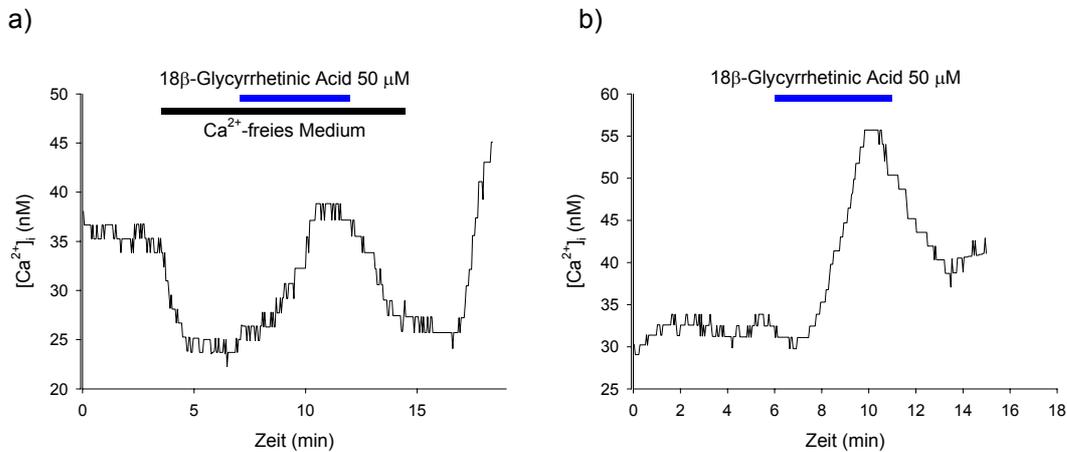


Abb. 39 Einzelstimulationsprotokoll der Experimente mit der Stimulation der reninsezernierenden Zellen durch 18β-Glycyrrhetic Acid (50 μM) in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium und unter physiologischen extrazellulären Bedingungen.

a) Versuchgruppe: Experiment mit der Stimulation durch 18β-Glycyrrhetic Acid in  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer. Eine signifikante Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  konnte nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ).

b) Kontrollgruppe: Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation mit 18β-Glycyrrhetic Acid. Die Zellen reagierten mit einem signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p = 0,011$ ).

### 3.5.5 Einfluss von 18β-Glycyrrhetic Acid auf den durch ANG II verursachten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in proximal und distal gelegenen reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole

Gap junctions besitzen eine fundamentale Rolle bei der interzellulären Koordination von Zellverbänden im Gewebe (Yao et al. (2002)). Alle Zellen des juxtaglomerulären Apparats sind mit Gap junctions konnektiert (Taugner und Hackenthal (1989), Ryan et al. (2003), Haefliger et al. (2004)). Yao et al. (2002) zeigten an Macula densa Zellen eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Welle, die durch Gap junctions innerhalb des Zellverbandes fortgeleitet wurde. Eine solche  $Ca^{2+}$ -Welle wäre ein möglicher Weg, die  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen zu steigern. In den Experimenten sollte aufgeklärt werden, ob die Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II (3 nM) im proximalen oder distalen Bereich der afferenten Arteriole unter Blockade der Gap junctions

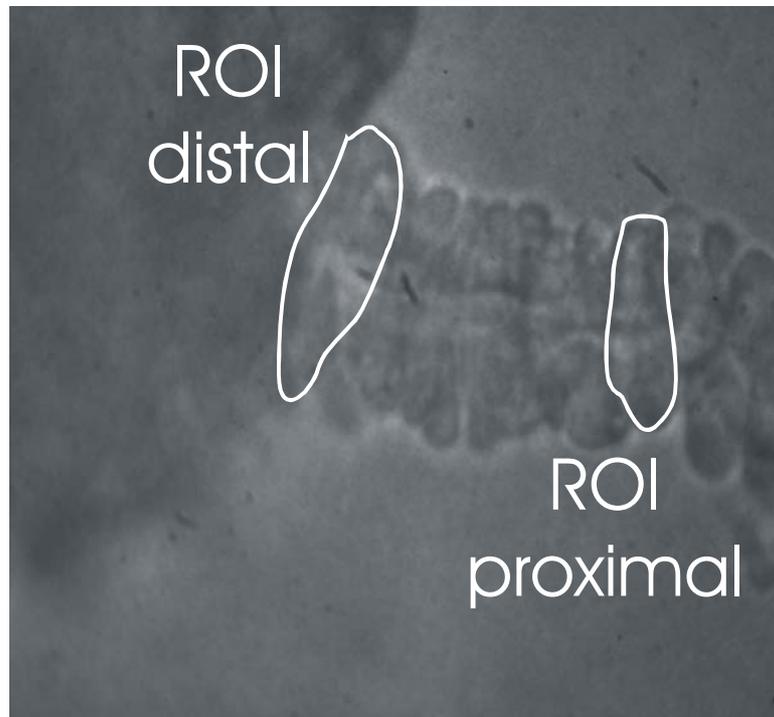


Abb. 40 Anordnung der proximalen und distalen ROI in den Experimenten. Der Abstand zwischen den beiden Regionen betrug mindestens fünf Zellreihen.

in ihrer Höhe Differenzen aufweist. In diesem Fall wäre ein signifikanter Strom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zwischen den Zellen nicht ausgeschlossen. Die gemessenen distalen Zellen befanden sich direkt am Eintritt der afferenten Arteriole in das Glomerulum. Zwischen distalen und proximalen Zellen wurde ein Abstand von fünf Zellen eingehalten, der nicht gemessen wurde. Danach begann der proximale Messbereich (s. Abb. 40). Die Experimente wurden in einem Doppelstimulationsprotokoll durchgeführt ( $n = 4$ ), die Stimulationszeit betrug jeweils eine Minute (s. Abb. 41, Tab. 21). Es bestand kein Unterschied in der Höhe des  $\text{Peak}_2$  zwischen proximalem und distalem Messbereich unter  $18\beta$ -Glycyrrhetic Acid ( $50 \mu\text{M}$ ). Die Blockade der Gap junctions scheint daher keinen Einfluss auf die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter ANG II im Zellverband zu haben.

## Ergebnisse

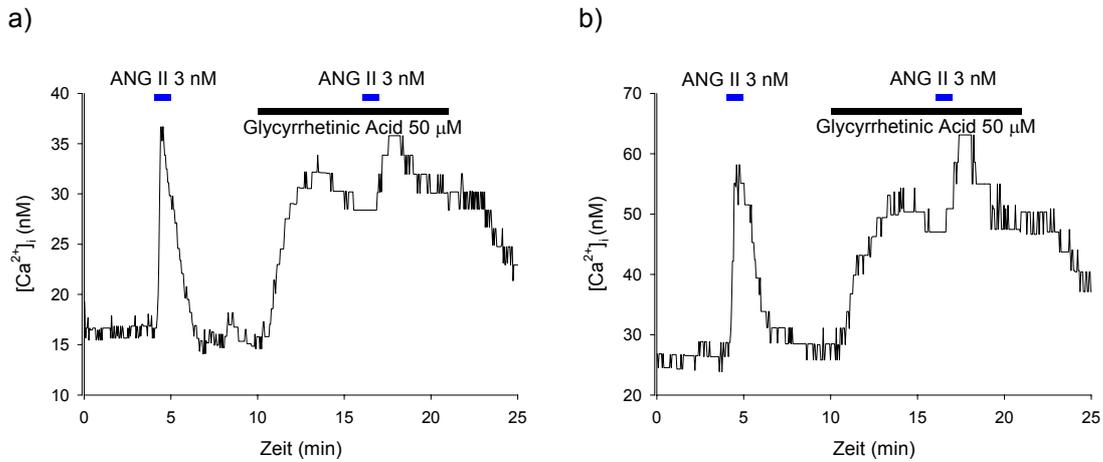


Abb. 41 Doppelstimulationsprotokoll mit der Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ANG II (3 nM). Dargestellt ist der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  von proximal (a) und distal (b) gelegenen Zellen.

a) Proximal gelegene ROI.

b) Distal gelegene ROI. Der Vergleich der zweiten Stimulation zwischen proximaler und distaler ROI ergab keinen signifikanten Unterschied.

	Standardpeak		Testpeak	
	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>1</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>1</sub>	$[Ca^{2+}]_i$ basal Peak <sub>2</sub>	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ Peak <sub>2</sub>
<b>proximal</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	22 ± 3	19 ± 3	46 ± 9	10 ± 2
<b>% Standardpeak</b>	100	100	202 ± 22	55 ± 9
<b>distal</b> <b>n = 4</b> <b>(in nM)</b>	26 ± 3	24 ± 5	47 ± 7	10 ± 3
<b>% Standardpeak</b>	100	100	175 ± 9	41 ± 3

Tab. 21 Ergebnisse aus dem Doppelstimulationsprotokoll. Stimuliert wurde jeweils mit ANG II (3 nM) für jeweils eine Minute. Peak<sub>2</sub> entstand unter Blockade der Gap junctions mit 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid (50  $\mu$ M). Ein signifikanter Unterschied zwischen der proximalen und der distalen Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Charakterisierung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht durch die Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II**

ANG II hemmt die Reninsekretion und verursacht eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Niere (Keeton und Campbell (1980)). Kurtz und Penner (1989) unterteilten die Reaktion der reninsezernierenden Zellen von Mäusenieren auf die Stimulation mit ANG II in zwei Phasen. Die erste Phase (Peakphase) wurde charakterisiert durch einen steilen Anstieg mit anschließendem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein über dem basalen Niveau gelegenen  $[Ca^{2+}]_i$ -Wert. Bei dieser zweiten Phase (Plateauphase) bleibt die  $[Ca^{2+}]_i$  relativ konstant um nach Absetzen des ANG II wieder auf basale Werte abzufallen. Die Plateauphase wurde in Abwesenheit von extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen nicht mehr beobachtet. Die Peakphase dagegen blieb bei diesen Verhältnissen unbeeinflusst. Die von Kurtz und Penner (1989) beobachtete zweiphasige Antwort der reninsezernierenden Zellen der Mäuseniere konnte - wie in Kap. 3.1 beschrieben - durch meine Experimente an reninsezernierenden Zellen von Rattennieren reproduziert werden. Kurtz und Penner (1989) beobachteten die Plateauphase ca. 60 Sekunden nach Beginn der Stimulation mit 100 nM ANG II. Purdy und Arendshorst (2001) konnten an präglomerulären glatten Gefäßmuskelnzellen der afferenten Arteriole der Rattenniere ebenfalls eine zweiphasige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  messen. Hier schloss sich die Plateauphase ca. 50 Sekunden nach Beginn der Stimulation mit 100 nM ANG II der Peakphase an, ein Ergebnis das durchaus übereinstimmend mit meinen Messungen ist, bei denen der Übergang der Peakphase in die Plateauphase ca. 60 Sekunden nach Beginn der Stimulation mit ANG II (3 nM) stattfand. Eine verlässliche Beurteilung der Plateauphase war daher nur bei einem Stimulationszeitraum von mehr als einer Minute möglich, weshalb ich zur Beobachtung der Plateauphase einen 5-Minuten-Stimulationszeitraum wählte.

---

#### **4.1.1 VOCC's in der Peak- und Plateauphase bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen während der Stimulation mit ANG II**

Bührle et al. (1986) sowie Kurtz und Penner (1989) konnten an reninsezernierenden Zellen der Mäuseniere bei Stimulation mit ANG II eine Depolarisation der Zellen beobachten. Durch diesen elektrophysiologischen Effekt ist eine Beteiligung von  $Ca_v$ -Kanälen bei der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II nicht auszuschließen, zumal Carmines et al. (1993) an der afferenten Arteriole der Kaninchenniere durch Nifedipin, einem Dihydropyridin, blockierbare VOCC's nachweisen konnten. Hansen et al. (2001) konnten an der afferenten Arteriole der Rattenniere die mRNA von  $Ca_v1.2$  nachweisen. Friis et al. (2003) konnten an juxtaglomerulären Zellen von Rattennieren VOCC's vom Typ  $Ca_v1.2$  nachweisen. Isradipin, ebenfalls ein Dihydropyridin, blockiert L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle (high voltage activated) vom Typ  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$  (Catterall et al. (2002)). Die  $IC_{50}$  von Isradipin beträgt für diese Kanäle zwischen 7 nM und 30 nM (Catterall et al. (2002)). Ich benutzte die Substanz in einer Konzentration von 100 nM und sollte so, im Falle der Anwesenheit der oben genannten Kanäle, zwischen 80 % und 99 % der Kanäle blockieren. Sowohl im Doppelstimulationsprotokoll als auch im Einzelstimulationsprotokoll konnte weder die Peakphase noch die Plateauphase während der Stimulation mit ANG II durch Isradipin signifikant beeinflusst werden (s. Kap. 3.2.1). Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse von Salomonsson et al. (1997), die keine Hinweise für einen Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Dihydropyridin-empfindliche L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle bei der Stimulation von glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Kaninchenniere mit 10 nM ANG II finden konnten. Kurtz et al. (2000) fanden in ihren Experimenten an Rattennieren keinen Effekt des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanalblockers Amlodipin auf die Reninsekretion. Laske-Ernst (2003) untersuchte die Peakphase der Stimulation reninsezernierender Zellen der Rattenniere mit ANG II (3 nM) und konnte in ihren Experimenten keinen  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch Isradipin-empfindliche  $Ca^{2+}$ -Kanäle finden. Diesen

## Diskussion

---

Resultaten stehen bisher mehrere Arbeiten entgegen. Helou und Marchetti (1997) beobachteten bei ihren Experimenten eine Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs auf 1 nM ANG II um ca. 40 % unter Blockade von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch 1  $\mu\text{M}$  Nifedipin. Iversen und Arendshorst (1998) gelang es, die durch 10 nM ANG II verursachte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Nifedipin (10 nM) wieder auf basale Werte zu senken. Loutzenhiser und Loutzenhiser (2000) fanden eine verminderte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf ANG II (10 nM) unter Nifedipin (100 nM). Die Peakphase wurde hier um 60 % verkleinert, die Plateauphase wurde um 90 % verkleinert. Purdy und Arendshorst (2001) zeigten eine signifikante Verminderung der Höhe der Plateauphase unter Stimulation mit ANG II bei gleichzeitiger Perfusion von Nifedipin (100  $\mu\text{M}$ ). Alle diese Experimente fanden - entgegen meinen Experimenten - an glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Rattenniere statt. Eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen wäre durch die Arbeit von Scholz und Kurtz (1995) zu erklären. Sie konnten im proximalen Bereich der afferenten Arteriole der Mäuseniere (über 100  $\mu\text{m}$  vom Glomerulum entfernt) einen durch VOCC's verursachten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die glatten Muskelzellen messen, im distalen Bereich der afferenten Arteriole, der die reninsezernierenden Zellen beinhaltet, fanden sie dagegen diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom unter ANG II Stimulation nicht mehr. Dadurch wären Unterschiede in den Ergebnissen der oben genannten Experimente von der Lokalisation der Messregion abhängig, was Hinweise auf eine morphologische Adaptation durch die NaCl-arme Diät gibt. Laske-Ernst (2003) beobachtete weiterhin eine verkleinerte Peakphase sowie die Aufhebung der Plateauphase bei der Stimulation juxtaglomerulärer Zellen mit ANG II (3 nM) in Abwesenheit von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dies wäre ein Hinweis auf einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellen in beiden Phasen oder auf eine Reduktion der Speicherentleerung durch eine verminderte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei extrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium. Durch meine Resultate und durch die Erkenntnisse aus den Ergebnissen von Laske-Ernst (2003) kommt dieser Einstrom jedoch nicht durch Isradipin-empfindliche L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zustande. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

## Diskussion

---

über eine unspezifische Kationenleitfähigkeit, wie Kurtz und Penner (1989) dies vermuteten. Die weiterhin persistierende Peakphase unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Stimulation mit ANG II entsteht über den  $\text{IP}_3$ -Signaltransduktionsweg des  $\text{AT}_1$ -Rezeptors, der zur Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt (Kurtz (1989), Timmermans et al. (1993)).

### **4.1.2 SOCC's in der Peak- und Plateauphase bei der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II**

Wie in Kap. 1.3.1.1.2.3 beschrieben, gehören SOCC's zur Familie der TRP-Kanäle (transient receptor potential). In der Rattenniere wurden bisher drei Formen dieser Kanäle nachgewiesen: TRPC-1, TRPC-3 und TRPC-6 (Takenaka et al. (2002)). TRPC-1 ist ein relativ unselektiver Kationenkanal. Dieser führt zu einem durch  $\text{IP}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen. TRPC-1 ist durch die beiden Substanzen 2-APB und Gadolinium blockierbar. TRPC-3 und TRPC-6 sind durch DAG und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktivierbare, nicht-selektive Kationenkanäle und können so zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führen. Zur Blockade von TRPC-3 ist bisher nur 2-APB bekannt (Übersicht in Catterall et al. (2002)). Hinweise zur Einflussnahme solcher SOCC's auf die Regulation der Reninsekretion in reninsezernierenden Zellen wurden bisher zahlreich in der Literatur beschrieben. ANG II hemmt die Reninsekretion in diesen Zellen über den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor (Chatziantoniou und Arendshorst (1993), Chatziantoniou et al. (1994)). Dieser Rezeptor verursacht eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der PLC mit der intrazellulären Bildung von  $\text{IP}_3$  (Hackenthal et al. (1985), Sasaki et al. (1991), Murphy et al. (1991a)).  $\text{IP}_3$  bindet am endoplasmatischen Retikulum an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor und führt dadurch zur Entleerung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (Übersicht in Timmermans et al. (1993)). Die Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt zur Aktivierung von SOCC's. Dies wurde von Large und Wang (1996), Fellner und Arendshorst (1999) sowie Schulz und Krause (2004)

## Diskussion

---

an glatten Gefäßmuskelzellen bereits nachgewiesen. In meinen Experimenten wurden die beiden Substanzen 2-APB und Gadolinium zur Blockade von SOCC's eingesetzt. Die Peakphase bei der Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II (10 nM) wurde in meinen Messungen weder durch 2-APB (30 µM) noch durch Gadolinium (50 µM) signifikant beeinflusst. Laske-Ernst (2003) stimulierte juxtaglomeruläre Zellen der Rattenniere mit 3 nM ANG II. Entgegen meinen Resultaten beobachtete sie eine signifikant verminderte Peakphase unter Gadolinium (50 µM). 2-APB (30 µM) hatte dagegen auf diese Phase keinen Einfluss. Die Plateauphase war in meinen Experimenten unter beiden Substanzen vollständig aufgehoben. Ein Resultat, das mit den Versuchen von Schweda et al. (2000) erklärbar ist. Sie beobachteten bei der Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher mit Thapsigargin eine Hemmung der Reninsekretion an isolierten, perfundierten Rattennieren und zeigten gleichzeitig, dass für den inhibitorischen Effekt extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionen obligat waren. Gadolinium hatte bei ihren Versuchen jedoch keinen Einfluss auf die Reninsekretionsrate. Ma et al. (2000) zeigte an humanen, embryonalen Nierenzellen ebenfalls die Existenz von SOCC's. Sie beobachteten eine Hemmung der  $IP_3$ -vermittelten Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern durch Blockade des  $IP_3$ -Rezeptors am endoplasmatischen Retikulum und eine Hemmung der SOCC's durch die Anwendung von 2-APB (75 µM). In der von mir verwendeten Konzentration (30 µM) muss davon ausgegangen werden, dass 2-APB keinen Einfluss auf den  $IP_3$ -Rezeptor hatte, hierfür wären wesentlich höhere Konzentrationen nötig (Catterall et al. (2002)). Die Peakphase, die durch die Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern gebildet wird, wurde daher durch 2-APB nicht beeinflusst. Fellner und Arendshorst (2002) beobachteten an der afferenten Arteriole der Rattenniere durch 2-APB und Gadolinium blockierbare SOCC's im  $IP_3$ -vermittelten Signaltransduktionsweg des Vasopressin über den  $V_1$ -Rezeptor. Ferner wiesen sie eine Funktion der SOCC's bei der Speicherentleerung durch Ryanodin nach. SOCC's waren somit nicht nur durch den  $IP_3$ -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulum aktivierbar, sie wurden auch durch den

## Diskussion

---

Ryanodin-Rezeptor aktiviert. Im Gegensatz zu meinen Resultaten konnten durch Loutzenhiser und Loutzenhiser (2000) SOCC's nur an der efferenten, jedoch nicht an der afferenten Arteriole der Rattenniere nachgewiesen werden. Purdy und Arendshorst (2001) diskutierten in ihren Experimenten an der afferenten Arteriole der Rattenniere die Peakphase als Zeichen der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Die sich daran anschließende Plateauphase konnte von ihnen durch Nifedipin blockiert werden. Sie vermuteten hinter der Plateauphase einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch VOCC's, was durch meine Experimente nicht bestätigt werden konnte (s. Kap. 4.1.1). Sinn der Öffnung von SOCC's durch die Speicherentleerung könnte die Wiederauffüllung der entleerten Speicher sein (McFadzean und Gibson (2002), Schweda et al. (2000)). Die Art und Weise der Signalübertragung zwischen den Speichern und den SOCC's ist bislang noch ungeklärt (s. Kap. 1.3.1.1.2.3).

### **4.1.3 Einfluss der Depolarisation der Zellen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Stimulation mit ANG II**

Eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen führt zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Diese Erhöhung ist obligat auf das Vorliegen von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angewiesen (Laske-Ernst (2003)). Rauch (2000) konnte den durch die Depolarisation verursachten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die reninsezernierenden Zellen der Rattenniere durch Isradipin hemmen. Dieser Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheint durch  $\text{Ca}_V$ -Kanäle verursacht zu sein. Auch in meinen Experimenten des Kap. 3.2.3 konnte eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen mit 60 mM K-HEPES-PS und 142 mM K-HEPES-PS erreicht werden. Bei der Perfusion dieser Lösungen kam es zunächst zu einem steilen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die daraufhin gegenüber den basalen Werten auf immer noch erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte abfielen um konstant, bis zum Absetzen der Lösungen, auf diesem Level zu verbleiben. Diese Beobachtung könnte durch mehrere Mechanismen erklärt werden. Ein Mechanismus wäre die von Soldatov (2003) an  $\text{Ca}_V1.2$  L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

## Diskussion

---

beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex-abhängige Inaktivierung der Kanäle. Hierbei kommt es zur Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle. Soldatov (2003) konnte weiterhin beobachten, dass  $\text{Ca}_v1.2$  L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle innerhalb von Millisekunden spannungsabhängig inaktiviert werden. Beide Mechanismen würden den raschen Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei andauernder Depolarisation erklären, zumal Hansen et al. (2001) Untereinheiten von  $\text{Ca}_v1.2$  L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere bereits entdeckten. Eine weitere, jedoch nicht bewiesene Möglichkeit wäre eine durch die überschießende Steigerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bedingte, verzögerte Aktivierung des zellmembranständig gelegenen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der juxtaglomerulären Zellen sowie der damit verbundenen Verminderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eine andere Erklärung für den steilen Anstieg und den steilen Abfall wäre der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte- $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (CICR) in die Zellen, bei dem es zur Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen am endoplasmatischen Retikulum und damit zur Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern kommt (Fabiato (1983)). In den von mir in Kap. 3.2.3.1 und Kap. 3.2.3.2 durchgeführten Experimenten konnte ich davon ausgehen, dass vor erneuter Stimulation mit ANG II die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen, entweder bereits im geöffneten oder in einem inaktivierten Zustand waren. Da intra- wie extrazellulär die  $\text{K}^+$ -Konzentrationen ausgeglichen waren, war keine weitere Veränderung des Membranpotentials durch ANG II mehr möglich (zumindest bei der Depolarisation mit 142 mM KCl). Damit wird ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch VOCC's bei der ANG II-Stimulation unter Depolarisation mit hohen extrazellulären  $\text{K}^+$ -Ionenkonzentrationen unwahrscheinlich. Die Peakphase der Reaktion der juxtaglomerulären Zellen auf die Stimulation mit ANG II wurde in meinen Experimenten durch die Depolarisation nicht beeinflusst. Daher gibt es für einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch VOCC's bei der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter ANG II - wie in Kap. 4.1.1 bereits beschrieben - auch in dieser Experimentserie keine Hinweise. Diese Resultate bestätigen die von

## Diskussion

---

Hackenthal et al. (1985), Sasaki et al. (1991) sowie Murphy et al. (1991a) beschriebene IP<sub>3</sub>-vermittelte Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher bei der Stimulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors mit ANG II an den juxtaglomerulären Zellen. In Kap. 3.2.3.2 zeigte sich eine höchst signifikante Verkleinerung der Plateauphase während der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II unter depolarisierten Verhältnissen. Die Öffnung der SOCC's durch Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung wurde für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der zur Entstehung der Plateauphase führt, verantwortlich gemacht (s. Kap. 4.1.2). Die Regulation der Aktivität von SOCC's geschieht vorwiegend durch den Füllungszustand der Ca<sup>2+</sup>-Speicher, jedoch spielt die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hier ebenfalls eine Rolle (Übersicht in Parekh und Penner (1997), Liu und Ambudkar (2001)). Im depolarisierten Zustand mit erhöhter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sind die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch die erhöhte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und die Aktivität der SERCA reichlich gefüllt. Daher wäre ein Ausbleiben der Öffnung der SOCC's mit dem Ausbleiben der Plateauphase unter depolarisierten Verhältnissen durch den hohen Füllungszustand der Ca<sup>2+</sup>-Speicher sowie durch die erhöhte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu erklären. Diese Hypothese wurde mit den in Kap. 3.2.3.3 durchgeführten Experimenten untersucht. Hierbei wurde die SERCA der depolarisierten juxtaglomerulären Zellen mittels CPA blockiert. Dadurch sollte eine starke Beladung der Ca<sup>2+</sup>-Speicher verhindert werden, was anschließend wieder zum Auftreten der Plateauphase führen könnte. In den Experimenten, unter SERCA-Inhibition mit CPA, wurde jedoch ebenfalls keine Plateauphase beobachtet. Die Gründe für diese Beobachtung sind bislang unklar und könnten auch multifaktoriell bedingt sein.

## **4.2 Die Rolle der PKA und des Epac bei dem Einfluss von cAMP auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in reninsezernierenden Zellen**

Das membranständige Enzym Adenylatzyklase (AC) bildet intrazellulär aus ATP den second messenger cAMP. Durch cAMP wird in der Zelle die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, was zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung weiterer

## Diskussion

---

Funktionsproteine führt (s. Kap. 1.3.1.2). Ein weiterer, unabhängig von der PKA arbeitender Aktionsmechanismus des cAMP ist die Aktivierung des Epac (cAMP-regulierter Guaninnukleotid Austauschfaktor), welcher wiederum G-Proteine aktiviert (Kang et al. (2003)). cAMP wird durch das Enzym Phosphodiesterase (PDE) - wovon mehrere Isoformen in den juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere bereits beschrieben wurden (Friis et al. (2002)) - zu AMP abgebaut und dadurch inaktiviert. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Stimulation der Reninsekretion (s. Kap. 1.3.1.2, Kurtz (1989), Übersicht in Keeton und Campbell (1980)). Gemäß dem von Churchill (1995) bezeichneten „Calciumparadoxon“ würde man eine Verminderung der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie sie von glatten Muskelzellen bereits bekannt war, unter gesteigerten intrazellulären cAMP-Werten vermuten (Keeton und Campbell (1980)). Keeton und Campbell (1980) lieferten bereits eine Übersicht über mehrere Arbeiten, die einen deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration unter  $\beta$ -Adrenozeptorstimulation mit Isoprenalin beschrieben. Laske-Ernst (2003) konnte durch die Stimulation der juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere mit Isoprenalin (1  $\mu$ M) in Kombination mit dem PDE-Hemmer IBMX (100  $\mu$ M) eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auslösen. Dieser Effekt war durch den  $\beta$ -Blocker Propranolol aufzuheben und daher über  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelt. Ich beobachtete unter Perfusion von ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100  $\mu$ M), wie Laske-Ernst (2003), eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen 10 nM und 20 nM, was ca. 90 % der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht durch die Stimulation der Zellen mit 3 nM ANG II entsprach. Weiterhin konnte Laske-Ernst (2003) eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Perfusion von db cAMP, einem membrangängigen Analogon des cAMP, und durch Forskolin, einem Adenylatcyclase-Aktivator, erreichen. Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch db cAMP in Kombination mit IBMX konnte in den Experimenten des Kap 3.4.3 bestätigt werden. Diese Resultate sprechen deutlich für eine Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  bei der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Bisher wurde eine Verminderung der  $Ca^{2+}$ -Permeabilität der Zellmembran sowie eine Erhöhung der Aktivität der  $Ca^{2+}$ -ATPase und des  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers der juxtaglomerulären Zellen durch die Erhöhung der

## Diskussion

---

intrazellulären cAMP-Konzentration beobachtet, was zu der vermuteten bzw. vorausgesagten Verminderung der  $[Ca^{2+}]_i$  führen sollte (Übersicht in Kurtz (1989) sowie in Churchill (1995)). Eine mögliche Erklärung für die von Laske-Ernst (2003) und mir gemessenen Resultate lieferten die Messungen von Wu et al. (1999). Sie beobachteten an kultivierten Astrozyten von Ratten eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  während der Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Diese Steigerung wurde durch die Öffnung von SOCC's verursacht. Daher wäre ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch SOCC's eine denkbare Option. Diese Hypothese wurde durch Laske-Ernst (2003) weiter untersucht. Sie konnte durch Entfernung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen eine um ca. 90 % verminderte Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100  $\mu$ M) messen, was einen Hinweis auf eine extrazelluläre und intrazelluläre Komponente der Reaktion gibt, jedoch mit dem Überwiegen der extrazellulären Komponente. Des Weiteren wurde die Reaktion der juxtaglomerulären Zellen auf diese Stimulation durch die beiden SOCC's-Blocker 2-APB und Gadolinium gänzlich ausgeschaltet. Dadurch stellen die SOCC's vermutlich den hauptsächlichen Weg für die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in juxtaglomerulären Zellen bei der Erhöhung der cAMP-Konzentration durch  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten dar. Friis et al. (2002) konnten an juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere durch die Hemmung der PDE3 mit Trequinsin und der damit verbundenen Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Stimulation der Reninsekretion auslösen. Diese Stimulation wurde durch die Hemmung der PKA mit Rp-8-CPT-AMPS aufgehoben, sodass sie Grund zur Annahme hatten, dass die PKA bei der Stimulation der Reninsekretion durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine wesentliche Rolle spielt. Eine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die PKA wurde von Laske-Ernst (2003) untersucht. Sie hatte die PKA mit der Substanz H89 gehemmt. Sie konnte durch H89 (10  $\mu$ M) jedoch keine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Stimulation mit ISO/IBMX (1  $\mu$ M/100  $\mu$ M) messen. Jedoch wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  in den juxtaglomerulären Zellen schon durch den Einfluss des H89 erhöht. Ich untersuchte diese Resultate mit zwei PKA-

## Diskussion

---

Inhibitoren, H89 und KT 5720 (s. Kap. 3.4.2). Entgegen den Ergebnissen von Laske-Ernst (2003) konnte ich in meinen Messungen unter Verwendung H89 (1  $\mu\text{M}$ ) und KT 5720 (1  $\mu\text{M}$ ) keine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beobachten. Die in meinen Experimenten verwendete Konzentration des H89 wurde jedoch im Unterschied zu Laske-Ernst (2003) 10-fach verdünnt eingesetzt um den Effekt auf die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu vermindern. Dies wäre ein möglicher Grund für die fehlende Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter H89. Die Wirksamkeit von H89 war bei diesen Konzentrationen jedoch noch gegeben, Chijiwa et al. (1990) beschrieben einen  $K_i$ -Wert von  $48 \pm 8$  nM für H89. Die Antwort der reninsezernierenden Zellen auf die Stimulation mit ISO/IBMX (1  $\mu\text{M}/100$   $\mu\text{M}$ ) wurde durch beide PKA-Inhibitoren - gemäß den Vorergebnissen von Laske-Ernst (2003) - nicht beeinflusst. Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration scheint daher nicht auf eine Aktivierung der PKA angewiesen zu sein, sondern auf einem anderen Weg die Öffnung von SOCC's zu bewirken. Weiter wurde von mir die Reaktion der juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere auf den Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP gemessen. Die Zellen reagierten nicht mit einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wie dies von Kang et al. (2003) an humanen  $\beta$ -Zellen des Pankreas beobachtet wurden. Sie machten für ihre Beobachtung die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher verantwortlich. Diesen Resultaten entsprechend fand ich keinen Anhaltspunkt für eine Beteiligung der PKA oder des Epac bei der Steigerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter den durchgeführten cAMP-erhöhenden Maßnahmen. Aus meinen Ergebnissen geht hervor, dass eine Steigerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  trotz der gleichzeitigen Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere möglich ist. Dies spricht gegen die Theorie des Calciumparadoxons, da cAMP ein sekretionsfördernder Botenstoff in der Regulation der Reninsekretion darstellt (s. Kap. 1.3.1.2.). Die Regulation der Reninsekretion durch cAMP scheint demnach nicht explizit abhängig von der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu sein. Für diese Hypothese sprechen auch die Ergebnisse von Laske-Ernst (2003) sowie Kurtz und Penner (1989), die keine Veränderung der Ruhecalciumkonzentration in reninsezernierenden Zellen der Mäuseniere unter

Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration finden konnten. Dies würde für eine weitestgehende Unabhängigkeit beider Signaltransduktionswege sprechen.

### **4.3 Osmotische Einflüsse auf die $[Ca^{2+}]_i$ der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere**

Die Niere ist eines der wichtigsten Organe in der Regulation der extrazellulären Osmolarität des Organismus (Churchill (1995)). Ein wichtiger Mechanismus hierfür ist die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen. Sie wird direkt durch die extrazelluläre Osmolarität beeinflusst (Übersichten in Kurtz (1989) und Skøtt (1988)). Bei erhöhter extrazellulärer Osmolarität kommt es zur Verminderung der Reninsekretionsrate und vice versa (Frederiksen et al. (1975), Skøtt (1986b), Skøtt (1988), Jensen und Skøtt (1993)). Skøtt (1986b), Skøtt (1988) sowie Jensen und Skøtt (1993) machten für diese Reaktionen der reninsezernierenden Zellen Zellschwellungs- und Zellschrumpfungsvorgänge verantwortlich. Untersuchungen bezüglich einer Verbindung zwischen dem Calciumparadoxon und der extrazellulären Osmolarität wurden bisher noch nicht unternommen und wurden daher in meiner Arbeit behandelt (s. Kap. 3.3). Unter extrazellulär hypoosmolaren Verhältnissen würde man mit einer Erhöhung der Reninsekretionsrate und damit, gemäß dem Calciumparadoxon, mit einer Verminderung der  $[Ca^{2+}]_i$  rechnen. Tatsächlich reagierten die reninsezernierenden Zellen in meinen Experimenten vermutlich mit einer Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Steigerung war in ihrer Höhe vergleichbar mit der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  während der Stimulation der Zellen mit 3 nM ANG II. Auffallend bei diesen Experimenten war die simultane Reduktion der Fluoreszenzintensität bei beiden gemessenen Wellenlängen in der Phase der herabgesetzten extrazellulären Osmolarität (s. Abb. 42). Über das Ratio der Fluoreszenzintensitäten wurde nach der Formel von Grynkiewicz eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  errechnet. Ob es sich dabei um eine reale Erhöhung handelt, blieb nicht abschließend geklärt. Es kam durch die Hypoosmolarität der

## Diskussion

---

extrazellulären Lösung zu einem Einstrom von Wasser in die Zellen mit dem Resultat der Verdünnung des intrazellulär angereicherten Farbstoffs Fura-2. Diese Beobachtung würde die in den Arbeiten von Frederiksen et al. (1975), Skøtt (1986a), Skøtt (1988) sowie Jensen und Skøtt (1993) beschriebene Zellschwellung bestätigen. Extrazelluläre hyperosmolare Verhältnisse bewirken eine Verminderung der Reninsekretion. Gemäß dem Calciumparadoxon würde man eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erwarten. Extrazellulär hyperosmolare Verhältnisse führten in meinen Experimenten zum Anstieg der Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen (s. Abb. 42). Dies könnte Ausdruck eines Wasserausstroms, verbunden mit einer Zellschrumpfung und der Konzentrierung des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffs, sein. Dabei konnte durch das Ratio keine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Grynkiewicz berechnet werden (s. Kap. 3.3.2). Diese Resultate sprechen dafür, dass die Regulation der Reninsekretion durch die Osmolarität des extrazellulären Mediums nicht über die  $[Ca^{2+}]_i$  gesteuert wird. Wie die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter extrazellulär hypoosmolaren Verhältnissen zustande kommt, ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die osmotische Schwellung der Zelle, die zur Dehnung der Zellmembran führt. Dabei kann eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch unterschiedliche Mechanismen entstehen (Viana et al. (2001)). Prinzipiell wäre zwischen der Entleerung intrazellulärer Speicher und dem Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum zu unterscheiden. Ein Einstrom von extrazellulär ist prinzipiell durch die Aktivierung von stretch-aktivierten Ionenkanälen oder VOCC's möglich. Viana et al. (2001) führten dazu Experimente an kultivierten Trigemini-neuronen der Maus durch, die - wie in meinen Experimenten an reninsezernierenden Zellen beobachtet - auf eine verminderte extrazelluläre Osmolarität mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  reagierten. Sie konnten mit Gadolinium, einem Blocker für stretch-aktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle, die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter hypoosmolarer Perfusion signifikant vermindern. Weiterhin konnten sie die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Blockade von VOCC's hemmen. Eine  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch Speicherentleerung mit anschließender Öffnung von SOCC's konnte in diesem Zusammenhang nicht beobachtet

## Diskussion

werden. Clapham et al. (2003) ordneten die stretch-aktivierten Ionenkanäle der Familie der TRP-Kanäle zu. Da Gadolinium einige der TRP-Kanäle blockieren kann, wurde diese Substanz von mir zur Blockierung von stretch-aktivierten

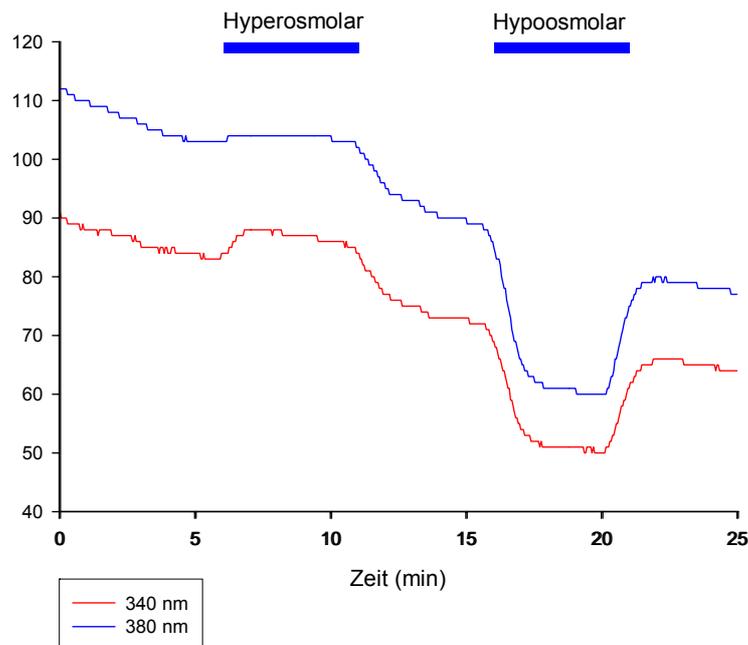


Abb. 42 Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Behandlung der juxtaglomerulären Zellen mit unterschiedlichen extrazellulären Osmolaritäten. Unter hyperosmolaren Bedingungen konnte eine Intensitätszunahme bei beiden Wellenlängen beobachtet werden. Unter hypoosmolaren Verhältnissen kam es zum Abfall der Fluoreszenzintensitäten. Diese Beobachtung hat ihren Ursprung vermutlich in einer Veränderung des Zellvolumens und der damit verbundenen Verdünnung bzw. Konzentrierung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2.

Ionenkanälen eingesetzt, allerdings nicht in der von Viana et al. (2001) verwendeten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , sondern in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Diese Konzentration hatte sich schon in den Versuchen des Kap. 3.2.2.1 als sehr wirksam gegenüber TRP-Kanälen (SOCC's) erwiesen. Entgegen den Experimenten von Viana et al. (2001) zeigte Gadolinium keinen Einfluss auf die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eventuell wären hierfür höhere Konzentrationen des Gadolinium nötig oder es sind an der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Rattenniere unter extrazellulär hypoosmolaren Verhältnissen keine Gadolinium-empfindlichen TRP-Kanäle

## Diskussion

---

(stretch-aktivierte Kanäle bzw. SOCC's) beteiligt. Weitere Möglichkeiten der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wären einerseits der Weg über die von Fray (1976) an der isolierten perfundierten Rattenniere und andererseits die von Viana et al. (2001) an kultivierten Trigemini-neuronen der Maus beschriebene Depolarisation der Zellen mit anschließendem Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch VOCC's. Eine solche Depolarisation wäre durch die Öffnung unspezifischer Kationenkanäle (stretch-aktivierte Kanäle) ((Carey et al. (1997), Kirber et al. (1988), Wu und Davis (2001), Wu et al. (2003)), durch die Öffnung von  $Ca^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen (Jensen et al. (1997), Nabel et al. (1999)) sowie durch die Öffnung von volumenaktivierten Chloridkanälen, die nahezu in allen Zellen vorhanden sind (Jentsch et al. (2002)), zu erklären. VOCC's wurden im Zusammenhang mit osmotischen Reizen bereits von Ichihara et al. (1999) explizit an reninsezernierenden Zellen der Rattenniere nachgewiesen. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wären weitere Experimente mit VOCC's-Blockern (z.B. Verapamil, Nifedipin, Isradipin), Inhibitoren für  $Ca^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle (z. B. IAA-94, Niflumic Acid), Inhibitoren für volumenaktivierte Chloridkanäle (z.B. Tamoxifen, NPPB) sowie Experimente mit extrazellulär  $Ca^{2+}$ -freier Lösung von Interesse.

#### **4.4 Die Rolle der Gap junctions bei der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II**

Interzelluläre Signale im Gewebe können mittels Gap junctions vermittelt werden (Yao et al. (2002)). Gap junctions sind kleine Kanäle, die Zellen miteinander verbinden und aus Untereinheiten, den Connexinen, aufgebaut sind (Taugner und Hackenthal (1989), Brink (1998)). Bisher wurden Gap junctions an allen Zellen des juxtaglomerulären Apparates nachgewiesen (Taugner und Hackenthal (1989), Übersicht in Hackenthal et al. (1990)). Yao et al. (2002) konnten eine interzelluläre  $Ca^{2+}$ -Welle im juxtaglomerulären Apparat der Rattenniere provozieren. Mit Heptanol war es ihnen möglich, das Auftreten

## Diskussion

---

dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle zu verhindern. Eine Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheint daher durch diese Kanäle gegeben zu sein. Ryan et al. (2003) konnten die mRNA der Connexine 37, 40, 43 und 45 durch RT-PCR in As4.1-Zellen, einer reninsezernierenden Zelllinie, nachweisen. Sie benutzten zur Blockade dieser Kanäle die Substanz Octanol. Haefliger et al. (2004) bestätigten den Nachweis der Connexine 37, 40, 43 und 45 in der Rattenniere und fanden zusätzlich die Connexine 26, 30, 31, 32 und 46. Sie schrieben vor allem dem Connexin 40 eine bedeutende Rolle in der Regulation der Reninsekretion zu. Yamamoto et al. (1998) verglichen die Wirkstärke der Substanzen  $18\beta$ -Glycyrrhetic Acid, Heptanol und Octanol.  $18\beta$ -Glycyrrhetic Acid stellte sich in ihren Experimenten an glatten Muskelzellen der Schweinemesenterialarterie als effektivster Hemmstoff für Gap junctions heraus. Aus diesem Grund wurden die drei Substanzen in meinen Versuchen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Da bislang keine Daten zur Fluoreszenzinterferenz dieser Substanzen mit dem Farbstoff Fura-2 vorlagen, sollte dies zunächst ausgetestet werden. Alle drei Substanzen verhielten sich bezüglich des Fluoreszenzverhaltens des Fura-2 völlig neutral, sodass keine Interaktion mit diesem Fluoreszenzfarbstoff in meinen Experimenten vorlag (s. Kap. 3.5.1). 1-Heptanol verursachte eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten verringerten sich unter 1-Heptanol bei beiden gemessenen Wellenlängen simultan, was nach Absetzen der Substanz mäßig reversibel war. Ein teilweises Auswaschen des Farbstoffs aus den Zellen ist daher denkbar. Das simultane Absinken der Fluoreszenzintensitäten bei beiden gemessenen Wellenlängen wurde bereits bei der Behandlung der reninsezernierenden Zellen mit extrazellulär hypoosmolaren Lösungen beobachtet (s. Kap. 3.3.1). Daher wäre eine weitere mögliche Erklärung für diese Beobachtung ein Wassereinstrom in die Zellen mit dem Resultat der Verdünnung des intrazellulär kumulierten Farbstoffs Fura-2. Ungeklärt bleibt, wodurch dieser Wassereinstrom zustande kommen würde. Möglich wäre eine durch die Lipophilie der Substanz bedingte unspezifische Interaktion mit der Zellmembran, die daraufhin mit einer gesteigerten Wasserpermeabilität reagiert.

## Diskussion

---

Dies ist jedoch nur eine Hypothese, ein Beweis dieser Aussage ist aus den von mir durchgeführten Versuchen nicht möglich. 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid verursachte ebenfalls einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den juxtaglomerulären Zellen. Für diese Beobachtung wären mehrere Erklärungen möglich. Ein Einstrom der  $Ca^{2+}$ -Ionen von extrazellulär durch VOCC's nach Depolarisation der Zellen oder die Hemmung der  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -ATPase wäre denkbar. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden von mir die in Kap. 3.5.3 durchgeführten Experimente mit der Messung von Membranpotentialveränderungen durch DiBAC<sub>4</sub>(3) aufgenommen. Durch die Anwendung von 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid erfolgte eine Depolarisation der reninsezernierenden Zellen. Depolarisierende Effekte dieser Substanz wurden bereits von Tare et al. (2002) an Endothelzellen der Rattenmesenterialarterie und der Schweinekoronararterie sowie von Coleman et al. (2001) an Endothelzellen der submukösen Arteriole von Schweinen beschrieben. Ursachen für dieses elektrophysiologische Geschehen könnte eine von Terasawa et al. (1991) beschriebene Hemmung der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase oder eine Öffnung von  $Ca^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen in den juxtaglomerulären Zellen sein. Die Herkunft der  $Ca^{2+}$ -Ionen wurde von mir durch Experimente mit  $Ca^{2+}$ -freier Lösung untersucht, da ein Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch VOCC's auf das Vorliegen von extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen angewiesen wäre. In diesen Versuchen war eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium während der Anwendung von 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid weiterhin auslösbar; ein Hinweis auf eine intrazelluläre Herkunft der  $Ca^{2+}$ -Ionen. Daher wäre eine Entleerung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher durch die Anwendung dieser Substanz durchaus denkbar, hierfür könnten Experimente mit CPA durchgeführt werden. Weitere mögliche Mechanismen, die zur Entleerung von  $Ca^{2+}$ -Speichern führen könnten, wären unspezifische toxische Effekte (Griffith (2004)) oder eine durch die Lipophilie der Substanz bedingte unspezifische Interaktion mit der Zellmembran und deren Proteinen. Denkbar wären auch Interaktionen mit intrazellulären Membransystemen wie z.B. den  $Ca^{2+}$ -Speichern. Um die Wirksamkeit der beiden Substanzen 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid und 1-Heptanol zu testen, wurde die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter beiden Substanzen miteinander

## Diskussion

---

verglichen. 1-Heptanol verursachte in einer Konzentration von 5 mM eine vergleichbare Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wie 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid in einer Konzentration von 50  $\mu$ M. Dieses Resultat bestätigt die Aussage von Yamamoto et al. (1998) über die Wirksamkeit dieser Substanzen.

Der Einfluss der Gap junctions auf die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  bei der Stimulation der juxtaglomerulären Zellen mit ANG II wurde durch die Experimente in Kap. 3.5.5 untersucht. Wären die Zellen auf  $Ca^{2+}$ -Ionen von Nachbarzellen angewiesen, so müsste die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Blockade der Gap junctions entweder im proximalen oder distalen reninpositiven Bereich vermindert sein. In meinen Ergebnissen konnte die Reaktion der juxtaglomerulären Zellen auf die Stimulation mit ANG II durch 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid ortsabhängig nicht verändert werden. In beiden Gruppen war jedoch die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid signifikant gegenüber dem Kontrollpeak ohne Blockade der Gap junctions verkleinert. Tachyphylaxie wäre für diese Beobachtung eine mögliche Erklärung, wobei die beiden aufeinander folgenden Peaks durch die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  unter 18 $\beta$ -Glycyrrhethinic Acid nur schwer zu vergleichen sind. Experimente mit 1-Octanol wurden eingestellt. Unter Behandlung der Zellen mit dieser Substanz fiel die Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen auf 0 ab. Wahrscheinlich aufgrund der Lipophilie der Substanz in Verbindung mit einer detergenten Wirkung wurde der Farbstoff Fura-2 aus den Zellen ausgewaschen, die Messungen konnten dadurch nicht zu Ergebnissen führen. Probleme bei der Interpretation der von mir gemessenen Ergebnisse stellt die Tatsache dar, dass die Funktionsweise der Gap junctions-Inhibitoren bis dato nicht vollständig geklärt ist. Vermutlich lagern sich die Substanzen in die Zellmembran ein und interagieren mit den Connexinen, sodass diese eine Konformationsänderung vollziehen und dadurch geschlossen werden (Davidson und Baumgarten (1988)). Interaktionen mit weiteren Ionenkanälen sowie toxische Effekte sind jedoch nicht ausgeschlossen und könnten daher ebenfalls Erklärungen für die von mir gemessenen Ergebnisse liefern.

---

#### **4.5 BK<sub>Ca</sub>-Kanäle und K<sub>ir</sub>-Kanäle in juxtaglomerulären Zellen und der Einfluss dieser Kanäle bei der Stimulation durch ANG II**

Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle wurden von Friis et al. (2003) in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere beschrieben. Diese Kanäle verursachten einen auswärtsgerichteten K<sup>+</sup>-Strom, der die Zellen hyperpolarisiert. Eine Aktivierung der Kanäle geschieht durch eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und durch Depolarisation (Catterall et al. (2002)). TEA (5 mM) blockierte diese Kanäle und führte dadurch zur Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen um 21 mV (Friis et al. (2003)). Eine solche Depolarisation könnte zur Öffnung von VOCC's und zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen führen. In den von mir durchgeführten Experimenten des Kap. 3.2.4.1 wurde TEA in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Es konnte kein Anhaltspunkt für eine Depolarisation mit anschließendem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch VOCC's in die juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere durch TEA gefunden werden. Die Antwort dieser Zellen auf die Stimulation mit ANG II wurde ebenfalls durch die Blockade von BK<sub>Ca</sub>-Kanälen nicht beeinflusst. Eine Depolarisation der Zellen durch TEA konnte in Experimenten mit fluorometrischer Zellmembranpotentialmessung mit DiBAC<sub>4</sub>(3) ebenso nicht beobachtet werden (s. Kap. 3.2.4.2). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Friis et al. (2003) spielen in meiner Präparation BK<sub>Ca</sub> sowie auch andere TEA-empfindliche K<sup>+</sup>-Kanäle keine Rolle. Ursache hierfür ist vermutlich der unterschiedliche Zustand in dem sich die Zellen befinden. So haben meine Zellen im Gewebeverband ein Membranpotential von ca. -60 mV im Gegensatz zu den isolierten Zellen von Friis et al. (2003), die ein Membranpotential von ca. -30 mV aufwiesen.

Kurtz und Penner (1989) berichteten über einen abnormalen einwärtsgerichteten K<sup>+</sup>-Strom (K<sub>ir</sub>) in juxtaglomerulären Zellen der Mäuseniere. Dieser Strom konnte durch ANG II gehemmt werden und führte zur Depolarisation der Zellen. Einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle konnten sie jedoch nicht feststellen. Leichtle et al. (2004)

## Diskussion

---

beschrieben Barium als einen potenten Inhibitor für  $K_{ir}2.x$ -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere und konnten eine reversible Depolarisation dieser Zellen durch Bariumionen beobachten. Die in Kap. 3.2.5 beschriebenen Versuche der Blockade von  $K_{ir}2.x$ -Kanälen und der damit erwarteten Depolarisation waren leider nicht erfolgreich. Bariumionen beeinflussten den Farbstoff Fura-2, sodass eine Aussage über die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht möglich war. Diese Experimente wurden daraufhin eingestellt.

## 5 Zusammenfassung

ANG II verursacht einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen und verursacht eine Hemmung der Reninfreisetzung (Calciumparadoxon). Dieses  $Ca^{2+}$ -Signal kann in zwei Phasen unterteilt werden: die erste Phase, die Peakphase, ist charakterisiert durch einen schnellen Anstieg mit anschließendem schnellem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die zweite Phase, die Plateauphase, schließt sich der Peakphase an und ist dadurch charakterisiert, dass sich die  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem hohen Niveau hält. Die  $[Ca^{2+}]_i$  fällt erst nach Ausbleiben des ANG II-Stimulus wieder auf basale Werte ab. Die  $Ca^{2+}$ -Ionen können aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten in das Zytosol der Zellen gelangen. Die beiden genannten Kompartimente sind der Extrazellulärraum und die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher. Für den Einstrom von extrazellulär sind verschiedene Ionenkanäle beschrieben. Spannungsabhängige (VOCC's), Speicher-aktivierte (SOCC's) und Rezeptor-aktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle (ROCC's) können hierbei die Eintrittspforten darstellen. Intrazelluläre Speicher werden hauptsächlich über den  $IP_3$ -Signaltransduktionsweg entleert. Meine Arbeit beschäftigte sich im Wesentlichen mit dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch VOCC's und SOCC's bei der Stimulation der reninsezernierenden Zellen der Rattenniere mit ANG II. Eine Depolarisation der Zellen durch ANG II findet zwar statt, ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch Dihydropyridin-empfindliche VOCC's ist jedoch weder für die Peak- noch für die Plateauphase verantwortlich. Durch die Blockade der SOCC's blieb in meinen Experimenten die Plateauphase vollständig aus. Die Peakphase dagegen blieb weiterhin erhalten. Der bereits in der Literatur beschriebene Signaltransduktionsweg des Angiotensinrezeptors ( $AT_1$ ) über die  $IP_3$ -Kaskade wird durch die von mir gemessenen Ergebnisse ergänzt, sodass eine Speicherentleerung durch Bindung von  $IP_3$  am  $IP_3$ -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums in die Wege geleitet wird. Ein bislang unbekanntes Signal des endoplasmatischen Retikulums verursacht daraufhin die Öffnung von SOCC's in der Zellmembran und somit einen Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die reninsezernierenden Zellen von extrazellulär. Zweck dieses

## Zusammenfassung

---

$\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms ist unter anderem die Wiederauffüllung der entleerten Speicher. Obwohl im Falle des ANG II-Stimulus ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch VOCC's nicht ursächlich ist, wurde eine Existenz dieser Kanäle in juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere bereits beschrieben. In Übereinstimmung damit führte in meinen Experimenten eine Depolarisation zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Unter den depolarisierten Verhältnissen war - wie bei der Blockade der SOCC's - keine Plateauphase mehr vorhanden, wohl aber eine Peakphase. Da  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine regulatorische Funktion bei der Öffnung von SOCC's übernehmen, wurden möglicherweise, da die Zellen vor ANG II-Stimulation sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch im Zytosol mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Depolarisation reichlich beladen sind, die SOCC's nicht geöffnet.

Den cAMP-Signaltransduktionsweg habe ich ebenfalls untersucht. Unter cAMP-erhöhenden Stimuli konnte eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen gemessen werden. Die beiden second messenger  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und cAMP scheinen daher nebeneinander zu existieren und regulatorische Gegenspieler zu sein, da  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen - wie oben bereits beschrieben - inhibitorisch und cAMP sekretionssteigernd auf reninsezernierende Zellen wirken. Welcher von diesen beiden Wegen einen überwiegenden Stellenwert in der Regulation der Reninsekretion einnimmt, ist nicht abschließend geklärt. Die von mir durchgeführten Untersuchungen ergaben jedoch, dass weder die Proteinkinase A noch der Epac (cAMP-regulierter Guaninnukleotid Austauschfaktor) - beide aktivieren in anderen Modellsystemen die SOCC's - für die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verantwortlich sind. Dieser Signaltransduktionsweg bleibt also unklar.

Da das RAAS auch in die Regulation der extrazellulären Osmolarität involviert ist, wurden zu dieser Thematik Untersuchungen in meiner Arbeit durchgeführt. Angiotensin II steigert die Aldosteronfreisetzung der Nebenniere und führt dadurch zur gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Ionenrückresorption in der Niere. Dadurch erhöht sich die extrazelluläre Osmolarität. Aus physiologischer Sicht wäre eine Hemmung der Reninsekretionsrate durch gesteigerte osmotische Verhältnisse des extrazellulären Kompartiments logisch zu erklären und wurde bereits

## Zusammenfassung

---

beschrieben. Die  $[Ca^{2+}]_i$  verhielt sich in den von mir durchgeführten Experimenten jedoch reziprok zu dieser Erklärung. Unter hyperosmolaren Verhältnissen kam es zu keiner Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ , unter hypoosmolaren Bedingungen stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  dagegen an. Unterschiedliche Ionenkanäle könnten für diesen Effekt verantwortlich sein. Stretch-aktivierte Ionenkanäle, VOCC's, Volumen aktivierte oder  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $Cl^-$ -Kanäle wurden diskutiert, wobei keiner dieser Kanäle schließlich nachgewiesen werden konnte. Zur Klärung dieser Fragestellungen wären weitere Experimente mit Blockiersubstanzen für die einzelnen Kanalklassen nötig.

Der juxtaglomeruläre Apparat ist als komplette Einheit in die Regulation der Reninsekretion mit einbezogen. Gap junctions dienen der Kommunikation der Zellen untereinander. Die Anwendung der Blockersubstanzen dieser Kommunikationswege führte zur Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen. Unterschiedliche Vorgänge konnten eine Erklärung für dieses Verhalten liefern. Alle Gap junctions-Blocker lagern sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in die Zellmembran ein. Hierdurch könnte die Barrierefunktion der Zellmembran gestört werden und Ionen bzw. auch Wasser in die Zellen strömen, was zu einer Volumenänderung der Zelle mit Aktivierung von beispielsweise stretch-aktivierten Ionen-Kanälen führen würde. Weiterhin könnten auch unterschiedliche Signal- und Transportsysteme durch die Wirkung der Substanzen direkt bzw. durch die Blockade der Gap junctions in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Die Blockade der Gap junctions führte nicht zu einer Veränderung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signals bei der Stimulation der reninsezernierenden Zellen mit ANG II. Funktionelle Gap junctions, z.B. zwischen glatten Muskelzellen und den reninsezernierenden Zellen, sind also nicht Voraussetzung für eine normale  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch ANG II.

## 6 Literatur

Aki, Nishiyama, Miyatake, Kimura, Kohno und Abe (2002) Role of adenosine A<sub>1</sub> receptor in angiotensin II- and norepinephrine-induced renal vasoconstriction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: pp 117 - 123

Albert und Large (2002) Activation of store-operated channels by noradrenaline via protein kinase C in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol. (Lond. )* 544: pp 113 - 125

Bachmann, Bosse und Mundel (1995) Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am. J Physiol* 268: pp F885 - F898

Barajas (1979) Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol* 237: pp F333 - F343

Bell, Lapointe und Peti-Petardi (2003) Macula densa cell signaling. *Annual Review of Physiology* 65: pp 481 - 500

Berridge und Irvine (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: pp 315 - 321

Blair West, Coghlan, Denton, Funder, Scoggins und Wright (1971) Inhibition of renin secretion by systemic and intrarenal angiotensin infusion. *Am. J. Physiol* 220: pp 1309 - 1315

Braam, Navar und Mitchell (1995) Modulation of Tubuloglomerular Feedback by Angiotensin II Type 1 Receptors During the Development of Goldblatt Hypertension. *Hypertension* 25: pp 1232 - 1237

Bräuner, Hülser und Strasser (1984) Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim. Biophys. Acta* 771: pp 208 - 216

Brink (1998) Gap junctions in vascular smooth muscle. *Acta. Physiol. Scand.* 164: pp 349 - 356

Bührle, Nobiling, Mannek, Schneider, Hackenthal und Taugner (1984) The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: pp S383 - S393

## Literatur

---

- Bührle, Scholz, Hackenthal, Nobiling und Taugner (1986) Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45: pp 37 - 47
- Bührle, Nobiling und Taugner (1985) Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* 249: pp F272 - F281
- Cantin, Araujo-Nascimento, Benchimol und Desormeaux (1977) Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am. J. Pathol.* 87: pp 581 - 602
- Carey, McGrath, Pentz, Gomez und Barrett (1997) Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest* 100: pp 1566 - 1574
- Carmines, Fowler und Bell (1993) Segmentally distinct effects of depolarization on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in renal arterioles. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* 265: pp F677 - F685
- Castrop, Schweda, Mizel, Huang, Briggs, Kurtz und Schnermann (2004) Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol.)* 286: pp F848 - F857
- Castrop, Schweda, Schumacher, Wolf und Kurtz (2001) Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: pp 867 - 874
- Catterall, Chandy, und Gutman (2002) *The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels.* IUPHAR Media
- Chandrasekharan, Dai, Roos, Evanson, Tomsik, Elton und Simmons (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: pp 13926 - 13931
- Chatziantoniou und Arendshorst (1993) Angiotensin receptor sites in renal vasculature of rats developing genetic hypertension. *Am. J. Physiol* 265: pp F853 - F862

## Literatur

---

- Chatziantoniou, Dussaule, Arendshorst und Ardaillou (1994) Angiotensin II receptors and renin release in rat glomerular afferent arterioles. *Kidney. Int.* 46: pp 1570 - 1573
- Chijiwa, Mishima, Hagiwara, Sano, Hayashi, Inoue, Naito, Toshioka und Hidaka (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265: pp 5267 - 5272
- Churchill (1985) Second messengers in renin secretion. *Am. J. Physiol* 249: pp F175 - F184
- Churchill und Bidani (1987) Renal effects of selective adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am. J. Physiol* 252: pp F299 - F303
- Churchill und Churchill (1985) A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: pp 589 - 594
- Churchill und Churchill (1987) BAY K 8644, a calcium channel agonist, inhibits renin secretion in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 285: pp 87 - 97
- Churchill (1995) First and second messengers in renin secretion. In: Laragh und Brenner: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Raven Press: pp 1869 - 1885
- Clapham, Montell, Schultz und Julius (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: Transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* 55: pp 591 - 596
- Coleman, Tare und Parkington (2001) K<sup>+</sup> currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J. Physiol. (Lond.)* 531: pp 359 - 373
- Craven und DeRubertis (1985) Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of renin release from isolated glomeruli: apparent independence from alterations in cGMP. *Metabolism* 34: pp 651 - 657
- Davidson und Baumgarten (1988) Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: pp 1104 - 1107

## Literatur

---

- Davis und Freeman (1976) Mechanisms regulating renin release. *Physiol. Rev.* 56: pp 1 - 56
- Della Bruna, Pinet, Corvol und Kurtz (1991) Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 1: pp 98 - 110
- Devlin und Leckie (1994) Second messengers involved in the control of renin secretion in cultured human nephroblastoma cells. *Am. J. Physiol* 266: pp F667 - F673
- Dixon, Sharma, Dickerson und Fortune (1994) Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol* 266: pp C1406 - C1420
- Dousa (1999) Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55: pp 29 - 62
- Ellershaw, Greenwood und Large (2002) Modulation of volume-sensitive chloride current by noradrenaline in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 542: pp 537 - 547
- Epps, Wolfe und Groppi (1994) Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. *Chem. Phys. Lipids* 69: pp 137 - 150
- Ertel, Campbell, Harpold, Hofmann, Mori, Perez-Reyes, Schwartz, Snutch, Tanabe, Birnbaumer, Tsien und Catterall (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: pp 533 - 535
- Fabiato (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 245: pp C1 - 14
- Feelisch und Noack (1987) Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139: pp 19 - 30
- Fellner und Arendshorst (2000) Ryanodine receptor and capacitative  $Ca^{2+}$  entry in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney. Int.* 58: pp 1686 - 1694

## Literatur

---

- Fellner und Arendshorst (2002) Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR. *Kidney. Int.* 61: pp 2132 - 2141
- Fellner und Arendshorst (1999) Capacitative calcium entry in smooth muscle cells from preglomerular vessels. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 277: pp F533 - F542
- Feng, Li und Navar (2004) T-type calcium channels in the regulation of afferent and efferent arterioles in rats. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 286: pp F331 - F337
- Ferrier, Kurtz, Lehner, Shaw, Pusterla, Saxenhofer und Weidmann (1989) Stimulation of renin secretion by potassium-channel activation with cromakalim. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36: pp 443 - 447
- Fishman (1976) Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* 260: pp 542 - 544
- Fox, Nowycky und Tsien (1987) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* 394: pp 173 - 200
- Fray (1976) Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am. J. Physiol* 231: pp 936 - 944
- Fray, Lush und Park (1986) Interrelationship of blood flow, juxtaglomerular cells, and hypertension: role of physical equilibrium and Ca. *Am. J. Physiol* 251: pp R643 - R662
- Fray und Park (1986) Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. *J. Physiol* 375: pp 361 - 375
- Fray, Park und Valentine (1987) Calcium and the control of renin secretion. *Endocr. Rev.* 8: pp 53 - 93
- Fray (1977) Stimulation of renin release in perfused kidney by low calcium and high magnesium. *Am. J. Physiol* 232: pp F377 - F382
- Frederiksen, Leyssac und Skinner (1975) Sensitive osmometer function of juxtaglomerular cells in vitro. *J Physiol (Lond)* 252: pp 669 - 679

## Literatur

---

- Fredholm, Ijzerman, Jacobson, Klotz und Linden (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: pp 527 - 552
- Freissmuth, Hausleithner, Tuisl, Nanoff und Schutz (1987) Glomeruli and microvessels of the rabbit kidney contain both A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-adenosine receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 335: pp 438 - 444
- Friis, Jorgensen, Andreasen, Jensen und Skøtt (2003) Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BK<sub>Ca</sub> potassium channels (ZERO variant) and L-Type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. *Circ. Res.* 93: pp 213 - 220
- Friis, Jensen, Sethi, Andreasen, Hansen und Skøtt (2002) Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ. Res.* 90: pp 996 - 1003
- Giuliumian, Meszaros und Fuchs (2000) Endothelin-1-induced contraction of mesenteric small arteries is mediated by ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> channels and cyclic ADP-ribose. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36: pp 758 - 763
- Goormaghtigh (1939) Une glande endocrine dans la paroi des arterioles renals. *Bruxelles-Med.* 19: pp 1541
- Gordienko, Clausen und Goligorsky (1994) Ionic currents and endothelin signaling in smooth muscle cells from rat renal resistance arteries. *Am. J. Physiol* 266: pp F325 - F341
- Gottschalk und Mylle (1959) Micropuncture study of mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. *Am. J. Physiol* 196 (4): pp 927 - 936
- Greenberg, Lorenz, He, Schnermann und Briggs (1993) Effect of prostaglandin synthesis inhibition on macula densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol* 265: pp F578 - F583
- Griffith (2004) Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br. J. Pharmacol.* 141: pp 881 - 903

## Literatur

---

- Grynkiewicz, Poenie und Tsien (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: pp 3440 - 3450
- Gutiérrez, Kornfeld und Persson (1999) Calcium response to adenosine and ATP in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 166: pp 175 - 181
- Hackenthal, Aktories und Jakobs (1985) Pertussis toxin attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction and inhibition of renin release. *Mol. Cell. Endocrinol.* 42: pp 113 - 117
- Hackenthal, Paul, Ganten und Taugner (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 70: pp 1067 - 1116
- Haefliger, Nicod und Meda (2004) Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* 62: pp 345 - 356
- Hall und Granger (1986) Adenosine alters glomerular filtration control by angiotensin II. *Am. J. Physiol* 250: pp F917 - F923
- Hamilton, Weir und Weston (1986) Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 88: pp 103 - 111
- Hansen, Jensen, Andreasen, Friis und Skøtt (2000) Vascular smooth muscle cells express the  $\alpha_{1A}$  subunit of a P-/Q-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Channel, and it is functionally important in renal afferent arterioles. *Circ. Res.* 87: pp 896 - 902
- Hansen, Jensen, Andreasen und Skøtt (2001) Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ. Res.* 89: pp 630 - 638
- Hansen, Castrop, Briggs und Schnermann (2003) Adenosine Induces Vasoconstriction through Gi-Dependent Activation of Phospholipase C in Isolated Perfused Afferent Arterioles of Mice. *J Am. Soc. Nephrol.* 14: pp 2457 - 2465
- Helliwell und Large (1997)  $\alpha_1$ -Adrenoceptor activation of a non-selective cation current in rabbit portal vein by 1,2-diacyl-*sn*-glycerol. *J. Physiol* 499: pp 417 - 428

## Literatur

---

Helou und Marchetti (1997) Morphological heterogeneity of renal glomerular arterioles and distinct  $[Ca^{2+}]_i$  responses to ANG II. *Am. J. Physiol* 273: pp F84 - F96

Henrich, McAllister, Smith und Campbell (1988) Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. *Am. J. Physiol* 255: pp F474 - F478

Hisa, Takahashi und Satoh (1984) Evidence for prostaglandin-independent mechanisms in renin release mediated by alpha adrenoceptors during renal nerve stimulation in anesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: pp 547 - 550

Hoth und Penner (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: pp 353 - 356

Hubbard, Stieger und Bariles (1989) Biogenesis of Endogenous Plasma Membrane Proteins in Epithelial Cells. *Annual Review of Physiology* 51: pp 755 - 770

Ichihara, Suzuki, Miyashita, Naitoh, Hayashi und Saruta (1999) Transmural pressure inhibits prorenin processing in juxtaglomerular cell. *Am. J. Physiol* 277: pp R220 - R228

Iversen und Arendshorst (1998) ANG II and vasopressin stimulate calcium entry in dispersed smooth muscle cells of preglomerular arterioles. *Am. J. Physiol* 274: pp F498 - F508

Jackson, Zhu und Tofovic (2002) Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 283: pp F41 - F51

Jensen und Skøtt (1993) Osmotically sensitive renin release from permeabilized juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 265: pp F87 - F95

Jensen, Ellekvist und Skøtt (1997) Chloride is essential for contraction of afferent arterioles after agonists and potassium. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 272: pp F389 - F396

Jensen, Schmid und Kurtz (1996) Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 271: pp F659 - F669

## Literatur

---

- Jensen und Skøtt (1994) Renin release from permeabilized juxtaglomerular cells is stimulated by chloride but not by low calcium. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 266: pp F604 - F611
- Jentsch, Stein, Weinreich und Zdebik (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews* 82: pp 503 - 568
- Jones Dombi und Churchill (1993) The baroreceptor mechanism for controlling renin secretion: effect of calcium channel blockers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: pp 274 - 278
- Kang, Joseph, Chepurny, Monaco, Wheeler, Bos, Schwede, Genieser und Holz (2003) Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 278: pp 8279 - 8285
- Karaki, Ozaki, Hori, MitsuiSaito, Amano, Harada, Miyamoto, Nakazawa, Won und Sato (1997) Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 49: pp 157 - 230
- Keeton und Campbell (1980) The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32: pp 81 - 227
- Kirber, Walsh und Singer (1988) Stretch-activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflugers. Arch.* 412: pp 339 - 345
- Kirchner, Kotchen, Galla und Luke (1978) Importance of chloride for acute inhibition of renin by sodium chloride. *Am J Physiol* 235: pp F444 - F450
- Klar, Sandner, Muller und Kurtz (2002) Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch. -Eur. J. Physiol.* 444: pp 335 - 344
- Kurtz, Della Bruna, Pfeilschifter und Bauer (1988) Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33: pp 798 - 803
- Kurtz, Gotz, Hamann und Wagner (1998) Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: pp 4743 - 4747

## Literatur

---

- Kurtz, Hamann und Gotz (2000) Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflugers. Arch.* 440: pp 889 - 895
- Kurtz und Penner (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: pp 3423 - 3427
- Kurtz, Pfeilschifter und Bauer (1984) Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem. Biophys. Res. Commun* 124: pp 359 - 366
- Kurtz, Pfeilschifter, Hutter, Buhle, Nobiling, Taugner, Hackenthal und Bauer (1986) Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J Physiol* 250: pp C563 - C571
- Kurtz (1989) Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113: pp 1 - 40
- Kurtz und Wagner (1998) Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 44: pp F849 - F862
- Large und Wang (1996) Characteristics and physiological role of the  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol* 271: pp C435 - C454
- Laske-Ernst (2003) Einfluss von Botenstoffen auf die freie Calciumkonzentration in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen: Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Leichtle, Rauch, Albinus, Benohr, Kalbacher, Mack, Veh, Quast und Russ (2004) Electrophysiological and molecular characterization of the inward rectifier in juxtaglomerular cells from rat kidney. *J Physiol* 560: pp 365 - 376
- Liu und Ambudkar (2001) Characteristics of a store-operated calcium-permeable channel: sarcoendoplasmic reticulum calcium pump function controls channel gating. *J. Biol. Chem.* 276: pp 29891 - 29898

## Literatur

---

- Lorenz, Weihprecht, Schnermann, Skøtt und Briggs (1990) Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion. *Am. J. Physiol* 259: pp F186 - F193
- Lorenz, Weihprecht, He, Skøtt, Briggs und Schnermann (1993) Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 265: pp F187 - F194
- Loutzenhiser und Loutzenhiser (2000) Angiotensin II-induced  $Ca^{2+}$  influx in renal afferent and efferent arterioles: differing roles of voltage-gated and store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *Circ. Res.* 87: pp 551 - 557
- Ma, Patterson, van Rossum, Birnbaumer, Mikoshiba und Gill (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels. *Science* 287: pp 1647 - 1651
- McDonald, Taher, Aisenbrey, De Torrente und Schrier (1975) Effect of angiotensin II and an angiotensin II inhibitor on renin secretion in the dog. *Am. J. Physiol* 228: pp 1562 - 1567
- McFadzean und Gibson (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 135: pp 1 - 13
- Mundel, Bachmann, Bader, Fischer, Kummer, Mayer und Kriz (1992) Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int.* 42: pp 1017 - 1019
- Murphy, Perlman, London und Steenbergen (1991a) Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68: pp 1250 - 1258
- Murphy, Alexander, Griendling, Runge und Bernstein (1991b) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: pp 233 - 236
- Murray und Churchill (1984) Effects of adenosine receptor agonists in the isolated, perfused rat kidney. *Am. J. Physiol* 247: pp H343 - H348
- Nabel, Schweda, Riegger, Kramer und Kurtz (1999) Chloride channel blockers attenuate the inhibition of renin secretion by angiotensin II. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 438: pp 694 - 699

## Literatur

---

- Nishiyama, Inscho und Navar (2001) Interactions of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2a</sub> receptors on renal microvascular reactivity. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 280: pp F406 - F414
- O'Grady, Palfrey und Field (1987) Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. *Am. J. Physiol* 253: pp C177 - C192
- Olivera und Lopez Novoa (1992) Effect of adenosine and adenosine analogues on cyclic AMP accumulation in cultured mesangial cells and isolated glomeruli of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 107: pp 341 - 346
- Osswald, Schmitz und Kemper (1978) Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 303: pp 95 - 99
- Osswald und Quast (1995) Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells. In: Scherübl und Hescheler: *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells.* CRC Press: pp 301 - 314
- Parekh und Penner (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews* 77: pp 901 - 930
- Parekh (2003) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J. Physiol. (Lond. )* 547: pp 333 - 348
- Park, Han und Fray (1981) Calcium in the control of renin secretion: Ca<sup>2+</sup> influx as an inhibitory signal. *Am. J. Physiol* 240: pp F70 - F74
- Park, Hong und Honeyman (1992) Calcium-dependent inhibitory step in control of renin secretion. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 262: pp F793 - F798
- Peart, Quesada und Tenyi (1975) The effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate and theophylline on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 54: pp 55 - 60
- Penner und Neher (1988) The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J. Exp. Biol.* 139: pp 329 - 345
- Perez-Reyes, Cribbs, Daud, Lacerda, Barclay, Williamson, Fox, Rees und Lee (1998) Molecular characterization of neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391: pp 896 - 900

## Literatur

---

- Persson (2003) Renin: origin, secretion and synthesis. *J. Physiol* 552: pp 667 - 671
- Pollock, Nakane, Buttery, Martinez, Springall, Polak, Forstermann und Murad (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol* 265: pp C1379 - C1387
- Pratz, Mondat, Montier und Caverio (1991) Effects of the K<sup>+</sup> channel activators, RP 52891, cromakalim and diazoxide, on the plasma insulin level, plasma renin activity and blood pressure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: pp 216 - 222
- Purdy und Arendshorst (2001) Iloprost inhibits inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated calcium mobilization stimulated by angiotensin II in cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 12: pp 19 - 28
- Ralevic und Burnstock (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: pp 413 - 492
- Rauch (2000) Untersuchungen zu Lokalisation, intrazellulärer Calciumkonzentration, Membranpotential und sekretorischer Aktivität reninsezernierender Zellen in der afferenten Arteriole der Ratte: Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Ren, Garvin, Ito und Carretero (2001) Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney. Int.* 60: pp 1676 - 1683
- Ren, Carretero und Garvin (2002) Role of mesangial cells and gap junctions in tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.* 62: pp 525 - 531
- Richer, Pratz, Mulder, Mondot, Giudicelli und Caverio (1990) Cardiovascular and biological effects of K<sup>+</sup> channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sci.* 47: pp 1693 - 1705
- Robison, Butcher und Sutherland (1968) Cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 37: pp 149 - 174

## Literatur

---

- Rossi, Churchill und Churchill (1987a) Pertussis toxin reverses adenosine receptor-mediated inhibition of renin secretion in rat renal cortical slices. *Life. Sci.* 40: pp 481 - 487
- Rossi, Churchill, Jacobson und Leahy (1987b) Further characterization of the renovascular effects of N6-cyclohexyladenosine in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 240: pp 911 - 915
- Russ, Rauch und Quast (1999) Pharmacological evidence for a  $K_{ATP}$  channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J. Physiol. (Lond. )* 517: pp 781 - 790
- Ryan, Liu, Herbowy, Gross und Hajduczuk (2003) Intercellular communication between renin expressing As4.1 cells, endothelial cells and smooth muscle cells. *Life Sci.* 72: pp 1289 - 1301
- Salomonsson, Kornfeld, Gutierrez, Magnusson und Persson (1997) Effects of stimulation and inhibition of protein kinase C on the cytosolic calcium concentration in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 161: pp 271 - 279
- Sasaki, Yamano, Bardhan, Iwai, Murray, Hasegawa, Matsuda und Inagami (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351: pp 230 - 233
- Sayago und Beierwaltes (2001) Nitric oxide synthase and cGMP-mediated stimulation of renin secretion. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol. )* 281: pp R1146 - R1151
- Schnermann (2003) Homer W. Smith Award lecture. The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: pp 1681 - 1694
- Schnermann und Levine (2003) Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: Adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annual Review of Physiology* 65: pp 501 - 529
- Schnermann, Persson und Agerup (1973) Tubuloglomerular feedback. Nonlinear relation between glomerular hydrostatic pressure and loop of henle perfusion rate. *J Clin Invest.* 52: pp 862 - 869

## Literatur

---

- Scholz, Götz, Hamann und Kurtz (1994a) Differential effects of extracellular anions on renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 267: pp F1076 - F1081
- Scholz, Hamann, Götz und Kurtz (1994b) Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Arch. -Eur. J. Physiol.* 428: pp 173 - 178
- Scholz, Kaissling, Inagami und Kurtz (1991) Differential response of renin secretion to vasoconstrictors in isolated perfused rat kidney. *J. Physiol. (Lond. )* 441: pp 453 - 468
- Scholz und Kurtz (1995) Differential regulation of cytosolic calcium between afferent arteriolar smooth muscle cells from mouse kidney. *Pflügers Arch. -Eur. J. Physiol.* 431: pp 46 - 51
- Schricker und Kurtz (1993) Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 265: pp F180 - F186
- Schulz und Krause (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate and its co-players in the concert of Ca<sup>2+</sup> signalling--new faces in the line up. *Curr. Mol. Med.* 4: pp 313 - 322
- Schweda, Riegger, Kurtz und Kramer (2000) Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 279: pp F170 - F176
- Schwertschlag und Hackenthal (1982) Forskolin stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 84: pp 111 - 113
- Sequeira Lopez, Pentz, Robert, Abrahamson und Gomez (2001) Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol* 281: pp F345 - F356
- Shade, Davis, Johnson, Gotshall und Spielman (1973) Mechanism of action of antiotensin II and antidiuretic hormone on renin secretion. *Am. J. Physiol* 224: pp 926 - 929
- Skøtt (1986a) Calcium and osmotic stimulation in renin release from isolated rat glomeruli. *Pflugers. Arch.* 406: pp 485 - 491

## Literatur

---

- Skøtt (1986b) Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflugers. Arch.* 407: pp 41 - 45
- Skøtt (1988) Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am. J. Physiol* 255: pp F1 - 10
- Skøtt und Baumbach (1985) Effects of adenosine on renin release from isolated rat glomeruli and kidney slices. *Pflugers. Arch.* 404: pp 232 - 237
- Skøtt und Taugner (1987) Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. *Cell. Tissue. Res.* 249: pp 325 - 329
- Soldatov (2003)  $Ca^{2+}$  channel moving tail: link between  $Ca^{2+}$ -induced inactivation and  $Ca^{2+}$  signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: pp 167 - 171
- Spielman und Osswald (1979) Blockade of postocclusive renal vasoconstriction by an angiotensin II antagonists: evidence for an angiotensin-adenosine interaction. *Am. J. Physiol* 237: pp F463 - F467
- Spielman und Thompson (1982) A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am. J. Physiol* 242: pp F423 - F435
- Sugimoto, Namba, Shigemoto, Negishi, Ichikawa und Narumiya (1994) Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am. J. Physiol* 266: pp F823 - F828
- Takagi, Takagi, Franco Saenz und Mulrow (1988) Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in a superfusion system of kidney slices and dispersed juxtaglomerular cells. *Endocrinology* 122: pp 1437 - 1442
- Takahashi, Hisa und Satoh (1984) Effects of  $\alpha$ -agonist on renin and prostaglandin E2 release in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol* 247: pp E604 - E608
- Takenaka, Suzuki, Okada, Inoue, Kanno, Ozawa, Hayashi und Saruta (2002) Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: Actions of angiotensin II. *Kidney Int.* 62: pp 558 - 565

## Literatur

---

- Tare, Coleman und Parkington (2002) Glycyrrhetic derivatives inhibit hyperpolarization in endothelial cells of guinea pig and rat arteries. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. )* 282: pp H335 - H341
- Taugner, Bührle und Nobiling (1984) Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell. Tissue. Res.* 237: pp 459 - 472
- Taugner, Hackenthal, Rix, Nobiling und Poulsen (1982) Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system: renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II and converting enzyme in the kidneys of mice, rats and tree shrews. *Kidney Int. Suppl.* 12: pp S33 - S43
- Taugner, Nobiling, Metz, Taugner, Bührle und Hackenthal (1988) Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell. Tissue. Res.* 252: pp 687 - 690
- Taugner, Whalley, Angermüller, Bührle und Hackenthal (1985) Are the renin-containing granules of juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes? *Cell. Tissue. Res.* 239: pp 575 - 587
- Taugner und Hackenthal (1989) Morphology of the juxtaglomerular apparatus. In: *The juxtaglomerular apparatus*. Springer-Verlag: pp 5 - 43
- Terasawa, Okada, Hara und Itoh (1991) Glycyrrhetic acid derivatives as potent inhibitors of Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>-ATPase. Synthesis and structure-activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry* 27: pp 345 - 351
- Timmermans, Wong, Chiu, Herblin, Benfield, Carini, Lee, Wexler, Saye und Smith (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: pp 205 - 251
- Tinel, Kinne Saffran und Kinne (2002) Calcium-induced calcium release participates in cell volume regulation of rabbit TALH cells. *Pflügers. Arch.* 443: pp 754 - 761
- Traynor, Yang, Huang, Arend, Oliverio, Coffman, Briggs und Schnermann (1998) Inhibition of adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT<sub>1A</sub> receptor-deficient mice. *Am. J. Physiol. (Renal Physiol. )* 44: pp F922 - F927
- Vander (1967) Control of renin release. *Physiol Rev.* 47: pp 359 - 382

## Literatur

---

- Vander und Geelhoed (1965) Inhibition of renin secretion by angiotensin. II. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120: pp 399 - 403
- Vander und Miller (1964) Control of renin secretion in the anesthetized dog. Am. J. Physiol 207: pp 537 - 465
- Vandongen, Peart und Boyd (1974) Effect of angiotensin II and its nonpressor derivatives on renin secretion. Am. J. Physiol 226: pp 277 - 282
- Viana, de la, Pecson, Schmidt und Belmonte (2001) Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons. Eur. J Neurosci. 13: pp 722 - 734
- Vidal, Romero und Vanhoutte (1988) Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. Eur. J. Pharmacol. 149: pp 401 - 402
- Viskoper, Maxwell, Lupu und Rosenfeld (1977) Renin stimulation by isoproterenol and theophylline in the isolated perfused kidney. Am. J. Physiol 232: pp F248 - F253
- Waggoner (1976) Optical probes of membrane potential. J. Membrane Biol. 27: pp 317 - 334
- Wagner, Jensen, Kramer und Kurtz (1998) Control of the renal renin system by local factors. Kidney Int. Suppl 67: pp S78 - S83
- Waldman und Murad (1987) Cyclic GMP synthesis and function. Pharmacol. Rev. 39: pp 163 - 196
- Wathen, Kingsbury, Stouder, Schneider und Rostorfer (1965) Effects of infusion of catecholamines and angiotensin II on renin release in anesthetized dogs. Am. J. Physiol 209: pp 1012 - 1024
- Weihprecht, Lorenz, Briggs und Schnermann (1994) Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. Am. J. Physiol. (Renal Physiol. ) 266: pp F227 - F239
- Wilcox, Welch, Murad, Gross, Taylor, Levi und Schmidt (1992) Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89: pp 11993 - 11997

## Literatur

---

- Wu, Chen, Liu, Tseng und Wang (1999) A novel effect of cyclic AMP on capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in cultured rat cerebellar astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 73: pp 1318 - 1328
- Wu, Lin, Hsieh, Liu und Chiang (2003) Behavior of nonselective cation channels and large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels induced by dynamic changes in membrane stretch in cultured smooth muscle cells of human coronary artery. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 14: pp 44 - 51
- Wu und Davis (2001) Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol* 280: pp H1751 - H1761
- Wuytack, Raeymaekers, De Schutter und Casteels (1982) Demonstration of the phosphorylated intermediates of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in a microsomal fraction and in a  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase purified from smooth muscle by means of calmodulin affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 693: pp 45 - 52
- Yamamoto, Fukuta, Nakahira und Suzuki (1998) Blockade by  $18\beta$ -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J. Physiol. (Lond. )* 511: pp 501 - 508
- Yao, Morioka, Li und Oite (2002) Coordination of mesangial cell contraction by gap junction - Mediated intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  wave. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: pp 2018 - 2026

## Danksagung

---

### **Danksagung**

Diese Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn PD Dr. Ulrich Russ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen, all denjenigen zu danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank PD Dr. Ulrich Russ für die Aufgabenstellung, Hilfeleistungen während der Messungen und dem schriftlichen Teil der Arbeit, für zuverlässige Ratschläge sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und so manch humorvoller Diskussion, auch außerhalb der Wissenschaft.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast möchte ich für die Unterstützung, die anregenden Diskussionen, die Bereitstellung finanzieller Mittel und der Laborräume sowie die fruchtbaren Ideen zur Arbeit und für die mitunter heiteren Unterhaltungen danken.

Des Weiteren danke ich den Doktoranden der Arbeitsgruppe Quast: Ulf Lange, Jochen Lichtenberg, Damian Stefan und Alexander Stehle für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft sowie für die angenehme, oft humorvolle und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Der Dr. Karl Kuhn-Stiftung danke ich für die Bereitstellung des Computers.

Meiner Schwester Tanja Chmielnicki-Ritter und ihrem Mann Steffen Ritter möchte ich für ihre ausdauernde Korrekturleistungen herzlich danken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die Unterstützung und Förderung während des gesamten Studiums und während der Erstellung der Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Diana Schüfer für die Unterstützung, das geduldige Verständnis sowie für die Motivation herzlichst bedanken.

## **Lebenslauf**

## Lebenslauf

---

### **Persönliche Angaben:**

**Name:** Marc Chmielnicki  
**Geburtsdatum:** 18.09.1978  
**Geburtsort:** Ludwigsburg  
**Adresse:** Derendinger Str. 80  
72072 Tübingen  
**Eltern:** Dr. Ing. Siegmund Chmielnicki  
Monika Chmielnicki geb. Maier  
**Geschwister:** Tanja Chmielnicki-Ritter geb. Chmielnicki

### **Schulbildung:**

1985-1989	Grundschule	Freiberg
1989-1992	Gymnasium	Freiberg
1992-1995	Realschule	Freiberg
1995	Realschulabschluss	
1995-1998	technisches Gymnasium	Ludwigsburg
1998	Abitur	

### **Ersatzdienst:**

1998 – 1999 DRK KV Ludwigsburg Abt. Rettungsdienst

### **Akademische Ausbildung:**

2000	Medizinstudium an der Universität Tübingen
20.03.2002	ärztliche Vorprüfung
16.04.2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
22.03.2005	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11.05.2006	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
16.05.2006	Approbation als Arzt