

**Untersuchungen zu Lokalisation,  
intrazellulärer Calciumkonzentration,  
Membranpotential und sekretorischer Aktivität  
reninsezernierender Zellen  
in der afferenten Arteriole der Ratte**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt

von

Ulrich Christian Rauch

aus Pirmasens

2000

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. U. Quast

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. W. J. Schmidt

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Quast für die freundliche Aufnahme, die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seinem Sinn für Gerechtigkeit.

Herrn Prof. Dr. W. J. Schmidt vom Institut für Neuropharmakologie des Fachbereichs für Biologie der Universität Tübingen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Osswald danke ich für die Unterstützung des Themas sowie für seinen Ideenreichtum.

Frau PD Dr. M. Albinus danke ich für das freundliche Überlassen des Kaninchen-Anti-Rattenrenin Antikörpers, die Möglichkeit in ihrem Labor arbeiten zu können und Ihre stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. A. Mack vom Anatomischen Institut der Universität Tübingen danke ich für die Einweisung in das konfokale Mikroskop sowie seine Tips und Ratschläge nicht nur zu diesem Thema.

Herrn Dr. U. Russ danke ich für die ausdauernde und tatkräftige Unterstützung, für seinen Ideenreichtum, sein Computerwissen sowie seine unermüdliche Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Frau C. Löffler-Walz danke ich für unzählige gemeinsame Mittagessen sowie den dazugehörigen nichtwissenschaftlichen Gesprächen.

Frau Dr. A. Hambrock danke ich für die Einarbeitung in Zellkulturtechniken, ihre Ratschläge zum Thema Antikörpertechniken sowie zu allen anderen Themen.

Herrn Dr. A. Bachmann danke ich für seinen immerwährenden Humor.

Frau Dipl. Ing. (FH) A. Piehl, Frau Apothekerin J. Laske sowie Herrn Apotheker U. Lange danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre stete Freundlichkeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Pharmakologischen Instituts, insbesondere Frau Dr. D. Kloor sowie Frau Dr. I. Pfaff für Ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit, sowie Herrn Mstr. K. Stiehler für technische Hilfeleistungen.

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
Liste der verwendeten Abkürzungen	4
<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Lokalisation von Renin</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Kontrolle der Reninsekretion</b>	<b>10</b>
<i>1.3.1. Die Reninsekretion auf zellulärer Ebene beeinflussende Faktoren</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2. Die Reninsekretion beeinflussende Botenstoffe und Mediatoren</i>	<i>21</i>
<i>1.3.3. Die Reninsekretion auf der Ebene des Gesamtorganismus beeinflussende Mechanismen</i>	<i>24</i>
<b>1.4. Fragestellung</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Material und Versuchstiere</b>	<b>28</b>
<i>2.1.1. Substanzen</i>	<i>28</i>
<i>2.1.2. Lösungen</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2.a) Lösungen zur Rattenperfusion</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2.b) Lösungen zur Immunofärbung</i>	<i>31</i>
<i>2.1.2.c) Lösungen zur Fluoreszenzmessung</i>	<i>32</i>
<i>2.1.2.d) Lösungen zum Nachweis der Exo-, Endozytose</i>	<i>36</i>
<b>2.1.3. Versuchstiere</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Methoden</b>	<b>37</b>
<i>2.2.1. Isolierung der Glomeruli mit anhängender afferenter Arteriole</i>	<i>37</i>
<b>2.2.2. Immunfluoreszenzfärbung</b>	<b>39</b>
<i>2.2.2.a) Anfertigung der Kryoschnitte</i>	<i>39</i>
<i>2.2.2.b) Färbung der Kryoschnitte</i>	<i>40</i>

2.2.2.c) <i>Immunfluoreszenzfärbung an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte</i>	42
<b>2.2.3. Fluoreszenzmessungen</b>	<b>43</b>
2.2.3.a) <i>Messapparatur</i>	43
2.2.3.b) <i>Messung des Membranpotentials</i>	50
2.2.3.c) <i>Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration</i>	54
<b>2.2.4. Nachweis von Exo- und Endozytose mit FM 1-43</b>	<b>62</b>
<b>2.2.5. Statistik</b>	<b>64</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>3.1. Immunfluoreszenz</b>	<b>65</b>
<b>3.2. Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration vom Membranpotential und von der extrazellulären Calcium-Konzentration</b>	<b>69</b>
3.2.1. <i>Depolarisation mit Kalium</i>	69
3.2.2. <i>Abhängigkeit des Calcium-Anstiegs von extrazellulärem Calcium</i>	72
3.2.3. <i>Effekt des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin</i>	73
3.2.4. <i>Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration von der extrazellulären Calcium-Konzentration</i>	75
<b>3.3. Effekt von ANG II auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration</b>	<b>77</b>
<b>3.4. Effekt des <math>K_{ATP}</math>-Kanalöffners Levromakalim und des <math>K_{ATP}</math>-Kanalblockers Glibenclamid auf das Membranpotential und die intrazelluläre Calcium-Konzentration</b>	<b>81</b>
3.4.1. <i>Effekt auf das Membranpotential</i>	81
3.4.2. <i>Effekt auf <math>[Ca^{2+}]_i</math></i>	83
3.4.2.a) <i>Effekt von LCRK auf <math>[Ca^{2+}]_i</math> unter Ruhebedingungen</i>	83
3.4.2.b) <i>Effekt von LCRK auf <math>[Ca^{2+}]_i</math> während Stimulation</i>	84
<b>3.5. Untersuchung der Exo- und Endozytose mit FM 1-43</b>	<b>88</b>

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>94</b>
4.1. Immunfluoreszenz	94
4.2. Charakterisierung der in mikrofluorimetrischen Experimenten untersuchten Zellen	96
4.3. Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration vom Membranpotential und von der extrazellulären Calcium-Konzentration	97
4.3.1. Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Calcium-Einstrom bei Depolarisation mit Kalium	97
4.3.2. Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bei Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration	100
4.4. Effekt von ANG II auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration	102
4.5. Effekte des $K_{ATP}$ -Kanalöffners Levromakalim und des $K_{ATP}$ -Kanalblockers Glibenclamid auf das Membranpotential und die intrazelluläre Calcium-Konzentration	103
4.5.1. Effekt auf das Membranpotential	103
4.5.2. Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$	104
4.5.2.a) Effekt von LCRK auf $[Ca^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen	104
4.5.2.b) Effekt von LCRK auf $[Ca^{2+}]_i$ während Stimulation	104
4.6. Untersuchung der Exo- und Endozytose mit FM 1-43	108
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>111</b>
<b>6. LITERATUR</b>	<b>114</b>

## Verwendete Abkürzungen

A. bidest	bidestilliertes Wasser
AK 1	Primärantikörper
AK 2	Sekundärantikörper
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_o$	extrazelluläre Calciumionenkonzentration
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CCCP	Carbonylzyanid-3-chlorphenylhydrazon
CRAC	(Calcium release-activated calcium channel) Calcium-Kanal, der durch die Entleerung intrazellulärer Speicher aktiviert wird
DiBAC <sub>4</sub> (3)	bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Wirkkonzentration (Aktivierung) eines Stoffes
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EGM	Extraglomeruläres Mesangium
FM 1-43	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylammino)styryl)pyridiniumdibromid
Fura-2	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GBC	Glibenclamid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEPES-PS	HEPES gepufferte physiologische Salzlösung
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
$[K^+]_o$	extrazelluläre Kaliumionenkonzentration
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal
KCl	Kaliumchlorid
KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *12H <sub>2</sub> O	Kaliumchrom(III)-sulfat Dodecahydrat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>ir</sub>	(inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel) einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal



LCRK	Levcromakalim
MD	Macula Densa
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natrium-dihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	(Normal Goat Serum) Ziegen-Normalserum
NKS	Kaninchen Normalserum
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
PBS	(Phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROI	(Region of interest) Meßfeld in mikrofluorimetrischen Experimenten
RPB	Renin-positiver Bereich
SEM	(Standard error of the mean) Mittlerer Fehler des Mittelwertes
SL	Stammlösung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
vWF	von Willebrand Faktor

# 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Für die Funktion eines Organismus ist die Konstanzhaltung seines inneren Milieus (= Wasser- und Elektrolythaushalt) von entscheidender Bedeutung. Gelingt es ihm nicht, ein Gleichgewicht zwischen dem Verlust lebensnotwendiger Substanzen (v.a. Wasser und darin gelöste Elektrolyte) und deren Aufnahme zu schaffen, ist er auf Dauer nicht lebensfähig. Ein großes Problem stellt dabei die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten dar, denn einerseits ist Wasser zur Ausscheidung nötig, andererseits muß aber die Wasserabgabe so weit wie möglich eingeschränkt werden. Dies gilt in erster Linie für Landlebewesen wie den Menschen, für die Wasser oft ein restriktives Element darstellt. Neben dem Verlustausgleich durch die erneute Aufnahme von Wasser und Elektrolyten über die Nahrung haben viele Organismen auch die Möglichkeit durch bestimmte Organe und Prozesse den Verlust zu reduzieren. Beim Menschen und anderen terrestrischen Lebewesen sind hierfür die Nieren bzw. funktionell verwandte Organe verantwortlich. In den nächsten Abschnitten soll erläutert werden, welche Faktoren für die Funktion der menschlichen Niere als Regulator des inneren Milieus verantwortlich sind.

## 1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS; Abb.1.1) ist neben dem Sympathikus das wichtigste Effektorsystem in der Regulation von Blutdruck und Salz- und Wasserhaushalt (Hackenthal, 1997). Es wird bei Abnahme des Plasmavolumens, einem Blutdruckabfall, bei Salzzug und bestimmten Formen der Hypertonie aktiviert, wobei es letztlich einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, des Herzminutenvolumens sowie der kardialen Vor- und Nachlast bewirkt. Im folgenden sollen seine Komponenten sowie deren Zusammenwirken erläutert werden.

Renin, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 37 und 40 kDa und aus 340 Aminosäuren bestehend, gehört zur Gruppe der Aspartyl-Proteasen. Es besitzt eine hohe Spezifität gegenüber seinem einzigen bekannten Substrat, dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen. Renin spaltet von Angiotensinogen das Dekapeptid ANG I ab, von welchem eine weitere Protease (Angiotensin-Konversions-Enzym; ACE) ein carboxyterminales Dipeptid abspaltet und somit das hochaktive Oktapeptid ANG II

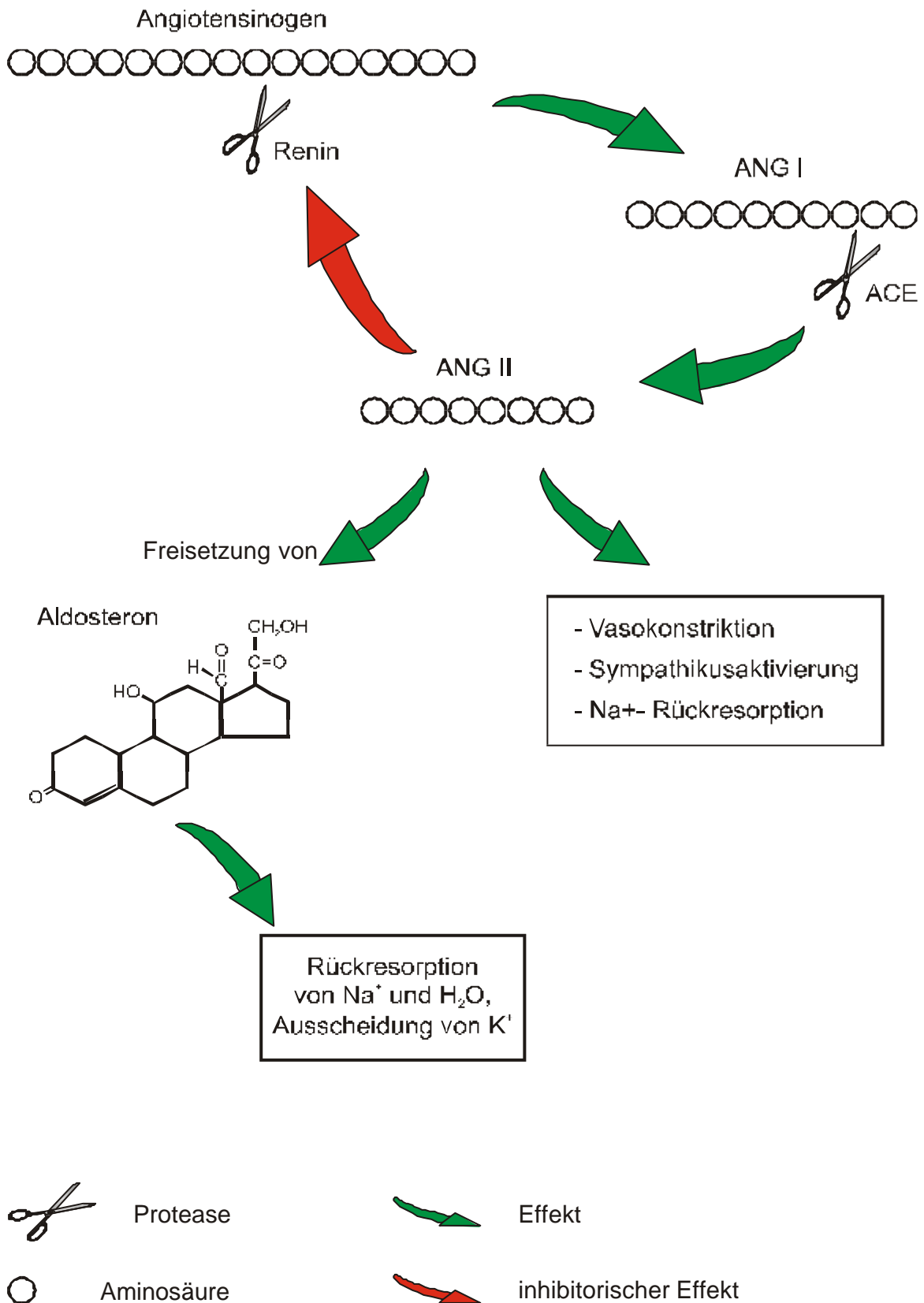


Abb. 1.1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

bildet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Reaktionskette wird durch Renin katalysiert, was auf die zentrale Rolle dieses Enzyms hinweist.

ANG II ist das wichtigste Effektorpeptid des RAAS, welches u.a. direkt vasokonstriktorisch wirkt, die Aktivität des Sympathikus sowie die Na<sup>+</sup>-Rückresorption in den Nierentubuli erhöht, die Reninsekretion inhibiert und die Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde stimuliert.

Das Mineralkortikoid Aldosteron bewirkt schließlich eine Erhöhung der Na<sup>+</sup>- und Wasserrückresorption im distalen Nierentubulus und darüber die Zunahme des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens, sowie eine kompensatorische K<sup>+</sup> - Ausscheidung.

Die Aktivität des RAAS wird hauptsächlich über die Sekretionsrate des Renins moduliert (Hackenthal, 1997), so dass alle Faktoren, die auf die Reninsekretion einwirken, über das RAAS direkt oder indirekt auf den Blutdruck sowie das Wasser- und Elektrolytgleichgewicht des ganzen Organismus Einfluß nehmen.

## 1.2. Lokalisation von Renin

Renin wird von metaplastisch umgewandelten glatten Muskelzellen (reninsezernierenden Zellen) gebildet (Abb.1.2), die hauptsächlich in der Media der afferenten aber auch der efferenten Arteriole lokalisiert sind, wobei die Anzahl der postglomerulären reninpositiven Zellen klein ist (Taugner *et al.*, 1982; Hackenthal *et al.*, 1990). Die afferenten Arteriolen, die aus den *Aa. interlobulares* oder aus den *Aa. arcuatae* entspringen, sind aus der *Tunica intima* (eine Endothelzellschicht + Elastinschicht), der einschichtigen *Tunica media* und der *Tunica adventitia* aufgebaut und können, aufgrund der dort anzutreffenden Zellen, in einen proximalen und einen distalen Teil untergliedert werden. Im proximalen Abschnitt wird die Media ausschließlich von glatten Muskelzellen gebildet, die ringförmig den innen liegenden Endothelschlauch umgeben, wogegen sich im distalen Abschnitt neben glatten Muskelzellen noch die oben genannten reninsezernierenden Zellen befinden, die oft in mehreren Lagen übereinander angeordnet sind (Gattone *et al.*, 1984). Wenngleich die meisten reninsezernierenden Zellen eine Art Manschette um den Pol der afferenten Arteriole bilden, kann man sie auch weiter proximal nachweisen (Bührle *et al.*, 1984). Bezüglich der Länge des reninpositiven Bereiches (= Anzahl der reninsezernierenden Zellen) der Arteriole gibt es nicht nur Unterschiede zwischen Tieren verschiedener Arten oder zwischen Tieren einer Art, sondern sogar zwischen afferenten Arteriolen eines Tieres (Taugner *et al.*, 1982; Bührle *et al.*,

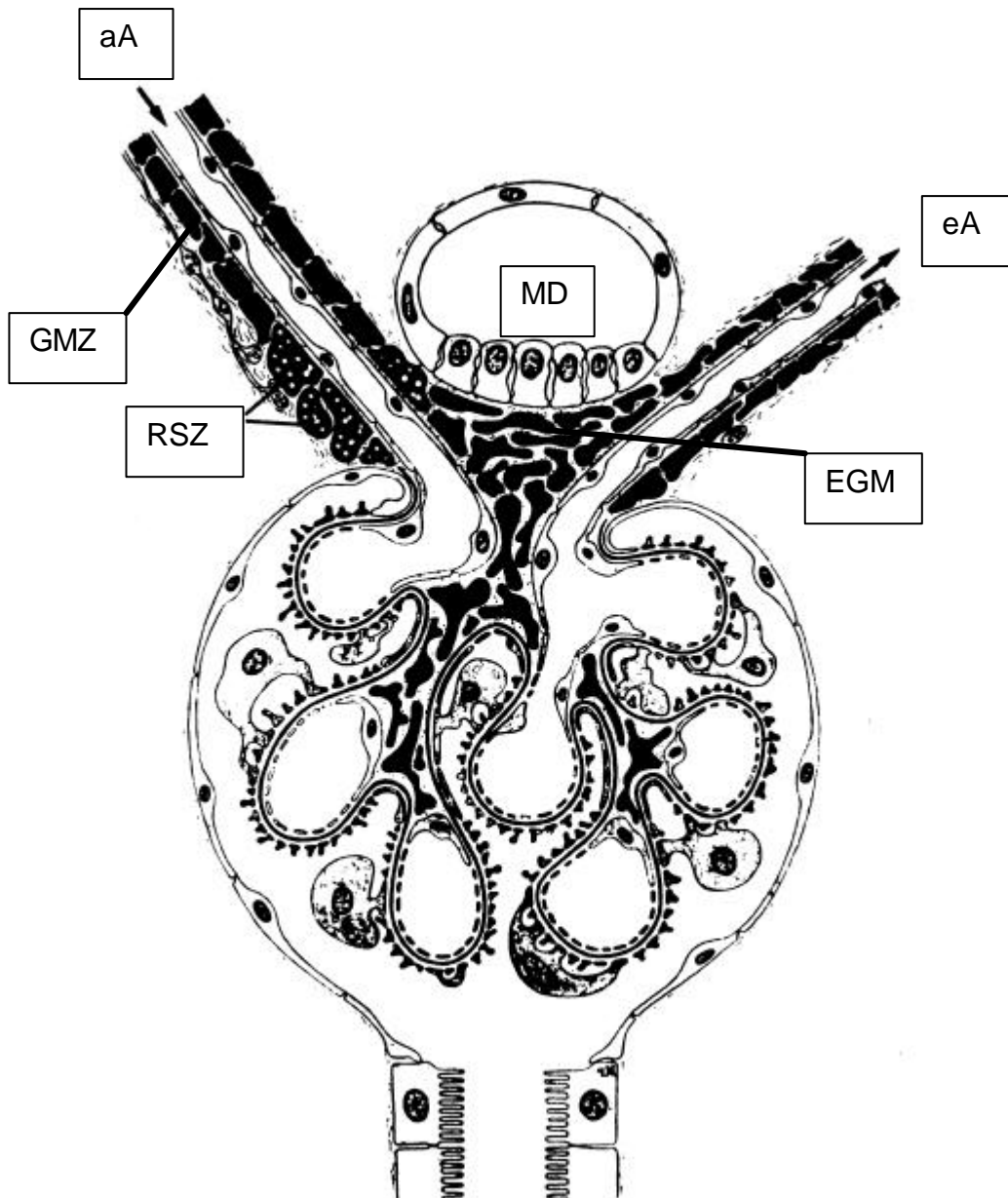


Abb. 1.2: Schematischer Querschnitt durch ein Glomerulum.

Die granulierten reninsezernierenden Zellen (RSZ) sind in der Media der afferenten Arteriole (aA) lokalisiert. Ihnen benachbart liegen glatte Muskelzellen (GMZ), extraglomeruläre Mesangiumzellen (EGM) sowie die Macula Densa Zellen (MD), welche am vaskulären Pol zwischen afferenter und efferenter Arteriole (eA) lokalisiert sind (nach Kriz, 1998).

1984). Auch über die Zeit gesehen ist die Anzahl der reninsezernierenden Zellen pro Arteriole nicht konstant. So kann es als Anpassung an sich ändernde physiologische Bedingungen (z.B. salzarme Nahrung) zu einer Umwandlung von weiter proximal gelegenen glatten Muskelzellen in reninsezernierende Zellen kommen (metaplastische Transformation; Cantin *et al.*, 1977), ein Prozess, der auch umgekehrt ablaufen kann (metaplastische Retransformation; Hackenthal *et al.*, 1990). Daraus wird deutlich, dass es zu jeder Zeit intermediäre (teilweise transformierte) Zellen gibt, die hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion zwischen glatten Muskelzellen und voll entwickelten reninsezernierenden Zellen stehen (Hackenthal *et al.*, 1990). Diese intermediären Zellen sind wie die glatten Muskelzellen ringförmig um den Endothelschlauch angeordnet, besitzen Myofilamente und zusätzlich Reningranula. Im Gegensatz dazu sind die relativ plumpen reninsezernierenden Zellen mit zahlreichen Fortsätzen versehen, weisen kaum Myofilamente auf, haben aber im Cytoplasma viele Reningranula eingelagert (Hackenthal *et al.*, 1990).

### **1.3. Kontrolle der Reninsekretion**

Die Mechanismen, die die Reninsekretion kontrollieren, kann man in drei Ebenen untergliedern, die physiologische bzw. den Gesamtorganismus betreffende Ebene, die Ebene der Botenstoffe und Mediatoren und die auf zellulärer Ebene wirksamen Faktoren. Die Übergänge zwischen der zweiten und dritten Ebene sind fließend.

Zunächst gibt es die physiologische Betrachtungsweise auf der Ebene des Gesamtorganismus, auf der drei Mechanismen angreifen:

- die renale sympathische Innervierung
- der Barorezeptor-Mechanismus
- der Macula Densa-Mechanismus.

Auf der darunterliegenden Ebene kann man solche Faktoren zusammenfassen, die als Botenstoffe und Mediatoren verwendet werden, wie

- Angiotensin II,
- Adenosin,
- NO sowie
- Arachidonsäure und ihre Metabolite

Schließlich gibt es noch die auf zellulärer Ebene wirksamen Faktoren:

- $\text{Ca}^{2+}$ ,
- Membranpotential,
- cAMP,
- cGMP sowie die
- Osmolalität.

Aus Gründen Klarheit sollen hier zunächst die letztgenannten Faktoren genauer diskutiert werden, da die Wirkung aller anderen Faktoren und Mechanismen auf diese zurückgehen.

### ***1.3.1. Die Reninsekretion auf zellulärer Ebene beeinflussende Faktoren***

Calcium

Da die Calcium-Regulationsmechanismen der reninsezernierenden Zellen nur unvollständig bekannt sind (Befunde finden sich in den Abschnitten „Membranpotential“, S. 13; „cAMP“, S. 18; „Osmolalität“, S. 20; „ANG II“, S. 21; „Adenosin“, S. 23), soll an dieser Stelle zunächst ein Überblick über die wichtigsten Calcium-Regulationsmechanismen der glatten Muskelzellen gegeben werden, aus denen sich die reninsezernierenden Zellen entwickeln. Diese Regulationsmechanismen lassen sich untergliedern in:

- Wege, auf denen Calcium in die Zelle einströmen kann,
- Calcium-Pumpen und Transporter und
- Calcium-Speicher.

Einer der Hauptwege, auf denen Calcium aus dem Extrazellulärraum über die Plasmamembran in das Innere der Zellen gelangen kann, wird durch die spannungsaktivierten Calcium-Kanäle repräsentiert, wobei der sog. L-Typ Calcium-Kanal der wichtigste Vertreter ist (Nilsson, 1998 nach Nelson *et al.*, 1988). Diese Kanäle werden durch Membrandepolarisationen aktiviert und durch Calcium-Kanalblocker (z.B. Dihydropyridine) inaktiviert (Übersicht: Hille, 1992), wobei auch andere Regulationsmechanismen beschrieben sind (Übersicht: Karaki *et al.*, 1997). Neben den spannungsaktivierten Calcium-Kanälen gibt es noch Rezeptor-gekoppelte nichtselektive Kationenkanäle sowie den sogenannten „Calcium release-activated calcium channel“ (CRAC), die einen Einstrom von Calcium in das Cytoplasma der glatten Muskelzellen erlauben (Übersichten: Karaki *et al.*, 1997; Nilsson, 1998).

Neben den Wegen, auf denen es zu einem Calcium-Einstrom kommen kann, gibt es auch eine Reihe von Mechanismen, die die  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem möglichst niedrigen Niveau halten, wozu der  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher sowie  $Ca^{2+}$ -ATPasen gehören.  $Ca^{2+}$ -ATPasen finden sich sowohl in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) als auch in der Plasmamembran (Wuytack *et al.*, 1982), wo auch der  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher lokalisiert ist (Raeymaekers *et al.*, 1985). Beide Mechanismen führen normalerweise zu einem Calcium-Auswärtstransport, können aber unter gewissen Bedingungen die Transportrichtung umkehren ( $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher) bzw. den Transport einstellen ( $Ca^{2+}$ -ATPasen) und auf diese Weise zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führen (Übersicht: Karaki *et al.*, 1997).

Schließlich müssen noch die intrazellulären Speicher sowie die Mitochondrien erwähnt werden, denen bei der Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  ebenfalls eine wichtige Rolle zukommt. Der wichtigste intrazelluläre Calcium-Speicher in den glatten Muskelzellen ist das SR, in das  $Ca^{2+}$ -ATPasen ständig Calcium-Ionen pumpen und auf diese Weise für eine niedrige  $[Ca^{2+}]_i$  sorgen. Das im SR gespeicherte Calcium kann durch die Bindung von Agonisten an metabotrope Rezeptoren und die darüber erfolgende Bildung von  $IP_3$  als auch über  $Ca^{2+}$  selbst (Calcium-induzierte Calcium Freisetzung) freigesetzt werden. Hinsichtlich weiterer, die Calcium-Freisetzung induzierende Aktivierungsmechanismen, sowie hinsichtlich der Unterteilung des SR in verschiedene Kompartimente besteht zur Zeit noch Unklarheit, was möglicherweise an gewebs- oder artspezifischen Unterschieden beruht (Übersicht: Karaki *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum SR spielen die Mitochondrien unter normalen Bedingungen wahrscheinlich keine so große Rolle, was sich zum einen an dem Größenverhältnis der beiden Calciumspeicher (SR : Mitochondrien) von 20:1 (Karaki *et al.*, 1997), zum anderen auch beim Vergleich der Affinitäten der  $Ca^{2+}$ -ATPasen im SR sowie in der Mitochondrienmembran zeigt (SR- $K_m$ : 0.91  $\mu M$ ; Mitochondrium- $K_m$ : 7.1  $\mu M$ ; Karaki *et al.*, 1997 nach Grover und Samson, 1986).

In den reninsezernierenden Zellen hemmt ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  die Reninsekretion, wogegen bei sinkender  $[Ca^{2+}]_i$  die Reninsekretion ansteigt, ein Phänomen, das als sogenanntes "Calcium-Paradox" seit langem bekannt ist (Churchill, 1985 und 1990). Es gibt zwei Hypothesen, die die Wirkung des Calciums auf die Reninsekretion zu erklären versuchen. Kurtz und Penner (1989) fanden in reninsezernierenden Zellen der Maus einen  $Ca^{2+}$ -aktivierten Chlorid-Ausstrom, welcher zu einer Abnahme der intrazellulären Osmolalität und so zu einem Schrumpfen der Zellen führen könnte. Änderungen des Zellvolumens wiederum haben Auswirkungen auf die Reninsekretion, wobei ein Schrumpfen der Zellen die



Reninsekretion inhibiert, wogegen ein Anschwellen der Zellen die Reninsekretion stimuliert (Skott, 1988). Die Wirkungsweise dieses Mechanismus wird im Abschnitt "Osmolalität" (s. S.20) näher erläutert.

Taugner *et al.* (1988) favorisieren eine andere Hypothese. Da sich reninsezernierende Zellen aus glatten Muskelzellen entwickeln und dieser Prozeß, abhängig vom physiologischem Zustand des Tieres, reversibel ist, gibt es auch Zellen, die hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Verhaltens eine Zwischenstufe einnehmen (Taugner *et al.*, 1988; s.a. Kapitel 1.2, S.8). In diesen intermediären Zellen sind die Reningranula durch ein dichtes Myofilamentnetzwerk von der Zellmembran getrennt, welches möglicherweise bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  kontrahiert, das Verschmelzen der Granula mit der Plasmamembran unterbindet und so die Reninsekretion aus diesen Zellen inhibiert (Taugner *et al.*, 1988).

Die inverse Beziehung zwischen der  $[Ca^{2+}]_i$  und der Reninsekretion wird unter anderem durch Messungen von Della Bruna *et al.* (1995) bestätigt, die bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  von 0 mM auf 3 mM über eine Stunde eine Inhibition der Reninsekretion beobachteten, sowie durch Messungen von Sosath (1999), die in isolierten reninsezernierenden Zellen bei Reduktion des extrazellulären Calciums von 2 mM auf 0 mM (nominal freie Calcium-Lösung) einen signifikanten Anstieg der Reninsekretion feststellte. In diesem Zusammenhang muß angemerkt werden, daß Schricker *et al.* (1993) an isolierten reninsezernierenden Zellen zwar ebenfalls beobachteten, daß eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_o$  die Reninsekretion inhibierte, gleichzeitig aber feststellten, daß die Inhibition nach 1-3 h schwächer wurde und sich schließlich in eine Stimulation umkehrte. Die Autoren vermuten, daß die Calcium-induzierte Inhibition der Reninsekretion möglicherweise ein indirekter Effekt ist und nur einen darunterliegenden stimulatorischen Effekt überdeckt (Schricker *et al.*, 1993).

### Membranpotential

In reninsezernierenden Zellen ist das Membranpotential besonders im Zusammenhang mit der  $[Ca^{2+}]_i$  von besonderer Bedeutung (s. Abschnitt „Calcium“, S. 11), wobei an dieser Stelle auch auf die umgekehrte Beziehung hingewiesen werden muß. Es wurde gezeigt, daß eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  gleichzeitig die reninsezernierenden Zellen depolarisiert, was auf das Vorhandensein von Calcium-abhängigen Chlorid-Kanälen hindeutet (Kurtz und Penner, 1989). Bei Öffnung dieser Kanäle kommt es zu einem Chlorid-Ausstrom, da das Chlorid-Gleichgewichtspotential positiver ist, als das Membranpotential ( $E_{Cl}$  in glatten Muskelzellen zw. -30 und -6 mV, Large und Wang, 1996 nach Aickin, 1990;  $E_n$  S. 14). Dazu kommt, daß die reninsezernierenden Zellen sowohl mit den glatten Muskelzellen als auch mit den EGM

und den Endothelzellen über gap junctions verbunden sind (Lorenz *et al.*, 1993 nach Forssman und Taugner, 1977; Hackenthal *et al.* 1990 nach Taugner *et al.*, 1984), was eine starke elektrische Kopplung zwischen diesen Zellen nach sich zieht, wie in Kapazitätsmessungen gezeigt werden konnte (Kurtz und Penner, 1989; Russ *et al.*, 1999). Dies bedeutet, daß einerseits das Membranpotential immer mit der  $[Ca^{2+}]_i$  verbunden ist und man andererseits ohne die gap junctions zu entkoppeln nie sicher sein kann, ob die beobachtete Reaktion der reninsezernierenden Zellen direkt oder indirekt verursacht wurde.

Das Membranpotential der reninsezernierenden Zellen (-35 und -70 mV, Fishman, 1976; -55 mV, Bührle *et al.*, 1984; -58 mV, Bührle *et al.*, 1985; -62 mV, Kurtz und Penner, 1989; -69 mV, Kurtz und Penner, 1990; -61 mV Russ *et al.*, 1999) kann in zwei Richtungen geändert werden, depolarisierend und hyperpolarisierend.

Ein depolarisierender Stimulus ist z.B. die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, was von Fishman (1976) sowie von Kurtz *et al.* (1990) an reninsezernierenden Zellen der Maus durchgeführt wurde. Parallel zur Depolarisation erfolgt bei Erhöhung der  $[K^+]_o$  eine Inhibition der Reninsekretion, was an isolierten, perfundierten Nieren aus der Ratte sowie in Nierenschnitten aus dem Schwein, dem Hund und der Ratte gezeigt werden konnte (Übersicht in Churchill, 1985). Diese Effekte waren von einem Calcium-Einstrom abhängig und durch Blocker spannungsaktivierter Calcium-Kanäle zu inhibieren (Park *et al.*, 1981; Ginesi *et al.*, 1983; Übersicht in Churchill, 1995).

Neben der Erhöhung der  $[K^+]_o$  führt auch die Gabe von vasokonstriktiven Agonisten wie z.B. Adrenalin, Noradrenalin und Angiotensin II zur Depolarisation der reninsezernierenden Zellen, was u.a. von Bührle *et al.* (1984, 1985 und 1986) sowie von Kurtz und Penner (1989) gezeigt werden konnte. Gabe von ANG II, Arginin-Vasopressin oder Noradrenalin führt neben der Membrandepolarisation gleichzeitig zu einer Inhibition der Reninsekretion (Bührle *et al.*, 1986). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vasokonstriktorische Substanzen wie z.B. ANG II neben dem depolarisierenden Effekt auf das Membranpotential gleichzeitig eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen hervorrufen (Kurtz *et al.*, 1986; Kurtz und Penner, 1989; Gonzáles *et al.*, 1992; s Abschnitt „ANG II“, S. 21), und daß die beobachteten Effekte auf die Reninsekretion durch gleichzeitige Gabe eines Calcium-Kanalblockers ( $10^{-5}$  M Verapamil) zu inhibieren war (Kurtz *et al.*, 1986; Kurtz, 1989). Da eine Membrandepolarisation in der Regel mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  verbunden ist, ist z.Zt. noch unklar ob es einen direkten Einfluß einer Depolarisation auf die Reninsekretion gibt.

Neben den depolarisierenden Stimuli gibt es auch solche, die die Plasmamembran der Zellen hyperpolarisieren. Grundsätzlich kann man z.B. durch Aktivierung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase einen vermehrten Auswärtstransport von  $\text{Na}^+$  induzieren, was aufgrund des Netto Auswärtstransportes einer positiven Ladung ( $3\text{Na}^+$  gegen  $2\text{K}^+$ ) zu einer Hyperpolarisation führt (Dudel, 1995).

Für reninsezernierende Zellen beschrieb Fishman (1976), dass Gabe des  $\beta_1$ -Agonisten Adrenalin eine Hyperpolarisation hervorrief, jedoch konnte diese Beobachtung von anderen nicht wiederholt werden (Bührle *et al.*, 1986). Weiterhin kommt es bei der Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren zur Bildung von cAMP (s. Abschnitt „cAMP“, S 18), so dass die gleichzeitig beobachtete Stimulation der Reninsekretion nicht auf einen direkten Effekt des Membranpotentials auf die Reninsekretion zurückgehen muß.

Als weiterer hyperpolarisierender Stimulus wirken die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner, die bei Bindung an den ATP-sensitiven Kalium-Kanal dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen, wodurch Kalium entlang seines elektrochemischen Gradienten aus der Zelle strömt, was zu der beobachteten Hyperpolarisation der Zellen führt (Ashcroft und Ashcroft, 1990; Quast, 1995 und 1996). Dies konnte an isolierten Glomeruli der Ratte auch durch elektrophysiologische Untersuchungen (current clamp) bestätigt werden, in denen LCRK ( $1\ \mu\text{M}$ ) die Zellen um rund 10 mV hyperpolarisierte (Russ *et al.*, 1999). Bestätigt wird dies auch durch Beobachtungen von Holevinsky *et al.* (1994), die in A10 Zellen, einer glattmuskulären Zelllinie, bei Gabe des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffners U83757 (= P1075) eine Hyperpolarisation feststellten. Auch in isolierten Kapillaren des Meerschweinchenherzens (Langheinrich und Daut, 1997) sowie in kultivierten glatten Muskelzellen der Harnröhre des Meerschweinchens (Gopalakrishnan *et al.*, 1999) konnte durch Gabe verschiedenster  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner (z.B. P1075, Pinacidil) eine konzentrationsabhängige Hyperpolarisation beobachtet werden. Neben dem Effekt auf das Membranpotential beobachteten Ferrier *et al.* (1989) bei Gabe des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffners Cromakalim eine konzentrationsabhängige Stimulation der Reninsekretion in gesunden Probanden, sowie an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte. Dies konnte durch Untersuchungen von Jensen *et al.* (1998) und Vallon *et al.* (1998) an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte sowie von Jensen *et al.* (1998) an isolierten afferenten Arteriolen und an perfundierten Nieren der Ratte bestätigt werden, in denen die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner Cromakalim bzw. P1075 die Reninsekretion stimulierten.

Im Gegensatz zu den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffnern bewirken Substanzen wie GBC, das zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe gehört, die Inhibition des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals. Sie binden an eine von der/den Öffnerbindungsstelle/n verschiedene Bindungsstelle, welche mit dieser/n negativ allosterisch

gekoppelt ist (Bray und Quast, 1992). Gabe des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers GBC führt bei geöffneten  $K_{ATP}$ -Kanälen zu einer Repolarisation der Membran zurück zum Ausgangspotential; Gabe von GBC alleine oder gleichzeitig mit LCRK bewirkt i.d.R. keine Änderung des Membranpotentials, was auch durch elektrophysiologische Experimente an isolierten Glomeruli der Ratte bestätigt werden konnte (Russ *et al.*, 1999). Weiterhin konnte die durch U83757 in A10 Zellen (Holevinsky *et al.*, 1994), sowie die in isolierten Kapillaren des Meerschweinchenherzens (Langheinrich und Daut, 1997) und die an glatten Muskelzellen der Harnröhre des Meerschweinchens (Gopalakrishnan *et al.*, 1999) durch Gabe eines Kanalöffners hervorgerufene Hyperpolarisation durch Applikation des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers GBC umgekehrt werden. Ebenso wie die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner haben  $K_{ATP}$ -Kanalblocker einen Effekt auf die Reninsekretion, was von Linseman *et al.* (1995) gezeigt werden konnte. In deren Untersuchungen konnte durch Gabe des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers Glyburid die Reninsekretion in Primärkulturen von reninsezernierenden Zellen der Maus inhibiert werden, wobei jedoch kein elektrophysiologischer Nachweis des Kanalblocks erbracht werden konnte (Linseman *et al.*, 1995). Weiterhin konnten auch Jensen *et al.* (1998) an isolierten reninsezernierenden Zellen, an isolierten afferenten Arteriolen sowie an isolierten perfundierten Nieren der Ratte zeigen, dass der  $K_{ATP}$ -Kanalblocker Glibenclamid die Reninsekretion inhibierte.

Die durch  $K_{ATP}$ -Kanalöffner hervorgerufenen Membranhyperpolarisationen haben aber möglicherweise genau wie die durch Gabe von  $\beta_1$ -Agonisten ausgelösten Hyperpolarisationen und die durch z.B. Vasokonstriktoren ausgelösten Depolarisationen auch keinen direkten Effekt auf die Reninsekretion (Abb.3). In Untersuchungen an Myocyten der Mesenterialarterie des Kaninchens konnte gezeigt werden, dass es bei Gabe der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Pinacidil und LCRK zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen (Ito *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1992) sowie unter Stimulation mit Noradrenalin (Ito *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1992; Yamagishi *et al.*, 1992) kommt. Dies könnte zum einen auf die Aktivierung des Natrium-Calcium-Austauschers zurückzuführen sein, der in Zellen der afferenten Arteriole des Kaninchens (Fowler *et al.*, 1996) sowie der Ratte (Nelson *et al.*, 1999) bereits charakterisiert wurde und/oder auf die geringere Aktivierung spannungssensitiver Calcium-Kanäle sowie die Hemmung der  $IP_3$ -Synthese durch die Hyperpolarisation (Quast, 1993). Letzteres führt zu einer geringeren Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und damit zu einer Reduktion des Calcium-Anstiegs. Weiterhin könnte es durch die Hyperpolarisation auch zu einer Zunahme der Konzentration an membrangebundenem  $Ca^{2+}$  kommen, was die Menge an freien Calcium-Ionen ebenfalls

verringern würde (Quast, 1993). Unter Bezugnahme auf die Stimulation der Reninsekretion durch  $K_{ATP}$ -Kanalöffner (s.o.) sowie den Effekt dieser Substanzen auf  $[Ca^{2+}]_i$  wurde die Hypothese geäußert, daß die Öffner-induzierte Hyperpolarisation zu einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen führt und darüber die Reninsekretion stimuliert (Osswald und Quast, 1995). Die inverse Beziehung zwischen Calcium und der Reninsekretion wurde bereits beschrieben (s. S. 11).

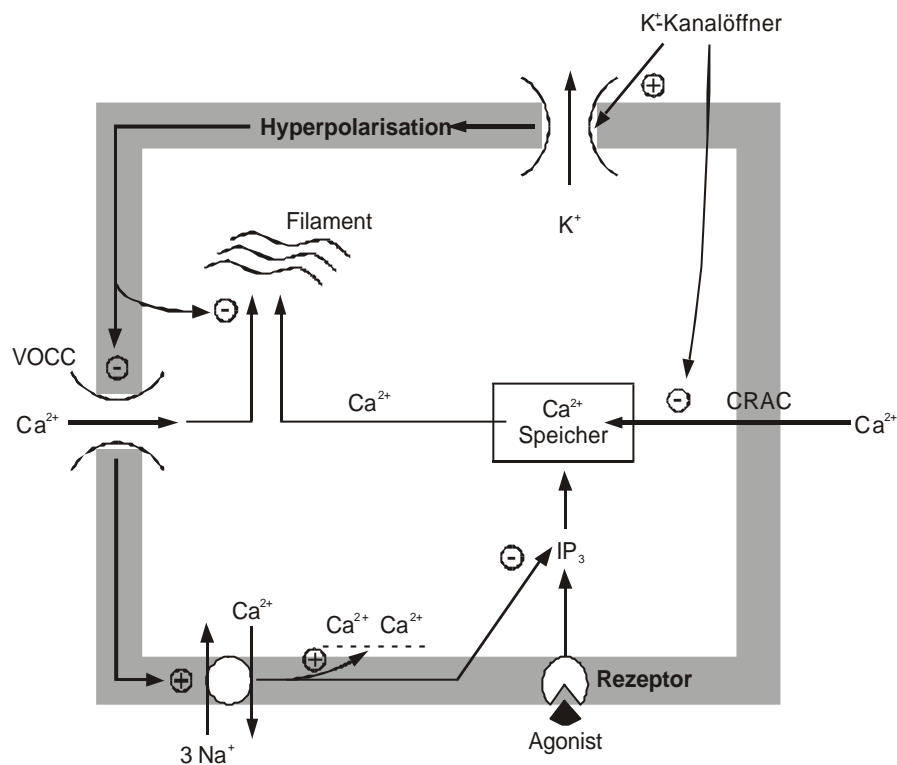


Abb. 1.3: Effekte der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner.

Die durch die Öffner induzierte Hyperpolarisation inhibiert die Öffnung spannungsaktivierter Calcium-Kanäle (VOCC), inhibiert die Agonisten-induzierte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern durch Hemmung der  $IP_3$ -Synthese und reduziert die Calcium-Sensitivität der kontraktilen Elemente. Der gesteigerte Calcium-Auswärtstransport über den  $Na^+-Ca^{2+}$ -Austauscher sowie die vermehrte Bindung von  $Ca^{2+}$  an der Innenseite der Membran sind weitere denkbare Konsequenzen der Hyperpolarisation. Weiterhin inhibieren die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner das Nachfüllen der intrazellulären Speicher über den kapazitiven Calcium-Einstrom (CRAC) (modifiziert nach Quast, 1993).

## cAMP

In den reninsezernierenden Zellen stellt cAMP einen wichtigen second messenger dar, welcher die Reninsekretion stimuliert (Übersicht: Hackenthal *et al.*, 1990). Möglicherweise werden durch cAMP  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen stimuliert, was einen vermehrten Calciumefflux und damit eine Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zur Folge hätte (Churchill, 1995). Weiterhin gibt es Hinweise, daß cAMP in der glatten Gefäßmuskulatur die Natrium-Kalium-ATPase aktiviert, was aufgrund der dadurch ausgelösten Hyperpolarisation einen vermehrten Calcium Auswärtstransport über den Natrium-Calcium-Austauscher zur Folge hätte und somit ebenfalls eine Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach sich ziehen würde (Churchill, 1995). Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist mit der Reninsekretion invers verknüpft, was im ersten Abschnitt (s. S.11) näher erläutert wurde.

Eine andere Möglichkeit, wie cAMP die Sekretion beeinflussen kann, wird von Renström *et al.* (1997) aufgrund von Untersuchungen an B-Zellen der Maus vorgeschlagen. Sie vermuten, daß cAMP auf einem noch unbekanntem Weg die Mobilisierung der Insulingranula in B-Zellen stimuliert und/oder die Verfügbarkeit der Granula erhöht, welche durch Exozytose freizusetzen sind. Gleichzeitig zeigen sie, dass dieser cAMP-Effekt nicht von einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wohl aber von der Anwesenheit von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig ist (Renström *et al.*, 1997). Aus diesem Grund vermuten sie, dass der cAMP-abhängige Schritt direkt vor dem Calcium regulierten Schritt der Exozytose stattfindet (Renström *et al.*, 1997), eine Hypothese, die auch von Fujita-Yoshigaki (1998) für Zellen der Ohrspeicheldrüse vorgeschlagen wird.

Die Synthese von cAMP aus ATP erfolgt durch das Enzym Adenylatzyklase. Dementsprechend konnten Schwertschlag und Hackenthal (1982) an isolierten, perfundierten Rattennieren unter Verwendung des Adenylatzyklaseaktivators Forskolin zeigen, daß  $10^{-7}$  M bzw.  $10^{-6}$  M Forskolin die Reninsekretion stimuliert. Della Bruna *et al.* (1991) konnten in isolierten reninsezernierenden Zellen durch Gabe von  $10^{-6}$  M Forskolin ebenfalls eine signifikante Steigerung der Reninsekretion beobachten.

Eine in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung stammt von Friis *et al.* (1999), die in isolierten reninsezernierenden Zellen der Maus bei Verwendung von  $10^{-5}$  M Forskolin eine Abnahme der Membrankapazität ( $C_m$ ), welche ein Maß für die Membranfläche der Zellen ist, feststellten. Kommt es bei der Exozytose (Reninsekretion) zur Verschmelzung von Vesikeln bzw. Granula mit der Zellmembran, so nimmt die Membranfläche und damit auch die Membrankapazität zu, bei endozytotischen Vorgängen kehrt sich dieser Prozeß um. Die gemessene Abnahme der Membrankapazität steht also zunächst im Widerspruch zu der von

Schwertschlag und Hackenthal (1982) sowie von Della Bruna *et al.* (1991) beobachteten Stimulation der Reninsekretion; allerdings könnte sie auch als Nettoergebnis einer gleichzeitig ablaufenden Exo- und Endozytose angesehen werden, wobei die Endozytose überwiegen würde (Friis *et al.*, 1999). Nach dieser Interpretation könnte also trotz der gemessenen Abnahme der Membrankapazität eine gesteigerte Sekretion stattfinden, was mit den oben erwähnten Beobachtungen von Schwertschlag und Hackenthal (1982) sowie von Della Bruna *et al.* (1991) übereinstimmen würde.

Die Hydrolyse von cAMP zu AMP wird von PDE's katalysiert, welche auf diesem Weg die Reninsekretion inhibieren. Der PDE-Inhibitor IBMX führt somit zur Erhöhung der [cAMP]<sub>i</sub> und verstärkt auf diese Weise den stimulierenden Einfluß dieses second messengers, was unter Verwendung einer Kombination von 10 µM Forskolin + 100 µM IBMX an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte gezeigt werden konnte (Sosath, 1999).

#### cGMP und NO

Da die Regulation der Reninsekretion über cGMP nur im Zusammenhang mit der Regulation durch NO gesehen werden kann, soll an dieser Stelle auf beide Mediatoren eingegangen werden.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß NO die Reninsekretion beeinflussen kann, wobei es unter Normalbedingungen ein Stimulator der Reninsekretion ist (Kurtz und Wagner, 1998). Die am bekannteste intrazelluläre Wirkung von NO ist die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase, was zur Bildung von cGMP und damit zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration in den Zellen führt (Kurtz und Wagner, 1998 nach Ignarro, 1989). cGMP wiederum inhibiert die cGMP-abhängige Phosphodiesterase- (PDE-) 3 (Beavo, 1995; Dousa, 1999), ein Enzym, dessen Expression in renalen Gefäßen von Reinhardt *et al.* (1995) nachgewiesen werden konnte. Durch Inhibition von PDE-3 kommt es zu einem verringerten Abbau von cAMP (Dousa, 1999 nach Beavo, 1995), dessen stimulatorische Wirkung auf die Reninsekretion im vorigen Abschnitt erläutert wurde. Indirekte Befunde, wonach Inhibitoren der PDE-3 wie Milrinon und Trequinsin den renalen Perfusionsfluß steigerten und damit den gleichen Effekt wie NO hervorriefen, weisen ebenfalls auf eine Rolle dieser PDE und damit auf den cAMP-Weg hin (Kurtz *et al.*, 2000). Daneben könnte die vermehrte Bildung von cGMP auch zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (GK) und darüber zur Phosphorylierung des Proteins IRAG (IP<sub>3</sub>-Rezeptor assoziiertes GK-Substrat) führen, was zur Inhibition der IP<sub>3</sub>-induzierten Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt. Diese Signalkaskade konnte durch Untersuchungen an glatten

Muskelzellen sowie an transfizierten COS-Zellen aufgeklärt werden und wird als ein möglicher Mechanismus zur Reduktion von  $[Ca^{2+}]_i$  und des Tonus in glatten Muskelzellen angesehen (Schlossmann *et al.*, 2000). Auf die inverse Beziehung zwischen  $[Ca^{2+}]_i$  und der Reninsekretion wurde bereits eingegangen (S. 11).

Daneben beschreiben Della Bruna *et al.* (1991), Gambaryan *et al.* (1998) sowie Kurtz und Wagner (1998) aber auch einen inhibitorischen Effekt von NO auf die Reninsekretion, der normalerweise durch die cAMP vermittelte Stimulation übertroffen wird. Dieser inhibitorische Weg geht ebenfalls auf die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen (GK) zurück, was auf einem allerdings noch unbekanntem Weg die Reninsekretion hemmt und möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen (z.B. erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$ ) zu beobachten ist (Kurtz und Wagner, 1998). Inhibitoren der G-Kinasen verstärkten in Experimenten an isolierten perfundierten Rattennieren die stimulatorischen Effekte des NO-Donors SNP (sodium nitroprussid = Natriumnitroprussiat), was auf die Stimulation über den oben beschriebenen cAMP-Weg hindeutet (Kurtz *et al.*, 1998).

Neben diesen Befunden konnte sowohl durch histochemische als auch durch molekularbiologische Techniken (in situ Hybridisierung, RT-PCR) gezeigt werden, dass große Mengen des Enzyms NO-Synthase in MD-Zellen sowie in glatten Muskelzellen und reninsezernierenden Zellen vorhanden sind, was als Hinweis auf die Verwendung von NO als Mediator gelten kann (Lorenz *et al.*, 1993).

### Osmolalität

Es wurde bereits erwähnt, daß Änderungen der Osmolalität der extrazellulären Lösung Auswirkungen auf die Reninsekretion haben (s. Abschnitt „Calcium“, S. 11). An dieser Stelle sollen nun die dahinterstehenden Prozesse näher erläutert werden.

Ein Schwellen der reninsezernierenden Zellen, verursacht durch eine hypoosmolale extrazelluläre Lösung, zieht ein Anschwellen der Reningranula, Fusion zwischen benachbarten Granula sowie zwischen Granula und der Plasmamembran nach sich und steigert auf diese Weise die Reninsekretion (Skott, 1988). Das Anschwellen der Granula bei der Exozytose scheint ein ubiquitäres Phänomen zu sein, welches in einer Vielzahl von Präparaten beobachtet wurde (Skott, 1988). Ungeklärt ist dabei nur die Frage, ob das Anschwellen der Granula eine Voraussetzung für die Fusion mit der Plasmamembran ist oder ob die Fusion mit der Plasmamembran einen Einstrom von Extrazellulärlösung in die Granula ermöglicht und das folgende Anschwellen bei der Auschwemmung des Inhaltes der Granula eine Rolle spielt (Skott, 1988).



Umgekehrt verhindert ein Schrumpfen der Zellen, verursacht durch eine hyperosmolale extrazelluläre Lösung, das Schwellen der Granula, deren Fusion mit der Plasmamembran und inhibiert so die Reninsekretion (Skott, 1988). Durch Applikation von 30 mM Sucrose konnten z. B. Jensen und Skott (1993) an Glomerula der Ratte mit anhängenden reninsezernierenden Zellen die Reninsekretion inhibieren. Schrickler und Kurtz (1995) beschrieben den gleichen Effekt bei Applikation von 100 mM Sucrose an isolierten reninsezernierenden Zellen der Maus.

Auf die genauen Mechanismen die durch Schwellen oder Schrumpfen der Zellen eingeleitet werden und die von Änderungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen über Änderungen des intrazellulären pH, der intrazellulären Ionenkonzentrationen und vom Protein-Phosphorylierungsgrad bis hin zur Genregulation gehen, wird hier nicht näher eingegangen (Übersicht: Lang *et al.*, 1998).

### ***1.3.2. Die Reninsekretion beeinflussende Botenstoffe und Mediatoren***

#### ANG II

Das eine Injektion von ANG II die Reninsekretion inhibiert, konnte bereits 1965 von Vander und Geelhoed an intakten Tieren gezeigt werden. Der gleiche Effekt konnte von Naftilan und Oparil an Nierenschnitten von Ratten gezeigt werden (1978) und wurde u.a. von Scholz *et al.* (1991) durch Messungen an isolierten perfundierten Rattennieren sowie von Sosath (1999) durch Messungen an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte bestätigt.

ANG II entfaltet seine inhibitorische Wirkung auf die Reninsekretion über Bindung an AT<sub>1</sub>-Rezeptoren (Kakinuma *et al.*, 1993), wobei es sich um einen metabotropen, G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist über ein G-Protein aus der G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>-Familie aktivierend an die Phospholipase C (PLC) gekoppelt, welche über die Bildung von IP<sub>3</sub> einen transienten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Peak-Phase) hervorruft (Timmermanns *et al.*, 1993 nach Griendling *et al.*, 1989). In reninsezernierenden Zellen der Maus wird dieser transiente Calcium-Anstieg von einem möglicherweise ebenfalls IP<sub>3</sub> abhängigen Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum (Plateau-Phase) gefolgt, was unter Verwendung von Calcium-freiem Puffer gezeigt werden konnte, da in diesem Fall nur die Peak-Phase zu beobachten war (Kurtz und Penner, 1989). Das es bei Gabe von ANG II zu einem Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> kommt, wurde auch für isolierte perfundierte afferente Arteriolen des Kaninchens (González *et al.*, 1992) beschrieben.

Über welchen Weg der Calcium-Einstrom (Plateau-Phase) erfolgt ist noch nicht geklärt. Kurtz und Penner konnten in reninsezernierenden Zellen der Maus keine spannungsaktivierten Calcium-Kanäle nachweisen und diskutieren eine unspezifische Kationenleitfähigkeit der Membran als Ursache für die Plateau-Phase (1989). Daneben kommt es bei Gabe von ANG II aber auch zu einer Depolarisation der Zellen, die durch Schließen von Kalium-Kanälen vom einwärts-gleichrichtenden Typ ( $K_{ir}$ ) und durch Anschalten eines Calcium-abhängigen Chlorid-Auswärtsstroms hervorgerufen wird (Kurtz und Penner, 1989). Diese Depolarisation könnte zur Öffnung spannungsaktivierter Calcium-Kanäle führen und somit zum beobachteten Calcium-Einstrom. Dies wird durch Befunde von Kornfeld *et al.* (1997) bestätigt, die in isolierten Glomerula des Kaninchens mit anhängender afferenter Arteriole bei Applikation von  $1 \cdot 10^{-8}$  M ANG II einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachteten, der bei gleichzeitiger Gabe von Nifedipin, einem Blocker spannungsaktivierter Calcium-Kanäle, im Bereich der reninsezernierenden Zellen vollständig zu inhibieren war. Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zu den oben beschriebenen Beobachtungen, nach denen zumindest der  $IP_3$ -induzierte Anstieg immer noch zu sehen sein müßte, welcher durch Nifedipin nicht inhibierbar ist (s. z.B. Seiler *et al.*, 1987; Palade *et al.*, 1989).

Nach neueren Erkenntnissen ist der Füllungszustand der intrazellulären  $IP_3$ -sensitiven Calcium-Speicher der Auslöser für einen Calcium-Einstrom über die Plasmamembran, der über sogenannte „Calcium release-activated calcium channels“ (CRAC) erfolgen soll (Parekh und Penner, 1997). Das Konzept dieses kapazitativen Calcium-Einstroms war von Casteels und Droogmans (1981) vorgeschlagen worden und wurde von Putney (1990) durch Untersuchungen an nicht erregbaren Zellen belegt und weiter verbessert. Mittlerweile gibt es auch Hinweise, dass dieser Mechanismus auch in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole der Ratte nach Entleeren des  $IP_3$ -sensitiven Speichers eine Rolle spielt, wie Fellner und Arendshorst (1999) zeigen konnten. Auf welchem Signalweg das Entleeren der intrazellulären Speicher zu einem Einstrom führt ist noch nicht bekannt. Es gibt verschiedene Modelle, nach denen es entweder einen direkten Kontakt zwischen dem Speicher und der Plasmamembran gibt (Parekh und Penner, 1997 nach Irvine, 1990) oder aber ein intermediäres Signal postuliert wird, welches wiederum direkt oder indirekt die Kanäle in der Plasmamembran aktivieren könnte (Übersicht in: Parekh und Penner, 1997). Der molekulare Aufbau und die Struktur des Kanals ist noch nicht geklärt, jedoch gibt es Hinweise auf eine mögliche funktionelle Verwandtschaft zur Familie der Rezeptor-gekoppelten TRP-Kanäle (Ma *et al.*, 2000).

## Adenosin

Gabe von Adenosin führt zur Inhibition der Reninsekretion, was direkt (Osswald *et al.*, 1978) sowie durch Experimente mit dem Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosin) bestätigt werden konnte (Kurtz *et al.*, 1988; Lorenz *et al.*, 1993; Albinus *et al.*, 1998). Bei Verwendung des A<sub>1</sub>-Antagonisten CPX, DPCPX oder Theophyllin konnte dieser Effekt inhibiert werden, was zu einer Stimulation der Reninsekretion führte (Kurtz *et al.*, 1988; Lorenz *et al.*, 1993; Albinus *et al.*, 1998). Adenosin entfaltet seine Wirkung über Bindung an A<sub>1</sub>-Rezeptoren, die über inhibitorische G-Proteine der G<sub>i/o</sub>-Familie hemmend an die Adenylatzyklase gekoppelt sind und so die Bildung von cAMP inhibieren (Oberdisse, 1997; Ralevic und Burnstock, 1998).

Ein weiterer für renale Zellen beschriebener Mechanismus, der möglicherweise an der Signalweiterleitung nach Bindung von Adenosin an den A<sub>1</sub>-Rezeptor beteiligt sein könnte, ist die Aktivierung der Phospholipase C, was zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) führt. Letzteres bewirkt schließlich die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Churchill, 1990), was einen transienten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hervorruft (Ralevic und Burnstock, 1998). Dieser Signalweg wurde sowohl für glatte Muskelzellen als auch für renale Zellen beschrieben (Ralevic und Burnstock, 1998 nach Gerwins und Fredholm, 1992 bzw. nach Weinberg *et al.*, 1989).

Es muß angemerkt werden, dass in einigen Experimenten Adenosin nur in hohen Konzentrationen und in Gegenwart des Adenosindesaminaseinhibitors Pentostatin wirksam war, weshalb ihm von einigen Autoren keine Hauptrolle bei der Signalübertragung zugesprochen wird (Lorenz *et al.*, 1993). Ungeklärt ist auch noch, ob zwischen Adenosin und ANG II eine synergistische Wirkung bezüglich der Reninsekretion besteht, wie sie für die Vasokonstriktion nachgewiesen wurde (Weihprecht *et al.*, 1994). Weiterhin könnte die Tatsache eine Rolle spielen, dass Adenosin die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenfasern inhibiert und es so zu einer indirekten Inhibition der Reninsekretion kommen könnte (Osswald und Quast, 1995).

## Arachidonsäure

Arachidonsäure konnte bei intrarenaler Infusion die Plasma-Reninaktivität steigern, weshalb vermutet wurde, dass Prostaglandine (PG) potente Stimulatoren der Reninsekretion seien (Lorenz *et al.*, 1993). Arachidonsäure als Ausgangssubstrat der PG-Biosynthese wird durch Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranphospholipiden abgespalten und durch die Cyclooxygenase zu

PGH<sub>2</sub>, einer Vorläufersubstanz vieler physiologisch bedeutsamer PG, umgewandelt. Inhibition der Cyclooxygenaseaktivität (z.B. durch Flurbiprofen) konnte die durch Reduktion der luminalen NaCl-Konzentration ausgelöste Stimulation der Reninsekretion abschwächen, was darauf hindeutet, dass zur Steigerung der Reninsekretion ein intakter Cyclooxygenase-Signalweg notwendig ist (Lorenz *et al.*, 1993). Immunhistochemisch konnte die Cyclooxygenaseaktivität zwar in extraglomerulären Mesangiumzellen (EGM) jedoch nicht in Macula Densa-Zellen (MD-Zellen) nachgewiesen werden, weshalb Lorenz *et al.* (1993) davon ausgingen, dass die beobachteten Effekte durch die Inhibition der Cyclooxygenaseaktivität der EGM verursacht wurde. Neben Prostaglandinen konnten auch Effekte anderer Arachidonsäuremetabolite (u.a. Thromboxan) auf die Reninsekretion nachgewiesen werden, so dass man davon ausgeht, dass die EGM die Reninsekretion über die Produktion dieser Substanzen modulieren können (Lorenz *et al.*, 1993).

Der Verständlichkeit wegen wurde die Rolle von NO als Regulator der Reninsekretion im Zusammenhang mit cGMP diskutiert (S. 19-20).

### ***1.3.3. Die Reninsekretion auf der Ebene des Gesamtorganismus beeinflussende Mechanismen***

#### Renale sympathische Innervierung

Die reninsezernierenden Zellen haben zahlreiche Kontakte mit sympathischen Nervenfasern, die bei Stimulation als Neurotransmitter Noradrenalin ausschütten, welches auf der postsynaptischen Seite an  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren bindet. Bindet ein Agonist an diesen Rezeptor, so kommt es zur Aktivierung eines G-Proteins ( $G_s$ ), wodurch es zur Stimulation der Adenylatzyklase kommt, welche die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert (Übersichten: Kurtz, 1989; Osswald und Quast, 1995). In den reninsezernierenden Zellen stellt cAMP einen wichtigen second messenger dar, welcher die Reninsekretion stimuliert (Hackenthal *et al.*, 1990). Die Wirkung von cAMP auf die Reninsekretion wurde in Kapitel 1.3.1. (S. 18) genauer erläutert. Im Gegensatz zur den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren führt Aktivierung von  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren zur Inhibition der Reninsekretion, die, wenn es sich um einen  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor handelt, über eine vermehrte Bildung von IP<sub>3</sub> zu einer gesteigerten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt (Osswald und Quast, 1995). Die

inverse Beziehung von intrazellulärem Calcium und der Reninsekretion wurde in Kapitel 1.3.1. (S.11) bereits beschrieben.

#### Barorezeptor-Mechanismus

Das Konzept eines druckabhängigen Mechanismus der Reninsekretion geht auf Beobachtungen zurück, nach denen es bei einem Abfall des renalen Perfusionsdrucks zu einer Stimulation der Reninfreisetzung kommt, wogegen es bei einem Anstieg des Perfusionsdrucks zu einer geringeren Reninfreisetzung kommt (Übersicht: Kurtz, 1989). Die genaue Lokalisation und Funktionsweise dieses Mechanismus sind nicht geklärt, jedoch handelt es sich nach der "Strechrezeptor-Hypothese" (Kurtz *et al.*, 1989 nach Fray *et al.*, 1984) um einen Sensor, der die Wandspannung der afferenten Arteriole mißt. Experimente mit isolierten reninsezernierenden Zellen zeigten, daß diese auf zunehmende mechanische Reizung mit der Inhibition der Reninsekretion reagierten, weshalb es sich bei dem Sensor auch um sogenannte stretch-Kanäle auf den reninsezernierenden Zellen selbst handeln könnte. Glatte Muskelzellen reagieren auf mechanische Reizung mit einer Depolarisation, weshalb vermutet wurde, dass auch die reninsezernierenden Zellen auf diese Weise reagieren könnten (Kurtz, 1989). Die Depolarisation der Plasmamembran könnte zu einem Calcium-Einstrom über spannungsaktivierte Calcium-Kanäle führen, der einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach sich ziehen würde. In Experimenten mit isolierten perfundierten Rattennieren konnte in der Tat gezeigt werden, daß Blocker spannungsaktivierter Calciumkanäle die durch erhöhten Perfusionsdruck ausgelöste Inhibition der Reninsekretion aufheben können (Jones-Dombi und Churchill, 1993). Alternativ könnte der mechanische Reiz auch direkt zur Öffnung von Ionenkanälen und damit zu einer Erhöhung der Calcium-Membranleitfähigkeit führen (Kurtz, 1989). Auf die inverse Beziehung zwischen intrazellulärem Calcium sowie zwischen dem Membranpotential und der Reninsekretion wurde bereits in Kapitel 1.3.1. (S.11-17) eingegangen.

#### Macula Densa-Mechanismus

Bei den MD-Zellen handelt es sich um Tubuluszellen, die im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife am Übergang zum distalen Tubulus lokalisiert sind und in engem räumlichen Kontakt zum Gefäßpol und damit zu den distal gelegenen reninsezernierenden Zellen stehen. Dieser Kontakt ist allerdings nicht direkt, da sich zwischen den MD-Zellen und den Gefäßzellen noch die sogenannten extraglomerulären Mesangiumzellen (EGM; auch Goormaghtigh- oder Lacis-Zellen genannt) befinden. Alle EGM sind sowohl untereinander

als auch mit Gefäßzellen der afferenten Arteriole (auch reninsezernierenden Zellen) über gap junctions verbunden (s. Kapitel 1.3.1., Abschnitt „Membranpotential“, S. 13), so dass Änderungen im intrazellulären Milieu der EGM Änderungen des intrazellulären Milieus der reninsezernierenden Zellen nach sich ziehen können. Die genauen Mechanismen, durch die die MD-Zellen letztlich die Reninsekretion beeinflussen sind nur unvollständig bekannt, als auslösendes Signal gilt aber die Änderung der luminalen NaCl-Konzentration an den MD-Zellen, was zu einer Änderung des transepithelialen Ionentransports über den in der luminalen Membran der MD-Zellen befindlichen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter führt (Greger, 1985 nach Greger und Schlatter, 1981 sowie nach Greger *et al.*, 1983; Lorenz *et al.*, 1993).

Wie die MD-Zellen dieses Signal weiterleiten und schließlich die Reninsekretion modulieren ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Änderungen in der Transportrate der MD-Zellen sich auf die ionale Zusammensetzung oder die Osmolalität des Interstitiums zwischen den MD-Zellen und den EGM auswirken, auf diese Weise funktionelle Änderungen in den EGM verursacht und so die Reninsekretion beeinflusst werden könnte. Andererseits können Schwankungen in der Osmolalität auch direkt die Reninsekretion beeinflussen, was von Skott (1988) gezeigt werden konnte (s.a. Abschnitt Osmolalität, S. 20).

Eine weitere Möglichkeit, die parallel zu der eben genannten ablaufen könnte, ist die Freisetzung von parakrinen Faktoren durch die MD-Zellen (Lorenz *et al.*, 1993). Als Kandidaten gelten v.a. Adenosin, Arachidonsäure und ihre Metaboliten sowie NO, deren Effekte bereits erläutert wurden (s. S. 19 -24).

## 1.4. Fragestellung

Die Sekretion von Renin und damit eines der wichtigsten Elemente in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Menschen steht unter der Kontrolle dreier Regulationsmechanismen und einer Vielzahl von verschiedenen Faktoren (s. Kapitel 1.3). Unter all diesen Faktoren spielt Calcium eine besondere Rolle, da im Gegensatz zu den meisten anderen sekretorischen Prozessen die intrazelluläre Konzentration dieses Ions in den reninsezernierenden Zellen invers mit der Sekretion des Renins verknüpft ist (Calcium-Paradox; Churchill, 1985 und 1990). Über die Calcium-Regulation der reninsezernierenden Zellen gibt es schon eine Vielzahl von Untersuchungen, jedoch gibt es immer noch etliche offene Fragen. So gibt es z.B. bezüglich des Vorhandenseins spannungsaktivierter Calcium-Kanäle immer noch widersprüchliche Ergebnisse, ist die Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$  von der  $[Ca^{2+}]_o$  nicht restlos geklärt und ist auch der Zusammenhang zwischen der  $[Ca^{2+}]_i$  und dem Vorgang der Sekretion immer noch unverstanden.

In dieser Arbeit sollte an dem Modell der isolierten Glomeruli mit anhängender afferenter Arteriole aus der Niere kochsalzarm ernährter Ratten Fragen bezüglich der Calciumregulation dieser Zellen geklärt werden.

Zunächst wurde jedoch mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten kochsalzarm ernährter Ratten unter Verwendung eines anti-Rattenrenin Antikörpers die Frage bezüglich der genauen Lokalisation der reninsezernierenden Zellen untersucht, was für die folgenden mikrofluorimetrischen Untersuchungen eine wichtige Voraussetzung war.

In den mikrofluorimetrischen Experimenten sollte geklärt werden, wie die  $[Ca^{2+}]_i$  reninsezernierender Zellen auf Änderungen des Membranpotentials sowie auf Änderungen der  $[Ca^{2+}]_o$  reagiert.

Desweiteren war von Interesse, wie die  $[Ca^{2+}]_i$  reninsezernierender Zellen von einem physiologischen Stimulus, dem Effektor des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems ANG II, abhängig ist.

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob reninsezernierende Zellen über einen ATP-sensitiven Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ -Kanal) verfügen und ob die Aktivierung dieses Kanals die  $[Ca^{2+}]_i$  beeinflusst.

Abschließend wurde versucht, die Abhängigkeit der Reninsekretion mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkers direkt darzustellen, wozu verschiedene die  $[Ca^{2+}]_i$  sowie die Osmolalität beeinflussende Stimuli getestet wurden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material und Versuchstiere

#### 2.1.1. Substanzen

Alexa <sup>TM</sup> 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes
ANG II	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Merck
CCCP	Sigma
Collagenase	A Boehringer
Cy <sup>TM</sup> 5 Ziege Anti-Maus IgG	Dianova
D(+)-Glucose	Merck
DiBAC <sub>4</sub> (3)	MoBiTec
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
EGTA	Sigma
Ethanol (99.9 %)	Uni - Apotheke
FluorSave <sup>TM</sup> Reagent	Calbiochem
FM 1-43	Molecular Probes
Forskolin	Sigma
Fura-2 (Azetoxymethylester)	MoBiTec
Fura-2 (Kaliumsalz)	MoBiTec
Furosemid	Aventis
GBC	Sigma
Gelatine	Fluka
HCl	Fluka
HEPES	Roth
IBMX	Aldrich
Immersionsöl (ne23 1.518)	Leica
Ionomycin	Sigma, Biomol
Isradipin	Novartis
KCl	Merck
KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *12H <sub>2</sub> O	Fluka



KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel de-Haën
LCRK	SmithKline-Beecham
2-Methybutan	Fluka
MgCl <sub>2</sub>	Merck
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Merck
NGS: Ziegen Normalserum	DAKO
NKS: Kaninchen Normalserum	DAKO
NMDG	Fluka
Paraformaldehyd	Merck
Pluronic-F127	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Renin-AK: Kaninchen Anti-Rattenrenin IgG	Dauids Biotechnologie
Rotenon	Sigma
Sucrose	Fluka
SYTO <sup>®</sup> 59	Molecular Probes
SYTO <sup>®</sup> 62	Molecular Probes
TissueTek <sup>®</sup>	Sakura
Trapanal <sup>®</sup>	BYK Gulden
Triton X-100	Serva
vWF: Maus Anti-humanen von Willebrand Factor IgG1	Roche Molecular Biochemicals

### 2.1.2. Lösungen

HEPES gepufferte Physiologische Salzlösung (HEPES-PS):

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

Die Substanzen wurden in 4500 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 5000 ml aufgefüllt.

#### a) Lösungen zur Rattenperfusion

Trapanal<sup>®</sup> (Thiopental-Na): 500 mg wurden in 20ml A. bidest. gelöst und als 1 ml Aliquot bei -20 °C aufbewahrt.

5 x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung):

NaCl	0.685 M
KCl	13.5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM

Die Substanzen wurden in 800ml A. bidest. gelöst, mit NaOH auf pH = 7.4 eingestellt, mit A. bidest. auf 1000ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

1 x PBS: 100 ml 5 x PBS wurden mit 400 ml A. bidest. verdünnt.

Paraformaldehyd-Fixierlösung:

PFA	4 g
Sucrose	3 g

Die Substanzen wurden in 50ml A. bidest. unter Zugabe von 2 - 3 Tropfen 5 N NaOH gelöst und unter Rühren auf 60 °C erwärmt.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1.068 g
---	---------

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O        0.828 g

Die Substanzen wurden in 30 ml A. bidest. gelöst, zur Paraformaldehydlösung (s.o.) zugegeben, mit NaOH auf pH = 7.4 eingestellt und mit A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

30 % Sucrose in PBS: 30 g Sucrose wurde unter Rühren in 100 ml PBS gelöst.

### *b) Lösungen zur Immunofärbung*

1 x PBS: s.o.

PBS + 2.5 % Triton X-100 + 10 % DMSO (SL)

PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO

PBS + 5 % NGS + 0.25 % Triton X- 100 + 1 % DMSO

Lösung mit AK 1 (Primärantikörper):

Renin-AK	10 µl
Anti-vWF	10 µl
Triton + DMSO (SL)	100 µl
NGS	50 µl
PBS	830 µl

Negativkontrolle

Triton + DMSO (SL)	100 µl
NGS	50 µl
NKS	10 µl
PBS	840 µl

Lösung mit AK 2 (Sekundärantikörper)

Alexa<sup>TM</sup>488 Ziege Anti-Kaninchen IgG und Cy<sup>TM</sup>5 Ziege Anti-Maus IgG wurden jeweils 1:1 mit Glycerol gemischt und als 10 bzw. 5 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Alexa <sup>TM</sup> 488	15 µl
-------------------------	-------

Cy<sup>TM</sup>5                    5 µl  
 Triton - DMSO (SL)   75 µl  
 PBS                        655 µl

Nukleinsäurefarbstoff Syto<sup>®</sup> 62

50 µl Syto<sup>®</sup> 62 wurden in 49.95 ml PBS verdünnt und in Form von 1 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Gelatinelösung zur Beschichtung der Objektträger

2.5 g Gelatine wurden mit 0.25 g KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*12H<sub>2</sub>O in 500 ml A. bidest. gelöst, die Objektträger vollständig eingetaucht und luftgetrocknet.

Poly-L-Lysin - Lösung

Die Substanz wurde als Stammlösung (1 mg / 1 ml A. bidest) bei 8 °C aufbewahrt und je nach Bedarf weiter verdünnt.

*c) Lösungen zur Fluoreszenzmessung*

DiBAC<sub>4</sub>(3) - Eichlösungen

	<b>2.8 mM KCl</b>	<b>10 mM KCl</b>	<b>25 mM KCl</b>	<b>30 mM KCl</b>	<b>40 mM KCl</b>
<b>NMDG</b>	140 mM	132.8 mM	117.8 mM	112.8 mM	102.8 mM
<b>KCl</b>	2.8 mM	10 mM	25 mM	30 mM	40 mM
<b>Gramicidin</b>	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
<b>DiBAC<sub>4</sub>(3)</b>	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprach der bei HEPES-PS angegebenen.

Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

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

Es wurden 10 µl einer 10 mM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung (DMSO / EtOH) in 99.99 ml HEPES-PS verdünnt.

1  $\mu$ M LCRK in HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Zum Ansetzen wurde eine 10 mM LCRK-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

0.3 $\mu$ M LCRK in HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Zum Ansetzen wurde eine 3 mM LCRK-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

0.3 $\mu$ M LCRK + 1  $\mu$ M GBC in HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Zum Ansetzen wurde eine 3 mM LCRK-Stammlösung und eine 10 mM GBC-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

1  $\mu$ M GBC in HEPES-PS + DiBAC<sub>4</sub>(3)

Zum Ansetzen wurde eine 10 mM GBC-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

Fura-2 - Färbelösung

Es wurden 40  $\mu$ l einer 1 mM Fura-2 Stammlösung (in DMSO) mit 50  $\mu$ l Pluronic (2 % in DMSO) gelöst und zu 1.91 ml HEPES-PS gegeben. Die Lösung wurde gemischt und für ca. 2 min mit Ultraschall behandelt. Zu dieser Lösung wurden 500  $\mu$ l der Glomerula-Suspension (in HEPES-PS) gegeben.

HEPES-PS + EGTA / HEPES-PS + Ca<sup>2+</sup>-EGTA

	<b>HEPES-PS + Ca<sup>2+</sup>-EGTA</b>	<b>HEPES-PS + EGTA</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</b>	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>Ionomycin*</b>	5, 10, 50 $\mu$ M	5, 10, 50 $\mu$ M
<b>CCCP*</b>	25, 50 $\mu$ M	25, 50 $\mu$ M
<b>Rotenon*</b>	10, 20 $\mu$ M	10, 20 $\mu$ M

\* Diese Substanzen wurden nur bei den intrazellulären Kalibrierungen zugesetzt.

Die Substanzen wurden in 15 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.2 eingestellt und mit A. bidest auf 20 ml aufgefüllt.

0 Ca<sup>2+</sup>-Puffer / 0 Ca<sup>2+</sup>-Puffer + 30 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>

	0 Ca <sup>2+</sup> -Puffer	0 Ca <sup>2+</sup> -Puffer + 30 mM [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub>
<b>NaCl</b>	132.5 mM*	105.3 mM**
<b>KCl</b>	2.8 mM	30 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 mM	2 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0 mM	0 mM
<b>HEPES</b>	10 mM	10 mM
<b>D(+)-Glucose</b>	11 mM	11 mM
<b>EGTA</b>	5 mM	5 mM

\* 7.5 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 5 mM EGTA und die Titration mit NaOH.

\*\* 34.7 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 5 mM EGTA, die Titration mit NaOH und die Zugabe von 27.2 mM KCl.

Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

KCl-Puffer

	20 mM KCl	30 mM KCl	60 mM KCl
<b>NaCl</b>	122.8 mM	112.8 mM	82.8 mM
<b>KCl</b>	20 mM	30 mM	60 mM

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprach der bei HEPES-PS angegebenen.

Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

5 mM / 20 mM Ca<sup>2+</sup> - Puffer

	5 mM Ca <sup>2+</sup>	20 mM Ca <sup>2+</sup>
<b>NaCl</b>	134 mM*	111.5 mM**
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	5 mM	20 mM

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprach der bei HEPES-PS angegebenen.

\* 6 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 4 mM CaCl<sub>2</sub>

\*\* 28.5 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 19 mM CaCl<sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

5 mM Ca<sup>2+</sup> + 20 mM K<sup>+</sup> - Puffer

<b>NaCl</b>	116.8 mM*
<b>KCl</b>	20 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	5 mM

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprach der bei HEPES-PS angegebenen.

\* 23.2 mM NaCl weniger als Ausgleich für die Zugabe von 4 mM CaCl<sub>2</sub> und 17.2 mM KCl.

Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

1 µM LCRK in HEPES-PS

Zum Ansetzen wurde eine 10 mM LCRK-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

0.3µM LCRK in HEPES-PS

Zum Ansetzen wurde eine 3 mM LCRK-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

1 µM GBC in HEPES-PS

Zum Ansetzen wurde eine 10 mM GBC-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

10<sup>-7</sup> M Isradipin in HEPES-PS

Zum Ansetzen wurde eine 1 mM Isradipin-Stammlösung (in DMSO / EtOH gelöst) verwendet.

ANG II in HEPES-PS

Zum Ansetzen wurde eine 1 mM Stammlösung (in A. bidest gelöst) verwendet, die je nach verwendeter Konzentration mit HEPES-PS verdünnt wurde. Die Lösung wurde bei 8 °C aufbewahrt und maximal an zwei aufeinander folgenden Tagen verwendet.

Poly-L-Lysin - Lösung

Die Substanz wurde als Stammlösung (1 mg / 1 ml A. bidest) bei 8 °C aufbewahrt und je nach Bedarf weiter verdünnt.

*d) Lösungen zum Nachweis der Exo-, Endozytose*

HEPES-PS: s.o.

HEPES-PS + FM 1-43

FM 1-43 wurde in A. bidest gelöst und in Form von 5 µl Aliquots in einer Konzentration von 1 mM bei - 20 °C aufbewahrt.

Färbeansatz: 15 µM FM 1-43 in HEPES-PS.

HEPES-PS + 30 µM Forskolin + 300 µM IBMX

Forskolin bzw. IBMX lagen als 10 mM bzw. 50 mM Stammlösungen in DMSO / EtOH vor und wurden bei 4 - 8 °C aufbewahrt.

Färbeansatz: 15 µM FM 1-43 + 30 µM Forskolin + 300 µM IBMX in HEPES-PS.

HEPES-PS + 3 µM ANG II

ANG II lag als 10 µl Aliquot einer 1 mM Stammlösung in A. bidest vor.

Färbeansatz: 15 µM FM 1-43 + 3 µM ANG II in HEPES-PS.

Nominal Calcium-freie Lösung

Die Zusammensetzung entsprach HEPES-PS, wobei hier kein  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt wurde. Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

Färbeansatz: 15 µM FM 1-43 + 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer

Nominal Calcium-freie Lösung + 30 µM Forskolin + 300 µM IBMX

Färbeansatz: 15 µM FM 1-43 + 30 µM Forskolin + 300 µM IBMX in 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer.

10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer

Die Zusammensetzung entsprach HEPES-PS, wobei die Menge an  $\text{CaCl}_2$  von 1 mM auf 10 mM erhöht, gleichzeitig aber die Menge an NaCl von 140 mM auf 126.5 mM (zum Ausgleich der Osmolarität) erniedrigt wurde. Die Substanzen wurden in 80 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + 300 nM ANG II

ANG II lag als 10 µl Aliquot einer 1 mM Stammlösung in A. bidest vor.



Färbeansatz: 15  $\mu\text{M}$  FM 1-43 + 300 nM ANG II in 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  - Puffer.

100 mM Sucrose-Puffer

Die Zusammensetzung entsprach HEPES-PS, wobei hier zusätzlich 100 mM Sucrose zugesetzt wurden. Die Substanzen wurden in 900 ml Puffer 1 gelöst, der pH mit NaOH auf 7.4 eingestellt und mit Puffer 1 auf 1000 ml aufgefüllt.

Färbeansatz: 15  $\mu\text{M}$  FM 1-43 in 100 mM Sucrose-Puffer.

Nukleinsäurefarbstoff Syto<sup>®</sup>59

2  $\mu\text{l}$  Syto<sup>®</sup>59 wurden in 1800  $\mu\text{l}$  HEPES-PS verdünnt. Dazu wurden 200  $\mu\text{l}$  der Glomeruli-Suspension in HEPES-PS gegeben, so dass der Farbstoff 1:1000 verdünnt vorlag.

### ***2.1.3. Versuchstiere***

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH) mit einem Körpergewicht von 200-350 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Als Futter erhielten sie entweder eine Standarddiät (Altromin C1324: 2.5 g/kg  $\text{Na}^+$ , 3.6 g/kg Cl) oder nach einer einmaligen Furosemid-Applikation (10 mg/kg, i.p.; die Applikation wurde von Frau PD Dr. med. M. Albinus, Pharmakologisches Institut durchgeführt) für mindestens zwei Wochen eine kochsalzarme Diät (Altromin C1036: 150 mg/kg  $\text{Na}^+$ , 3 mg/kg Cl). Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

## **2.2. Methoden**

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

Nach dem Töten der Ratten durch cervicale Dislokation und Dekapitation wurde der Bauch durch einen medianen Schnitt eröffnet, die Nieren entnommen und in 37°C warme HEPES-PS überführt. Eine Niere wurde sofort präpariert, die zweite in HEPES-PS bei 8 °C bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Die Art der Aufbewahrung hatte keinerlei Auswirkungen auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und die daraus gewonnenen Ergebnisse. Dieser

Befund wird auch durch elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt, nach denen die elektrischen Eigenschaften der reninsezernierenden Zellen durch die Aufbewahrung bei 8 °C nicht verändert waren (Dr. U. Russ, pers. Mitteilung). Bei der Präparation wurde die Nierenkapsel entfernt, die Niere mittels einer scharfen Rasierklinge längs halbiert und das Fettgewebe entfernt. Zur Vermeidung von Kontaminationen des Präparates (z.B. Proteasen, Keime) sowie zur Vermeidung von Infektionen wurden Latex-Handschuhe (Baxter Healthcare Corp., CA, U.S.A.) getragen.

Zur Isolierung der Glomerula wurde zunächst die Siebpräparation nach Misra (1972) in modifizierter Form durchgeführt. Dabei wurden die Nierenhälften (Cortex zum Sieb gerichtet) mit dem Daumen nacheinander durch Siebe mit der Maschenweite 280 µm und 160 µm gepresst und es wurde jeweils mit erwärmter (37 °C) HEPES-PS gründlich nachgespült. Die Glomerula wurden schließlich auf einem 63 µm Sieb gesammelt, nochmals gespült, in HEPES-PS überführt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Um die in den Fluoreszenzmessungen gewonnenen Daten besser mit elektrophysiologischen Daten vergleichen zu können (v.a. Kurtz und Penner, 1989 und 1990; Russ *et al.*, 1999), wurde zur Klärung der Effekte von ANG II (Kapitel 3.3) die enzymatische Präparation nach Kurtz und Penner (1989) bzw. Metzger und Quast (1996) in modifizierter Form verwendet. Für elektrophysiologische Untersuchungen (patch clamp) ist es unbedingt notwendig, dass die Oberflächen der Zellen frei zugänglich sind, da sonst kein dafür notwendiger direkter Kontakt zwischen Elektrode und Zelloberfläche möglich ist.

Bei der enzymatischen Präparation wurden die Nierenhälften (Schnittfläche nach unten) mit einer scharfen Rasierklinge zerkleinert und in vorgewärmte (37 °C) HEPES-PS + Collagenase (1 mg/ml) überführt. Anschließend werden die Nierenstücke bei einer frisch entnommenen Niere für 55 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei Präparation einer bei 8 °C aufbewahrten Niere betrug die Inkubation im Schüttelwasserbad nur 30 min, da das Gewebe durch die Aufbewahrung in HEPES-PS nicht mehr die gleiche Festigkeit besaß wie in frischem Zustand. Die Suspension wurde danach über Siebe der Maschenweite 200 µm und 125 µm gefiltert, die Glomerula in einem 63 µm Sieb aufgefangen, in HEPES-PS überführt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Voraussetzung zur Durchführung elektrophysiologischer Experimente wird durch Behandlung des Präparates mit Collagenase erfüllt, war für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente jedoch nicht notwendig, deswegen erfolgten die meisten Präparationen nach der Siebpräparation. Neben der Vergleichbarkeit der Daten hatte die enzymatische Präparation auch den Vorteil, dass die Anzahl an Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole

gegenüber der Siebpräparation erhöht war. Kurtz und Penner (1989) erhielten bei enzymatischer Präparation  $\approx 10\%$  Glomerula mit anhängender afferenter Arteriole, wogegen es nach eigener Beobachtung bei der Siebpräparation nur ca. 5% waren.

### **2.2.2. Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Charakterisierung und Lokalisation der reninsezernierenden Zellen in der afferenten Arteriole der Ratte wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Weiterhin wurde untersucht ob, wie in der Literatur (Bührle *et al.*, 1984; Hackenthal *et al.*, 1987) beschrieben, durch eine einmalige Applikation von Furosemid (10 mg/kg, i.p.) und eine anschließend mindestens 14 tägige NaCl-arme Ernährung (vgl. Kapitel 2.1.3, S. 37) die Anzahl der reninsezernierenden Zellen erhöht wird. Dazu wurden Nierenschnitte von 4 Ratten, die mit Standarddiät ernährt worden waren mit Nierenschnitten von 4 Ratten verglichen, die die NaCl-arme Diät erhalten hatten. Hierzu wurden Kryoschnitte der Rattennieren angefertigt und anschließend gefärbt.

#### **2.2.2.a) Anfertigung der Kryoschnitte**

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (22 °C) und wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Eine Ratte wurde mit Thiopental-Natrium (90 mg/kg; i.p.) narkotisiert, so daß nach ca. 10 - 15 min keine Reflexe mehr feststellbar waren und mit der Präparation begonnen werden konnte.
- Es wurden zwei Schnitte entlang der Medianlinie zu den Rippenbögen gemacht, das Diaphragma geöffnet, die Rippen durchgeschnitten und nach hinten weggeklappt.
- Mit der linken Hand wurde das Herz gegriffen, die linke Ventrikelspitze abgeschnitten und ein PE-Schlauch (2 mm o.d., 1 mm i.d.) in die Aorta eingeführt, bis er mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand gut zu greifen war. Danach wurde das rechte Atrium mit einem Schnitt geöffnet.
- Es wurden 50 ml PBS perfundiert.
- Anschließend wurden 90 - 100 ml Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA) perfundiert.
- Die Nieren wurden entnommen, halbiert und die Nierenkapsel entfernt.

- Die Nierenhälften werden für 60 min bei 8 °C in PFA-Fixierlösung nachfixiert,
- anschließend in PBS gewaschen
- und für 60 min bei 8 °C in PBS inkubiert.
- Schließlich inkubierte man sie zur Dehydratation über Nacht (12 h) in einer 30 %igen Sucroslösung (8 °C).
- Am nächsten Tag wurde jeweils eine Nierenhälfte mit der Schnittfläche nach unten in ein aus Alufolie vorgefertigtes Töpfchen gelegt und mit dem Gewebekleber Tissue-Tek<sup>®</sup> überschichtet.
- Die Alutöpfchen wurden dann in ein mit 2-Methylbutan (Isopentan) gefülltes Alugefäß gehalten, welches in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Dies geschah, bis die Nierenhälften komplett durchgefroren waren. Die fixierten Organpräparate konnten nun bei -80 °C aufbewahrt werden.
- Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Nierenhälften mit Tissue-Tek<sup>®</sup> auf eine Halterung des bereits vorgekühlten Kryostaten "geklebt" und Schnitte mit der gewünschten Dicke (hier 20 - 25µm) angefertigt. Es wurden immer zwei Schnitte auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger (76 x 26 mm, Menzel) aufgebracht und für 10 - 15 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt.

### *2.2.2.b) Färbung der Kryoschnitte*

Zur Immunofärbung benötigt man einen Primärantikörper, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist, und einen Sekundärantikörper, der gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, gerichtet ist. Der Sekundärantikörper wird im Überschuß zugegeben, womit man sicherstellt, daß möglichst alle Bindungsstellen (= Primärantikörper) besetzt werden und man ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erhält. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird weiterhin durch Verwendung eines Normalserums verbessert, das aus der gleichen Spezies stammt, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde. Die Wirkung des Normalserums beruht auf der Bindung an unspezifische Bindungsstellen, die somit dem Sekundärantikörper nicht mehr zugänglich sind.

Als Primärantikörper zum Nachweis des Rattenrenins und damit der reninsezernierenden Zellen wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Kaninchen-Anti-Rattenrenin IgG) benutzt, der mir freundlicherweise von Frau PD Dr. med. M. Albinus (Pharmakologisches

Institut, Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde (s.a. Sosath, 1999). Zur Gewinnung des Antikörpers waren Kaninchen mit einem synthetisch hergestelltem Peptidanalogen des Rattenrenins immunisiert worden, welches die Aminosäuresequenz 303 - 319 des Renins repräsentiert. Die Aufreinigung des Antikörpers sowie die Überprüfung der Spezifität im Western-Blot stehen noch aus.

Der Nachweis der Primärantikörper im Präparat erfolgte mit einem fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper aus der Ziege (Alexa 488, Ziege Anti-Kaninchen IgG), dessen Absorptionsmaximum bei 488 nm und dessen Emissionsmaximum bei 590 nm (grün) liegt. Dieser Farbstoff konnte durch einen Argon-Laser angeregt und mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops detektiert werden.

Um die Orientierung im Kryoschnitt zu erleichtern wurde zeitgleich zur oben geschilderten Färbung eine zweite Färbung durchgeführt, welche spezifisch gegen Endothelzellen gerichtet war. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den "von Willebrand Faktor" benutzt. Der von Willebrand Faktor (= Faktor VIII, antihämophiles Globulin A) wird von Endothelzellen gebildet und ermöglicht bei der Blutgerinnungskaskade die Anlagerung der Thrombozyten an Kollagenfasern. Gegen diesen Primärantikörper wurde ein fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper aus der Ziege benutzt (Cy<sup>TM</sup>5, Ziege Anti-Maus IgG), dessen Absorptionsmaximum bei 651 nm und dessen Emissionsmaximum bei 674 nm (rot) liegt. Dieser Farbstoff wurde mit einem He-Ne-Laser angeregt und wurde ebenfalls mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop detektiert.

Die Färbung der Kryoschnitte erfolgte in einer feuchten Kammer, wobei es sich um eine Metallbox handelte, welche mit Kleenex-Tüchern ausgelegt war, die mit A. bidest angefeuchtet wurden. In der Kammer befanden sich noch zwei Kunststoffeinsätze, auf die die Objektträger gelegt werden konnten. Die Kammer konnte mit einem Metalldeckel abgedeckt werden. Alle Lösungen wurden mit einer Pipette aufgetropft.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut (15 - 30 min).
- Nach 15 - 30 min wurden die Objektträger mit einem Kleenex-Tuch vorsichtig abgetupft und die Nierenschnitte mit einem Fettstift (DAKO Stift für die Immunohistochemie, DAKO) umrandet.
- Die Schnitte wurden 10 min mit PBS gewaschen und anschließend
- zur Permeabilisierung der Zellmembran 3 mal 10 min mit PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO inkubiert, wobei immer nach 10 min die Lösung gewechselt wurde.

- Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min mit PBS + 5 % NGS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO.
- Die Präparate wurden über Nacht (12h) bei 8 °C mit AK 1 bzw. NKS (Negativkontrolle) in PBS + 5 % NGS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO inkubiert und
- am nächsten Tag für 3 x 10 min mit PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO gewaschen.
- Die Präparate wurden 90 min mit AK 2 in PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO inkubiert und anschließend
- 3 x 10 min mit PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO gewaschen.
- Die Schnitte wurden mit zwei Tropfen FluorSave™ Reagent eingedeckt und mit einem Deckglas (16 x 32 mm, Menzel) versehen. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Präparate bis zur Auswertung bei 8°C im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.2.2.c) Immunfluoreszenzfärbung an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte

Weiterhin wurde die Methode der Immunfluoreszenz auch auf frisch isolierte reninsezernierende Zellen angewandt, die von NaCl-arm ernährten Ratten stammten. Die Isolierung der Zellen erfolgte wie bei Sosath (1999) beschrieben und wurde von Frau PD Dr. med. M. Albinus (Pharmakologisches Institut, Tübingen) durchgeführt. Zum Aufbringen der isolierten reninsezernierenden Zellen wurden Objektträger zunächst mit 99.9 % Alkohol, dann gründlich mit A. bidest. gespült und mit einem Kleenex-Tuch getrocknet. Dann wurden die Objektträger mit 100 µl einer mit A. bidest 1:5 verdünnten Poly-L-Lysin Stammlösung beschichtet und luftgetrocknet. Die Färbung der Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und es wurde nach dem folgendem Schema verfahren:

- 40 µl Zellsuspension (ca. 4.500 Zellen) wurden bei Raumtemperatur auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgetropft und mit 200 µl PBS verdünnt.
- Danach folgte eine 15 min Wartezeit, während der sich die Zellen absetzen konnten.
- Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit abgegossen und die Zellen mit einem Fettstift umrandet.
- Danach wurden die Zellen 30 min mit 3.7 % PFA + 3 % Sucrose in PBS inkubiert,
- 10 min mit PBS gewaschen,

- 10 min mit 1 % PFA in PBS nachfixiert,
- zur Permeabilisierung der Zellmembran 10 min mit 0.5 % Saponin in PBS gewaschen und für
- 60 min mit 5 % NGS in PBS präinkubiert.
- Über Nacht (12h) wurden die Präparate bei 8 °C mit AK 1 (1:100) bzw. NKS (Negativkontrolle) in PBS + 5 % NGS inkubiert.
- Am nächsten Tag wurden sie 3 x 10 min mit PBS gewaschen und anschließend
- 90 min mit AK 2 (1:100) in PBS inkubiert.
- Danach folgten 3 x 10 min waschen mit PBS,
- 10 min Inkubation mit 5 µM SYTO 62 in PBS und
- 10 min waschen mit PBS.
- Schließlich wurden die Präparate mit zwei Tropfen FluorSave™ Reagent (Calbiochem) versehen. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Präparate bis zur Auswertung bei 8 °C aufbewahrt.

### **2.2.3. Fluoreszenzmessungen**

#### *2.2.3.a) Messapparatur*

Fluoreszenz ist ein physikalischer Prozess, bei dem ein Molekül energiereiche Strahlung absorbiert und diese Energie in Form von Strahlung längerer Wellenlänge wieder emittiert.

Um sich dieses Phänomen zunutze zu machen, benötigt man drei Dinge:

- eine Energiequelle, mit der die Anregungsstrahlung erzeugt wird,
- eine Substanz, deren Moleküle die Anregungsstrahlung absorbieren und einen Teil davon in Form von Fluoreszenzlicht emittieren und
- ein System, mit dem dieses abgegebene Licht (Emissionslicht) detektiert werden kann.

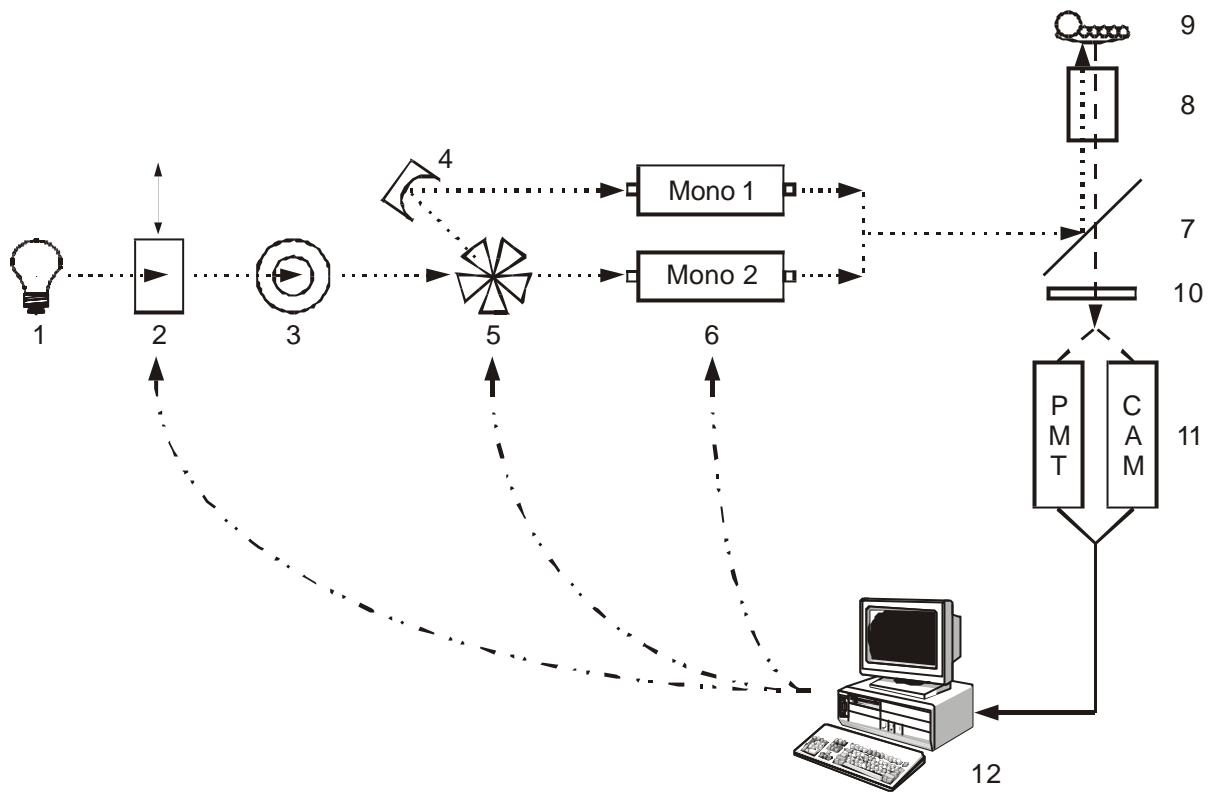
Zur Erzeugung der Anregungsstrahlung und zur Detektion des Emissionslichts wurde eine von Photon Technology International (PTI, NJ, U.S.A.) entwickelte Messapparatur verwendet, deren Funktionsprinzip im Folgenden erläutert wird (s.a. Abb.: 2.1).

Als Energiequelle diente eine 75W Xenon-Kurzbogenlampe (XBO 75W / 2 OFR, Osram, D), deren Lichtstrahl durch einen Verschluss unterbrochen und deren Lichtmenge durch eine Ringblende reguliert werden konnte. Bei Anregung mit nur einer Wellenlänge (Membranpotentialmessungen) gelangte das Licht bei geöffnetem Verschluss durch die

Ringblende in einen Monochromator. Bei Anregung mit zwei Wellenlängen (Calciummessungen) wurde das Licht abwechselnd in einen von zwei Monochromatoren gelenkt, wozu ein sich drehendes Spiegelrad diente, das den Lichtstrahl je nach Stellung in den einen Monochromator passieren ließ oder zu einem zweiten Spiegel reflektierte, von dem das Licht in den zweiten Monochromator gelenkt wurde. Bei den Monochromatoren handelte es sich um Gittermonochromatoren, in denen das eintretende Licht bei Auftreffen auf das Beugungsgitter entsprechend der Wellenlänge aufgespalten wurde. Die Stellung des Gitters konnte über die Software verändert und dadurch Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugt werden. Die Monochromatoren waren an ihren Ein- und Ausgängen mit Schlitzblenden ausgestattet, die es erlaubten sowohl die eintretende als auch die austretende Lichtmenge zu regulieren. Die Blenden an den Eingängen waren so eingestellt, dass die Intensitäten der beiden Wellenlängen ungefähr gleich waren. Die Blenden an den Ausgängen waren maximal geöffnet, um die gesamte Menge des Anregungslichts für die Messung zur Verfügung zu haben. Weiterhin konnte an den Ein- als auch an den Ausgängen der Monochromatoren die Spaltbreite und darüber die Bandbreite des Lichts eingestellt werden. Bei den hier verwendeten Monochromatoren bewirkte eine Änderung der Spaltbreite um 1 mm eine Änderung der Bandbreite um 4 nm.

Von den Monochromatoren aus gelangte das Anregungslicht über einen Lichtleiter zu einem inversen Mikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan), in dem das kurzwellige Anregungslicht über einen Strahlteiler (dichroischer Spiegel) zu einem Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektiv (N.A.: 1.3, CF Fluor 40 x, Nikon) gelenkt wurde, durch welches das Licht zum Präparat gelangte. Im Präparat, das zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt worden war, wurden die Farbstoffmoleküle durch das eintreffende Licht angeregt und emittierten einen Teil der aufgenommenen Energie als Fluoreszenzlicht. Das Emissionslicht war aufgrund des Energieverlustes energieärmer (längerwelliger) als das Anregungslicht, was als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird. Ein Teil des Emissionslichts gelangte über das Objektiv erneut zum dichroischen Spiegel, der in diese Richtung das längerwellige Emissionslicht passieren ließ, die kürzerwellige Anregungsstrahlung aber zum größten Teil reflektierte. Ein nachgeschalteter Sperrfilter hielt auch die Reste der Anregungsstrahlung zurück, so dass nur das emittierte Licht detektiert wurde. Die Detektion erfolgte mit einem Photomultiplier (PMT 710, PTI) oder einer Restlichtkamera (IC-200, PTI), die die eintreffenden optischen Signale in elektrische umwandelten, verstärkten und zu einem Computer weiterleiteten. Der Computer diente zur Steuerung der Aufnahmen, zur Datenspeicherung und -auswertung.





- 1 Lichtquelle
- 2 Verschuß
- 3 Ringblende
- 4 Spiegel
- 5 Spiegelrad
- 6 Monochromatoren (Mono 1 / 2)
- 7 Dichroischer Spiegel
- 8 Objektiv
- 9 Präparat
- 10 Sperrfilter
- 11 Photomultiplier (PMT) / Kamera (CAM)
- 12 Computer

- .....▶ Kurzwelliges Anregungslicht
- ▶ Langwelliges Emissionslicht
- ▶ Elektrisches Signal
- · - · - ·▶ Steuerung durch Computer

Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Messapparatur

Bei der Auswertung (s. Abb. 2.2) wurde immer zuerst ein Kontrollwert ( $MW_{Kon}$ ) ermittelt. Bei einer Änderung des Messwertes ( $MW$ ) aufgrund der Gabe einer Substanz oder der Änderung einer Ionen-Konzentration wurde die maximale Amplitude der Änderung des Messwertes ( $MW_{Max}$ ) erfasst. Bildete man die Differenz  $MW_{max} - MW_{Kon}$ , so erhielt man die Änderung des Messwertes ( $\Delta MW$ ). Erfolgte eine zweite Stimulation, so wurde zunächst  $MW_{Kon2}$ , dann  $MW_{max2}$  bestimmt und daraus  $\Delta MW2$  errechnet. Alle Werte wurden in Tabellen erfasst und die Mittelwerte und der SEM berechnet.

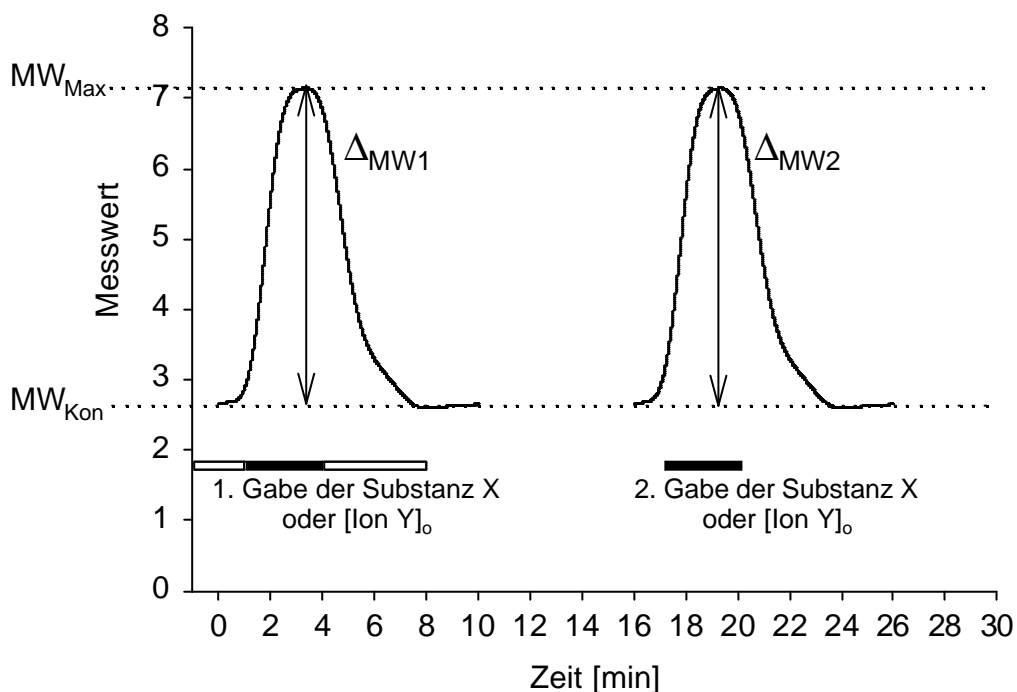


Abb. 2.2: Darstellung der Datenauswertung.

Zuerst wurde ein Kontrollwert ( $MW_{Kon}$ ) erfasst, anschließend die maximale Amplitude des Messwertes ( $MW_{Max}$ ). Bildet man die Differenz der beiden Werte, so erhält man die maximale Amplitude der Änderung des Messwertes ( $\Delta MW$ ).

Bei allen Fluoreszenzexperimenten wurde eine eigens konstruierte metallene Perfusionskammer (Werkstatt Pharmakologisches Institut, Tübingen) benutzt, in die Deckgläser ( $\varnothing$  30 mm, # 1, Menzel, D) eingesetzt wurden, welche als Kammerboden funktionierten (Abb. 2.3). Diese waren mit 120  $\mu$ l einer mit A. bidest 1:6 verdünnten Poly-L-

Lysin Stammlösung beschichtet worden und wurden nicht länger als zwei Tage nach Beschichtung für Experimente verwendet.

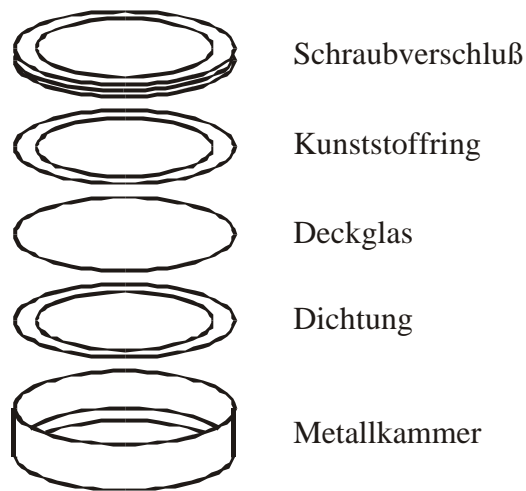


Abb. 2.3: Aufbau der Perfusionskammer

Der Zulauf von Lösungen in die Kammer erfolgte über ein Schlauchsystem, das in einer gebogenen Injektionsnadel mündete. Die Absaugung bestand ebenfalls aus einer Injektionsnadel, die über einen Kunststoffschlauch mit einem Auffanggefäß verbunden war. Dort wurde über eine Membranluftpumpe ein Unterdruck erzeugt, welcher das konstante Absaugen der Badlösung gewährleistete. Als Vorratsgefäße für die Pufferlösungen dienten ein 500 ml Kunststoffgefäß sowie sechs 50 ml Kunststoffspritzen, deren Ausgänge über Drei-Wege-Hähne miteinander verbunden waren, womit auch der Zulauf der einzelnen Pufferlösungen gesteuert werden konnte. Zwischen die Vorratsgefäße und den Zulauf war ein Tropf geschaltet, der für einen konstanten, luftblasenfreien Fluß sorgte. Der Zulauf selbst führte durch eine 50 ml Kunststoffspritze, die mit einem Wasserbad (Medingen, D) verbunden war, wodurch die zufließenden Pufferlösungen auf 37 °C erwärmt wurden. Die Vorratsgefäße waren an einer Metallstange befestigt und befanden sich 20 cm oberhalb der Perfusionskammer, so daß die Gravitation als treibende Kraft für den Lösungsfluß diente (s. Abb. 2.4).

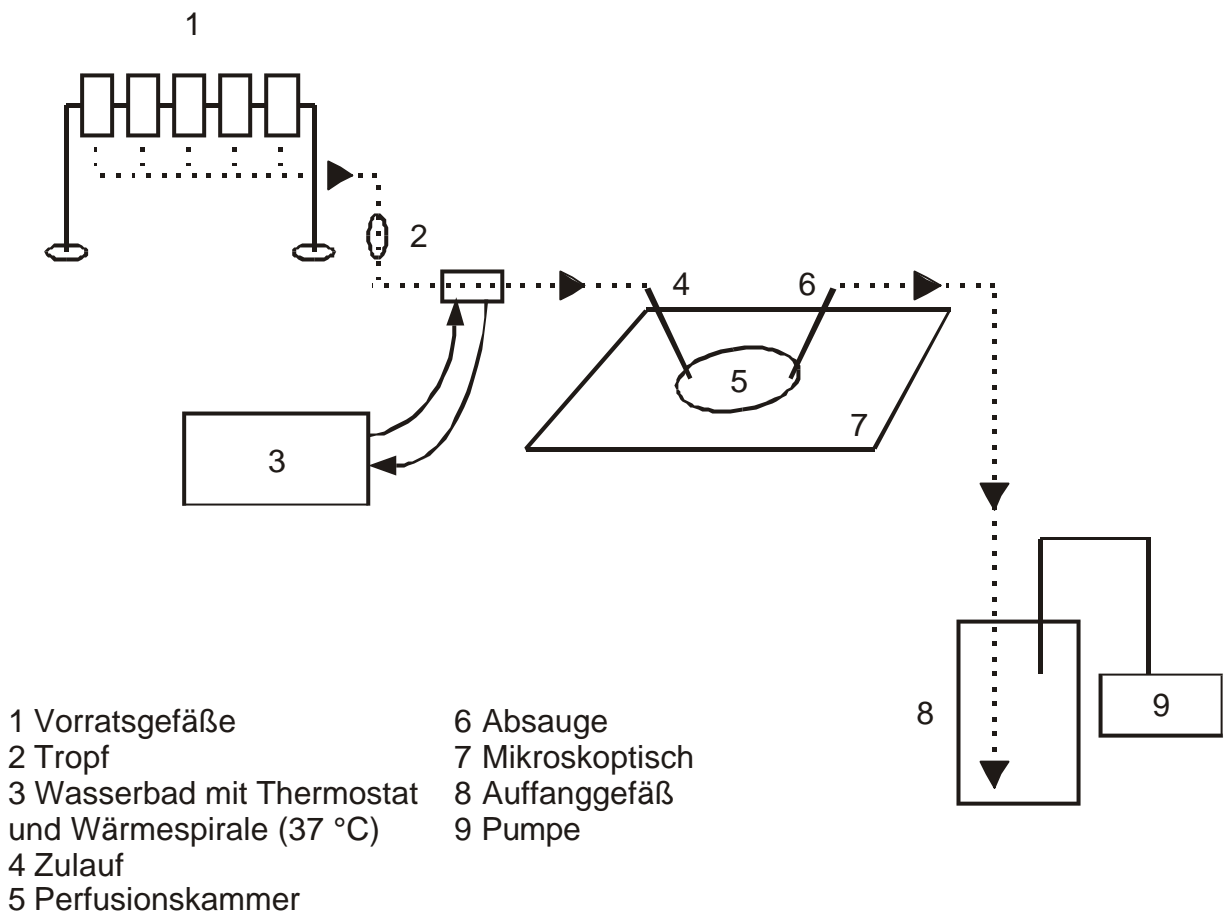


Abb. 2.4: Darstellung des Lösungsflusses

Bei allen Experimenten, die mit dem Photomultiplier durchgeführt wurden, wurde die Fluoreszenz über ein 30x30 µm großes Meßfenster erfaßt. Das Meßfenster wurde so ausgerichtet, daß es über dem Teil der afferenten Arteriole zu liegen kam, der dem Glomerulus am nächsten war und umfaßte ca. 6-8 Zellen. Bei allen Experimenten, bei denen die Restlichtkamera verwendet wurde, wurden die Glomerula und die afferente Arteriole während des Experimentes mit zwei Haltepipetten fixiert. Dazu dienten zwei Glaskapillaren unterschiedlichen Durchmessers, die mit einem Elektrodenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz Instruments, D) hergestellt wurden. Zur Fixierung des Glomerulus diente eine Pipette mit einem Spitzendurchmesser von ca. 20 µm, welche aus einem Hämatokritröhrchen (Mikro Hämatokritröhrchen, I.D. 1.15 mm, O.D. 1.55 mm, Brand, D) gezogen wurde. Zur Fixierung der afferenten Arteriole diente eine Pipette mit einem Spitzendurchmesser von ca. 5 µm, die aus Elektrodenglas (Borosilicat Glaskapillaren GC 150 TF - 15, Clark Electromedical Instruments, UK) gezogen wurde. Beide Pipetten waren über je einen Kunststoffschlauch mit je einem Mundstück verbunden, über die der Glomerulus bzw. die afferente Arteriole

angesaugt wurden. Weiterhin waren die Pipetten mit einem flüssigkeitsgefüllten U-Rohr verbunden, über das ein Unterdruck angelegt werden konnte. Dieser Unterdruck diente letztlich zur Fixierung des Präparates während des Experiments. Zur Positionierung der Pipetten wurden zwei Mikromanipulatoren verwendet (Leitz bzw. Märzhäuser, D), die eine Bewegung in allen drei Raumrichtungen ermöglichten. Während des Experiments wurden von der Kamera Bilder des gesamten Glomerulus inklusive afferenter Arteriole aufgenommen. Bei der Auswertung wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität nur innerhalb einer zu diesem Zeitpunkt festgelegten Region (Region of interest, ROI) erfaßt. Die ROI befand sich immer am Gefäßpol und umfaßte ca. 4-6 Zellen (vgl. Abb. 2.5). Um die Zellen am Gefäßpol besser identifizieren und somit die ROI besser plazieren zu können, wurde von jedem Gefäß vor Beginn des Experimentes ein Hellfeldbild aufgenommen, wobei zur Reduktion der Lichtintensität drei Graufilter (ND 2A, ND 16A, ND 32, Nikon) in den Strahlengang eingeführt wurden.

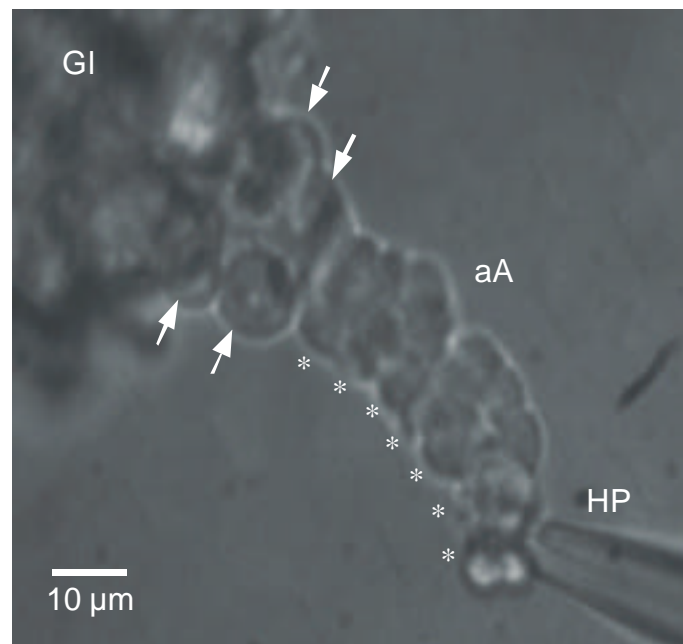


Abb.: 2.5: Hellfeldbild eines frisch isolierten Glomerulus mit anhängender afferenter Arteriole aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Man kann deutlich einen distalen Abschnitt mit runden reninsezernierenden Zellen (Pfeile) von einem proximalen Abschnitt mit regelmäßig angeordneten glatten Muskelzellen (\*) unterscheiden. Die Aufnahme erfolgte mit einer Restlichtkamera (IC-200, PTI) unter Verwendung eines 100x Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektivs (N.A.: 1.3, CF Fluor Plan, Nikon). GI, Glomerulus; aA, afferente Arteriole; HP, Haltepipette.

Sowohl die Potentialmessungen als auch die Calciummessungen wurden ausschließlich an reninsezernierenden Zellen von Ratten durchgeführt, welche eine Furosemidapplikation erhalten hatte und kochsalzarm ernährt worden waren.

### 2.2.3.b) Messung des Membranpotentials

Zur Messung des Membranpotentials der reninsezernierenden Zellen der Ratte wurde die oben beschriebene Apparatur benutzt, wobei ein für den spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol, Molecular Probes, OR, U.S.A.) spezifischer dichroischer Spiegel (DM 505, Nikon) und ein Langpassfilter (BA 520, Nikon) verwendet wurden. DiBAC<sub>4</sub>(3) wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm ± 4 nm angeregt und emittiertes Licht mit einer Wellenlänge > 520 nm wurde mit einem Photomultiplier gemessen. DiBAC<sub>4</sub>(3) enthält delokalisierte negative Ladungen und gelangt durch Diffusion durch die Plasmamembran in die Zelle (Bräuner *et al.*, 1984 nach Waggoner, 1976). Dort bindet DiBAC<sub>4</sub>(3) an hydrophobe Bestandteile von Proteinen und Membranen, wodurch es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität kommt (Bräuner *et al.*, 1984; Epps *et al.*, 1994). Das Eindringen des Farbstoffs in die Zellen geht um so leichter, je depolarisierter die Zellen sind (Anstieg der Fluoreszenzintensität). Erfolgt hingegen eine Hyperpolarisation, so wird der Farbstoff von den Zellen abgestoßen und es erfolgt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität; ungebundener Farbstoff zeigt keine wesentliche Fluoreszenz. Daher hängt die Fluoreszenzintensität direkt von der Menge an intrazellulär gebundenem Farbstoff und damit von der potentialabhängigen Menge an aufgenommenem Farbstoff ab, kann sie als Maß für das Membranpotential verwendet werden (Bräuner *et al.*, 1984; Epps *et al.*, 1994). Während der Experimente wurden die Glomeruli kontinuierlich mit 1 µM DiBAC<sub>4</sub>(3) in HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung (HEPES-PS), bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> und bei 37 °C überströmt. 80 min nach Beginn der Inkubation hatte die Fluoreszenzintensität einen stabilen Wert erreicht, so dass mit der Messung begonnen werden konnte.

Die Aufnahme sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analysenprogramm Felix™ (Version 1.01, PTI). Die Aufnahmezeit betrug 0.5 Punkte s<sup>-1</sup>.

Kalibrierung des Systems:

Zur Bestimmung der Potentialänderungen wurde das Fluoreszenzsignal entsprechend der bei Langheinrich & Daut (1997) angegebenen Methode kalibriert. Dabei wurden die Plasmamembranen mit 1  $\mu\text{M}$  des  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Ionophors Gramicidin permeabilisiert und  $\text{Na}^+$  wurde in der HEPES-PS durch das impermeable Kation NMDG (N-methyl-D-glucamin) ersetzt. Daher konnte dann in Gegenwart von DiBAC<sub>4</sub>(3) das Membranpotential der Zellen durch Änderung der  $[\text{K}^+]_o$  bestimmt werden, wobei die NMDG-Konzentration zur Erhaltung der Osmolarität angeglichen wurde. Es wurden 5 verschiedene  $[\text{K}^+]_o$  verwendet (2,8, 10, 25, 30 und 40 mM) und es wurde von einer  $[\text{K}^+]_i$  von 140 mM ausgegangen, so dass das Membranpotential entsprechend der Nernst-Gleichung zwischen -102 mV und -33 mV variiert wurde.

Es gilt die Nernst-Gleichung:

$$E_x = (RT / zF) * \ln ([X]_o / [X]_i) \quad (1)$$

$E_x$	=	Gleichgewichtspotential für das Ion X
R	=	Gaskonstante ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )
T	=	absolute Temperatur in Kelvin
z	=	Wertigkeit des Ions X
F	=	Faraday - Konstante ( $9.648 * 10^4 \text{ C mol}^{-1}$ )
$[\text{X}]_{o/i}$	=	Konzentrationen des Ions X auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran

Für ein einwertiges positives Ion gilt (bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C} = 310 \text{ K}$ ):

$$E_x = 61.5 \text{ mV} * \log ([X]_o / [X]_i) \quad (2)$$

Für die getesteten  $[\text{K}^+]_o$  ergeben sich folgende Potentiale:

-105 mV	=	$61.5 \text{ mV} * \log ([2.8] / [140])$
-71 mV	=	$61.5 \text{ mV} * \log ([10] / [140])$
-46 mV	=	$61.5 \text{ mV} * \log ([25] / [140])$
-41 mV	=	$61.5 \text{ mV} * \log ([30] / [140])$
-34 mV	=	$61.5 \text{ mV} * \log ([40] / [140])$

Es wurden 5 Eichungen durchgeführt (als Beispiel siehe Abb. 2.6) und die bei den verschiedenen  $[K^+]_o$  gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Prozent ermittelt, wobei die Intensität unter Normalbedingungen (2.8 mM  $[K^+]_o$ ) gleich 100 % gesetzt wurde.

Für die verwendeten  $[K^+]_o$  ergaben sich folgende Werte:

2.8 mM $[K^+]_o$	100 % (5)
10 mM $[K^+]_o$	106 ± 1 % (5)
25 mM $[K^+]_o$	113 ± 0 % (1)
30 mM $[K^+]_o$	115 ± 0 % (1)
40 mM $[K^+]_o$	118 ± 1 % (4)

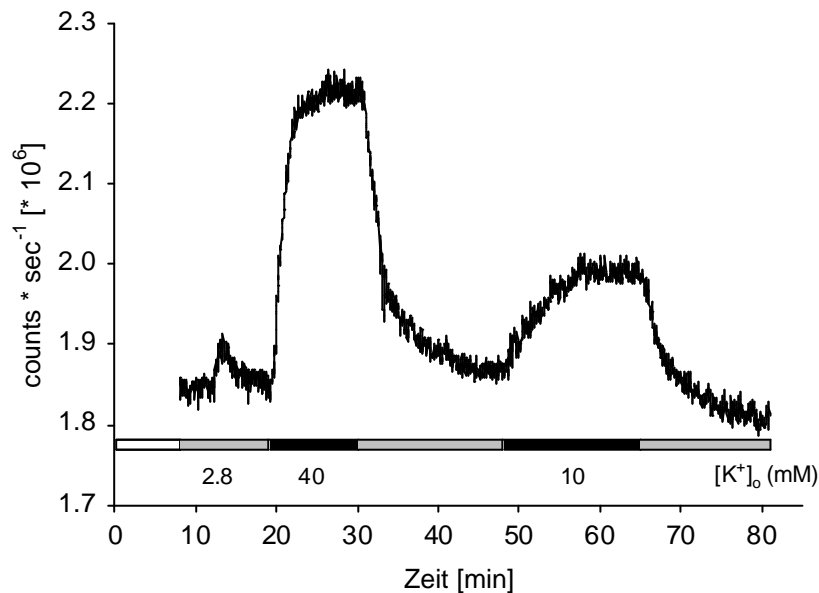


Abb. 2.6: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von  $[K^+]_o$  in DiBAC<sub>4</sub>(3)-beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 auf 40 mM führte zu einem reversiblen Anstieg der Fluoreszenzintensität um 20 %, wogegen eine Erhöhung von 2.8 auf 10 mM  $[K^+]_o$  zu einem reversiblen Anstieg um ca. 8 % führte.

Korrelierte man die gemessene Fluoreszenzintensität in Prozent und das mittels Nernst-Gleichung errechnete Membranpotential und berechnete man eine Regressionsgerade so ergab sich eine lineare Abhängigkeit, was in Abb. 2.7 dargestellt ist.



Die verwendete Formel zur Berechnung der Regressionsgeraden lautete:

$$y = a + bx \quad (3)$$

- y = Fluoreszenzintensität
- a = Y - Achsenabschnitt
- b = Steigungskoeffizient
- x = Membranpotential

Dabei ergaben sich folgende Werte:

- a =  $125 \pm 1.08$
- b =  $0.25 \pm 0.02$
- r = 0.98

Eine Änderung der Fluoreszenzintensität ( $\Delta F$ ) um  $0.25 \pm 0.02$  % entsprach also einer Membranpotentialänderung um 1 mV.

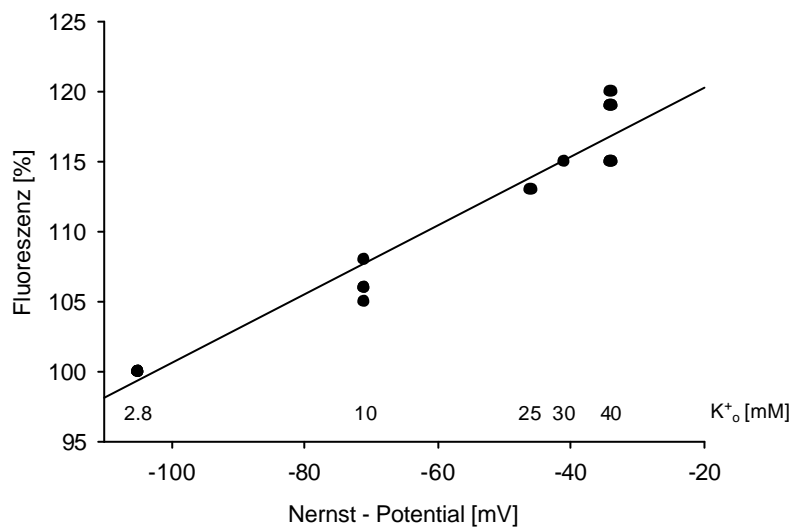


Abb. 2.7: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in DiBAC4(3)-beladenen reninsezernierenden Zellen.

Die Gerade gibt die Regression durch die Einzelwerte. Gefittet wurde mit folgender Gleichung:  $y=a+bx$ , wobei  $a=125\pm 1.08$ ,  $b=0.25\pm 0.02$ ,  $r=0.98$ .  $[K^+]_i=140\text{mM}$ ,  $[K^+]_o=2.8, 10, 25, 30$  und  $40$  mM, die berechneten Nernst-Potentiale betragen  $-105, -71, -46, -41$  und  $-34$  mV (s.S. 51).

### c) Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration

Zur Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde das Mikroskop mit einem dichroischen Spiegel (430DCLPO2, Omega Optical, VT, U.S.A.) und einem Interferenzbarrierefilter (510WB40, Omega Optical) ausgestattet. Die Anregungswellenlängen betragen  $340 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  und  $380 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$  und zur Messung des emittierten Lichts wurde zunächst ein Photomultiplier, später eine Restlichtkamera verwendet. Letztere verfügte zwar nicht über die gleiche Empfindlichkeit wie der Photomultiplier, ermöglichte aber eine bessere räumliche Darstellung und damit eine bessere Identifizierung der Zellen. Die Intensität des emittierten Lichts wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Zur Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), Molecular Probes) in der membrangängigen Form als Azetoxymethylester verwendet. In dieser ungeladenen Form gelangt der Farbstoff durch Diffusion durch die Plasmamembran in das Cytoplasma, wo durch endogene Esterasen der Azetoxymethylesterrest abgespalten wird, so dass der Farbstoff als Anion vorliegt. In dieser Form kann er nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren, so dass er sich im Cytoplasma anreichert. Die Farbstoffbeladung erfolgte mit  $16 \mu\text{M}$  Fura-2 + 0.04 % des Detergens Pluronic F127 in HEPES-PS für 60 min bei Raumtemperatur. Nach der Farbstoffbeladung wurden die Glomeruli noch für 30 min in HEPES-PS bei Raumtemperatur gewaschen.

Bei der Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit Fura-2 macht man sich zunutze, dass der Farbstoff bei Bindung von Calcium sein Anregungsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen verschiebt (Abb. 2.8). Das Anregungsspektrum ist die Intensität der emittierten Fluoreszenz, gemessen bei einer festen Wellenlänge (hier: 510 nm), als Funktion der Wellenlänge des Anregungslichts. Die Verschiebung des Anregungsspektrums ermöglicht die Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (hier: 340 nm und 380 nm), deren Intensität gemessen bei 510 nm invers auf  $Ca^{2+}$ -Bindung reagiert. Bindet Fura-2 Calcium, so nimmt die Emissionsintensität bei Anregung mit 340 nm zu, bei Anregung mit 380 nm jedoch ab. Bildet man den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten beider Anregungswellenlängen ("Ratio"-Methode), so ist der ermittelte Quotient R (Fluoreszenzintensität des Calcium-gebundenen / Fluoreszenzintensität des Calcium-freien Farbstoffes,  $F_{340} / F_{380}$ ) über folgende Formel (Grynkiewicz *et al.*, 1985) direkt mit der Calciumkonzentration verknüpft:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (Sf2 / Sb2) \quad (4)$$

- $K_D$  = Dissoziationskonstante des Fura-Calcium-Komplexes  
 $R$  = F 340 / F 380  
 $R_{max}$  = F 340 / F 380 bei sättigender Calcium-Konzentration  
 $R_{min}$  = F 340 / F 380 bei Calcium-freier Lösung  
 $(Sf2 / Sb2)$  = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm Anregung von Calcium-freiem / Calcium-gebundenem Farbstoff

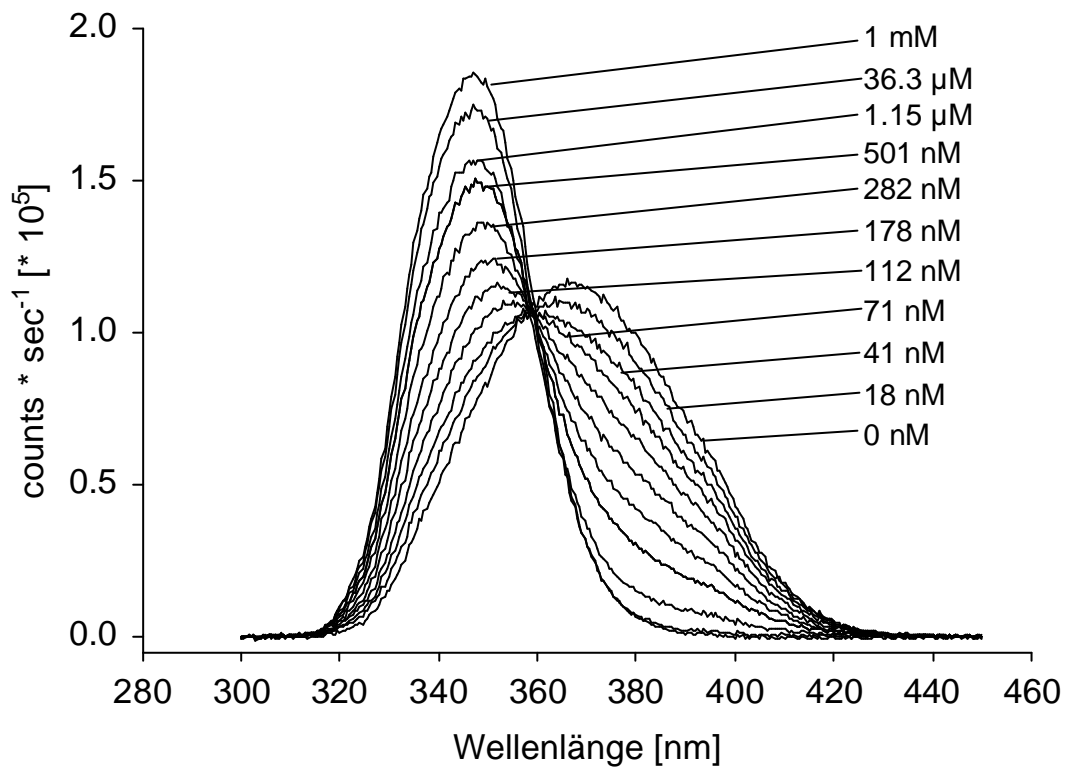


Abb. 2.8: Anregungsspektrum von FURA-2 in HEPES-PS + EGTA (pH 7.2) bei verschiedenen Konzentrationen an freiem Calcium.

Mit zunehmender Konzentration an freiem Calcium kommt es zu einer Verschiebung des Anregungsspektrum zu kürzeren Wellenlängen. Die Emission wurde bei 510 nm gemessen, von allen Spektren wurde der Hintergrund abgezogen.

### Intrazelluläre Kalibrierung des Systems

Zunächst wurde eine Kalibrierung des Fura-2 Signals von reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole durchgeführt (intrazelluläre Kalibrierung). Um eine Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der  $[Ca^{2+}]_i$  herstellen zu können, mußte diese auf einen definierten Wert eingestellt werden. Dazu wurde der Calcium-freien Lösung (HEPES-PS + EGTA) und der Calcium gesättigten Lösung (HEPES-PS +  $Ca^{2+}$ -EGTA) 5  $\mu$ M des Calcium-Ionophors Ionomycin zugesetzt und so ein Austausch zwischen dem intra- und dem extrazellulären Calcium-Pool ermöglicht. Zur Bestimmung des Quotienten unter Normalbedingungen wurde das Präparat zunächst mit HEPES-PS ( $\rightarrow$  R) perfundiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der beiden Anregungswellenlängen bei Applikation von HEPES-PS + EGTA ( $\rightarrow$   $R_{min}$ ) und von HEPES-PS +  $Ca^{2+}$ -EGTA ( $R_{max}$ ) bestimmt. Nach Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz (Fluoreszenzintensitäten der beiden Anregungswellenlängen gemessen in einer zellfreien HEPES-PS) wurde  $R_{min}$  und  $R_{max}$  sowie (Sf2 / Sb2) berechnet. Bei der Umrechnung der jeweiligen Quotienten in Calciumkonzentrationen wurde zum einen die bei der Erstbeschreibung des Farbstoffes von Grynkiewicz *et al.* (1985) bestimmte  $K_d$  von 224 nM (zellfreie Kalibrierung), zum anderen der von Jensen *et al.* (1993) in glatten Muskelzellen der Mesenterialarterien der Ratte bestimmte Wert von 342 nM verwendet.

Zunächst wurden 9 Kalibrierungen unter Anwesenheit von 5  $\mu$ M Ionomycin durchgeführt, bei denen folgende Werte ermittelt wurden:

	<b>R</b>	<b><math>R_{min}</math></b>	<b><math>R_{max}</math></b>	<b>(Sf2 / Sb2)</b>	<b><math>[Ca^{2+}]_i</math> Kd = 224 nM</b>	<b><math>[Ca^{2+}]_i</math> Kd = 342 nM</b>
<b>Mittelwert</b>	0.83	0.31	3.10	5.39	261	391
<b>SEM</b>	0.09	0.04	1.25	1.46	52	81

Die hier ermittelten Werte für  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) fielen deutlich kleiner aus als bei Jensen *et al.* (1993) beschrieben ( $R_{max} = 12.2 \pm 0.02$  und (Sf2 / Sb2) =  $10.3 \pm 0.4$ ), was auf einen unzulänglichen Austausch zwischen extra- und intrazellulärem Calcium-Pool hindeuten könnte. Bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  müsste einerseits F 340 und damit auch  $R_{max}$  größer werden und gleichzeitig müsste Sb2 kleiner und damit auch (Sf2 / Sb2) größer werden. Um dies zu überprüfen wurde die Ionomycin-Konzentration auf 20  $\mu$ M erhöht, was aber in zwei Experimenten zu keiner Steigerung des  $R_{max}$  - und des (Sf2 / Sb2)-Wertes führte. Dies konnte

auch durch eine weitere Erhöhung auf 50  $\mu\text{M}$  Ionomycin nicht erreicht werden. Die ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

[Ionomycin]	R	$R_{\min}$	$R_{\max}$	(Sf2 / Sb2)	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ Kd = 224 nM	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ Kd = 342 nM
20 $\mu\text{M}$	0.80	0.25	1.92	4.45	245	373
20 $\mu\text{M}$	0.86	0.30	5.02	9.54	280	427
50 $\mu\text{M}$	0.77	0.27	5.79	11.77	228	347
50 $\mu\text{M}$	0.68	0.30	6.14	2.62	179	273

Da eine Erhöhung der Ionomycin-Konzentration keine Wirkung zeigte und ein unzulänglicher Austausch zwischen extra- und intrazellulärem Calcium-Pool auch auf Calcium-Extrusionsmechanismen (z.B. Calcium-ATPasen) und auf die Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher (z.B. das Sarcoplasmatisches Reticulum und die Mitochondrien) zurückgeführt werden kann, wurde in einem weiteren Schritt zusätzlich zu 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin auch CCCP (Carbonylzyanid-3-chlorphenylhydrazon) sowie Rotenon appliziert. Das Protonophor CCCP entkoppelt die oxidative Phosphorylierung und inhibiert so die mitochondriale Calcium-Aufnahme. Rotenon blockiert den mitochondrialen Elektronentransport, wodurch die ATP-Produktion inhibiert wird. Beide Substanzen zusammen führen zu einer geringeren Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher bzw. hemmen ATP abhängige Calcium-Pumpen und erleichtern somit den Austausch zwischen extra- und intrazellulärem Calcium-Pool (Sidky *et al.*, 1997). Die beiden Substanzen wurden im ersten Experiment in Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  CCCP (Literaturwerte: 2  $\mu\text{M}$  - 3 mM; z.B. Fierro *et al.*, 1998; Kamishima *et al.*, 2000) bzw. 10  $\mu\text{M}$  Rotenon (Literaturwerte: 2  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ; z.B. Sugiyama und Goldman, 1995; Agalakova *et al.*, 1997) für 10 min in HEPES-PS vor Bestimmung von  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$  und (Sf2 / Sb2) appliziert. Da der  $R_{\max}$ -Wert dadurch nicht gesteigert werden konnte, wurden in einem zweiten Experiment die Konzentrationen von CCCP und Rotenon verdoppelt und die Vorapplikationszeit auf 30 min ausgedehnt, was jedoch ohne Erfolg blieb. Die ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Ionomycin / CCCP / Rotenon [ $\mu\text{M}$ ]	R	$R_{\min}$	$R_{\max}$	Sf2 / Sb2	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ Kd = 224 nM	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ Kd = 342 nM
10 / 25 / 10	0.65	0.30	6.18	12.56	163	249
10 / 50 / 20	0.87	0.34	4.21	8.56	286	435

## Zellfreie Kalibrierung des Systems

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Zellen immer noch in der Lage sind ihre  $[Ca^{2+}]_i$  zu regulieren, weil z.B. die verwendeten Substanzen nicht in ausreichendem Maß zu den reninsezernierenden Zellen gelangen und so ihre Wirkung nicht voll entfalten können. Die Problematik der intrazellulären Kalibrierung des Fura-Signals in glatten Muskelzellen wurde auch von Carmines *et al.* (1993) durch Messungen an renalen Arteriolen des Kaninchens bestätigt, weswegen im Anschluß daran eine zellfreie Kalibrierung nach der von Gryniewicz *et al.* (1985) beschriebenen Methode durchgeführt wurde. Um  $R_{min}$ ,  $R_{max}$ , Sf2, Sb2 und die  $K_d$  zu bestimmen, wurde eine Titration von Fura-2 mit Calcium nach der Anleitung aus dem Handbuch zur FeliX™ Software (PTI, 1995) durchgeführt. Ausgehend von HEPES-PS + EGTA wurde die Calcium-Konzentration schrittweise um 1 mM erhöht, bis schließlich ein Calcium-gesättigter Puffer vorlag (HEPES-PS +  $Ca^{2+}$ -EGTA). Die Konzentration an freiem Calcium wurde mit dem Programm "Calcium" (Dr. T. Suzuki, Australian National University, Canberra, Australia und Dr. U. Russ, Pharmakologisches Institut, Tübingen) berechnet, wobei folgende Parameter vor der Berechnung festgelegt wurden:

$[Ca^{2+}]$	=	Die jeweils eingesetzte Gesamt Calcium-Konzentration wurde von 0 mM ausgehend (HEPES-PS + EGTA) bei jeder neuen Berechnung um 1 mM bis auf 10 mM (HEPES-PS + $Ca^{2+}$ -EGTA) erhöht und der jeweilige Wert zur Berechnung der freien Calcium-Konzentration verwendet.
$[Mg^{2+}]$	=	1 mM
[EGTA]	=	9 mM
[ATP]	=	0 mM
Ionenstärke	=	0.1
pH	=	7.2
Temperatur	=	25 °C
$K_D$	=	Die $K_D$ des $Ca^{2+}$ -EGTA-Komplexes wurde durch das Programm ermittelt, wozu es die jeweiligen Vorgaben sowie pK- und Enthalpie-Werte aus Martell und Smith (1974), Critical stability constant, Vol. 1, Plenum Press, New York verwendete.

Dabei ergaben sich folgende Konzentrationen an freiem Calcium:

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
<b>Gesamt- [Ca<sup>2+</sup>]</b>	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM	8 mM	9 mM	10 mM
<b>Freies- [Ca<sup>2+</sup>]</b>	0 nM	17.78 nM	40.74 nM	70.79 nM	112.2 nM	177.8 nM	281.8 nM	501.2 nM	1.15 μM	36.3 μM	1 mM

Von jeder dieser Lösungen wurde ein Anregungsspektrum von 300 - 450 nm aufgenommen und die emittierte Fluoreszenz bei 510 nm gemessen (s. Abb. 2.8, S. 55). Von den ermittelten Intensitäten wurde vor Bestimmung der Parameter der Hintergrund abgezogen. Die R-Werte wurden gegen die freie Calciumkonzentration halblogarithmisch aufgetragen, eine Regressionskurve berechnet und daraus die K<sub>D</sub> bestimmt. Die verwendete Formel leitet sich von der Grynkiewicz-Gleichung (Gl. 4, S. 55) durch Auflösen nach R ab:

$$R = ([Ca^{2+}]_i * R_{max} + (Sf2 / Sb2) * K_D * R_{min}) / ([Ca^{2+}]_i + (Sf2 / Sb2) * K_D) \quad (5)$$

R = F 340 / F 380

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = Calcium-Konzentration

R<sub>max</sub> = F 340 / F 380 bei sättigender Calcium-Konzentration

Sf2 / Sb2 = Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei 380 nm Anregung von Calcium-gebundenem / Calcium-freiem Farbstoff

K<sub>D</sub> = Dissoziationskonstante des Fura - Calcium-Komplexes

R<sub>min</sub> = F 340 / F 380 bei Calcium-freier Lösung

Es wurden drei Titrations durchgeführt (als Beispiel s. Abb. 2.9). Die gemessenen Werte für  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ , (Sf2 / Sb2) sowie die durch die Regressionsgleichung ermittelte  $K_d$  sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	$R_{\min}$	$R_{\max}$	(Sf2 / Sb2)	$K_d$ [nM]
<b>1. Titration</b>	0.27	13.19	14.83	169
<b>2. Titration</b>	0.26	13.80	16.54	182
<b>3. Titration</b>	0.26	11.36	11.74	226
<b>Mittelwert</b>	0.26	12.78	14.37	192
<b>SEM</b>	$3.33 \cdot 10^{-3}$	0.73	1.41	18

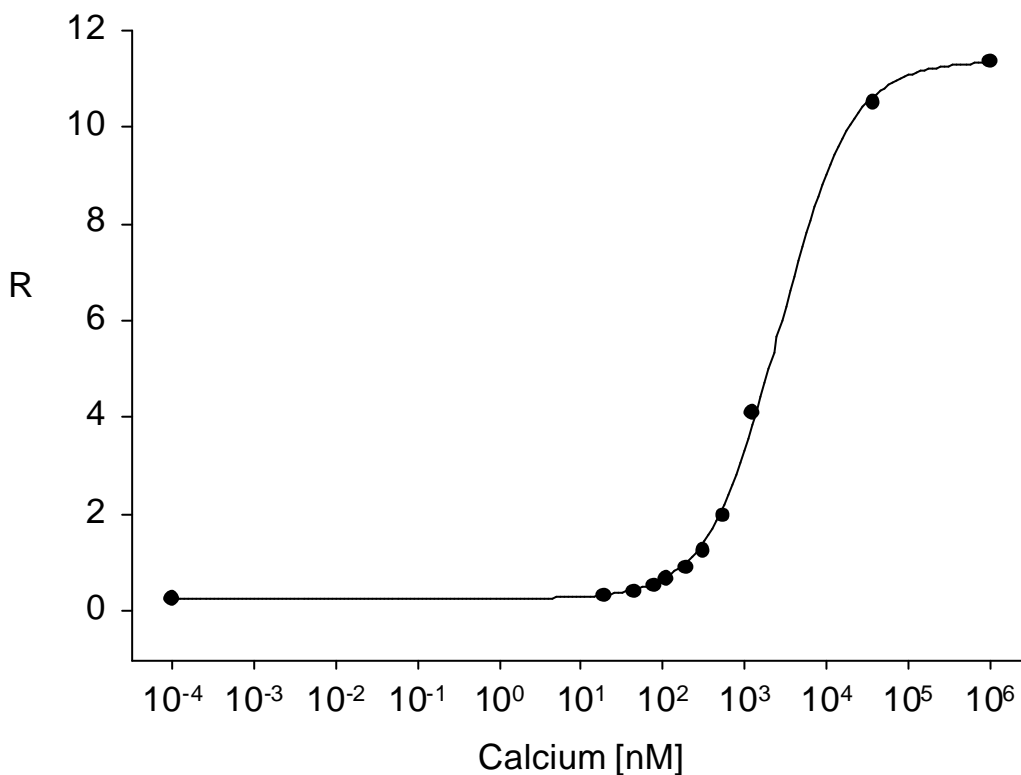


Abb. 2.9: Abhängigkeit des R-Wertes von  $[Ca^{2+}]_o$  in der zellfreien Kalibrierung.

Konzentrationsabhängiger Anstieg von R (F340 nm / F380 nm) bei steigender Calciumkonzentration. Die Kurve zeigt die Anpassung der Gleichung 4 (S. 55) an die Einzelwerte.  $K_D=226\pm 9$  nM;  $R_{\min}=0.26$ ;  $R_{\max}=11.36$ ; Sf2/Sb2=11.74.



Die hierbei ermittelte  $K_d$  von 192 nM (s. Tabelle S. 60) wurde allen Berechnungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zugrundegelegt. Die Werte für  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) galten für folgende Experimente:

- 3.2.1. Depolarisation mit Kalium
- 3.2.2. Abhängigkeit des Calcium-Anstiegs von extrazellulärem Calcium

Nach dem Austausch der Fluoreszenzlampe am 26.08.1998 wurden die Werte für  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) neu bestimmt. Hierzu wurden die Fluoreszenzintensitäten in HEPES-PS + EGTA und in HEPES-PS +  $Ca^{2+}$ -EGTA ermittelt, aus denen die benötigten Werte berechnet werden konnten.

$R_{min}$ : 0.27

$R_{max}$ : 15.45

(Sf2 / Sb2): 20.27

Diese Werte galten für folgende Experimente:

- 3.2.3. Effekt des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin
- 3.2.4. Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$  von der  $[Ca^{2+}]_o$
- 3.4. Effekte des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK und des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers GBC auf das Membranpotential und die  $[Ca^{2+}]_i$

Nach Installation der Restlichtkamera im Februar 1999 wurden  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und (Sf2 / Sb2) erneut bestimmt, wobei sich folgende Werte ergaben:

$R_{min}$ : 0.61

$R_{max}$ : 11.80

(Sf2 / Sb2): 7.85

Diese Werte galten für folgende Experimente:

- 3.3. Effekte von ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$

Bei Verwendung des Photomultipliers erfolgte die Aufnahme sowie die Analyse der Daten mit der Fluoreszenz - Analysen - Software FeliX, bei Benutzung der Restlichtkamera wurde die Fluoreszenz mit der Analysen - Software ImageMaster™ für Windows (Version 1.0.001, PTI) aufgenommen und ausgewertet. Die Aufnahmezeit betrug bei Messungen mit dem Photomultiplier 1 Punkt  $s^{-1}$ , bei Aufnahmen mit der Restlichtkamera wurde eine Mittelung über 32 Bilder pro Wellenlänge durchgeführt; Die Aufnahmezeit für ein Ratiobild betrug ca. 0.3 Hz.

#### **2.2.4. Untersuchung der Exo- und Endozytose mit FM 1-43**

Bei der Ausscheidung (Sekretion) von Inhaltsstoffen aus Zellen spielt der Prozeß der Exozytose eine wichtige Rolle. Die Exozytose ermöglicht es den Zellen u.a. Makromoleküle in den Extrazellulärraum abzugeben, für die die Plasmamembran ansonsten ein unüberwindliches Hindernis darstellt. Die freizusetzenden Makromoleküle werden in sekretorischen Vesikeln gespeichert, die entweder kontinuierlich oder auf ein Signal hin sezerniert werden. Bei der Sekretion kommt es zur Verschmelzung der Vesikel- mit der Plasmamembran, wodurch die Inhaltsstoffe in den Extrazellulärraum freigesetzt werden und gleichzeitig die Fläche der Plasmamembran um den Betrag der Vesikelfläche zunimmt. Damit die Oberfläche sekretorischer Zellen nicht beständig zunimmt, muß die bei der Sekretion hinzugewonnene Membranfläche wieder aus der Plasmamembran entfernt werden. Dies geschieht durch die sogenannte Endozytose, ein Prozess, bei dem ein Vesikel aus der Plasmamembran in das Zytoplasma abgeschnürt wird und die Zellen so Stoffe aus dem Extrazellulärraum aufnehmen.

Die Idee für die nachfolgend beschriebenen Experimente begründet sich auf der Tatsache, dass fortwährend Vesikel an einer Stelle der Plasmamembran abgeschnürt werden und an einer anderen Stelle wieder mit ihr fusionieren, was einen ständigen Membranfluß zur Folge hat.

Als Exo-, Endocytosemarker wurde der Styryl-Farbstoff FM<sup>®</sup> 1-43 (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridiniumdibromid) verwendet, der erstmals von Betz und Bewick.(1992) und von Betz *et al.* (1992) zur Beobachtung und Darstellung des Vesikelrecyclings in motorischen Endplatten des Frosches *Rana pipiens* benutzt wurde. Die Autoren vermuten, daß sich die Farbstoffmoleküle an der extrazellulären Seite der Plasmamembran anlagern, ohne daß sie die Membran durchdringen können. Kommt es zur Endocytose, so werden Farbstoffmoleküle in den sich bildenden Vesikeln eingeschlossen und gelangen auf diesem Weg in das Cytoplasma der Zellen (Betz *et al.* 1992 b). Der Farbstoff entfaltet seine Fluoreszenz erst bei Bindung an Membranen, ist also in wäßrigen Lösungen nicht fluoreszierend.

Die Experimente wurden im Anatomischen Institut am dortigen Laser Scanning Mikroskop (LSM 410 invert mit Mikroskop Axiovert 135 M, Zeiss, D) unter Verwendung eines 63x Wasserimmersionsobjektivs (Zeiss, D) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm LSM 4 Software (Version 3.50). Im Gegensatz zu einem herkömmlichen Mikroskop wird bei einem LSM nur Licht aus der Fokusebene aufgefangen, wogegen

Streulich aus darunter- und darüberliegenden Ebenen durch eine zusätzliche Lochblende (Pinhole) ausgeschlossen wird. Dies hat eine wesentlich bessere Auflösung zur Folge, wodurch Aufnahmen und Beobachtungen im subzellulären Bereich verbessert oder sogar erst ermöglicht werden. Diese Anforderung wird zwar von Elektronenmikroskopen ebenfalls erfüllt, jedoch ist man dann an fixiertes Material gebunden, kann also nicht den Ablauf physiologischer Prozesse in Echtzeit verfolgen.

Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, Emissionslicht mit einer Wellenlänge von  $> 515$  nm wurde mit einem Photomultiplier gemessen. Bei der Aufnahme wurde das Präparat in den XY-Ebene zeilenweise mit Laserlicht bestrahlt, die Intensität des Emissionslicht mit einem Photomultiplier gemessen, mit der Position des Laserstrahls verrechnet und aus den Werten wieder ein zweidimensionales Bild zusammengefügt.

Alle Experimente wurden an reninsezernierenden Zellen aus der Rattenniere durchgeführt. Es handelte sich dabei ausschließlich um Ratten, die eine Furosemidapplikation und eine NaCl-arme Diät erhalten hatten. Die Präparation erfolgte mittels enzymatischer Präparation (Kapitel 2.2.1), der Transport und die Aufbewahrung der Glomerula erfolgte in gekühltem (8 °C) HEPES-PS auf Eis. Bei einem Teil der Experimente wurde sowohl die Präparation, als auch der Transport und die Aufbewahrung der Glomerula in 100 mM Sucrose-Puffer durchgeführt, da hypertone Lösungen die Reninsekretion inhibieren (Jensen und Skott, 1993; Schrickler und Kurtz, 1995). Bei allen Experimenten wurde eine eigens konstruierte Perfusionskammer aus Messing benutzt, in die Deckgläser ( $\varnothing$  30 mm, # 1, Menzel, D) eingesetzt wurden, welche als Kammerboden funktionierten. Diese waren am Tag zuvor mit 120  $\mu$ l einer mit A. bidest 1:6 verdünnten Poly-L-Lysin Stammlösung beschichtet worden und wurden nicht länger als für zwei Tage nach Beschichtung für Experimente verwendet. Zur Abdichtung der Kammer wurden die Deckgläser mit Silikonfett an der Unterseite der Kammer befestigt. Die Kammer war über ein Schlauchsystem mit einem Wasserbad verbunden und wurde darüber erwärmt, so daß die Temperatur im Bad 37 °C betrug. Ebenso waren die Puffer-Vorratsgefäße und die zuführenden Schläuche mit dem Wasserbad verbunden, so daß auch die in das Bad strömende Pufferlösung auf 37 °C erwärmt wurde. Das Flüssigkeitsvolumen der Perfusionskammer betrug bei eingeschalteter Perfusion 400  $\mu$ l, die Fließgeschwindigkeit betrug ca. 1.5 ml min<sup>-1</sup>. Als Zu- und Ablauf dienten zwei in unterschiedlicher Höhe in die Kammer gebohrte Öffnungen. Der übrige Aufbau zur Superfusion der Glomerula gleicht dem im Kapitel 2.2.3.a beschriebenen.

Da einige Substanzen nicht ständig appliziert werden konnten und ein ständiger Durchfluß auch Aufnahmen mit dem LSM unmöglich machte, wurden einige Inhibitions- und

Stimulationspuffer mit einer Mikroliterspritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH) in das Versuchsbad appliziert. Nach Abschalten der Superfusion wurden immer 200 µl der gewünschten Lösung zu den 400 µl Puffer zugegeben, die sich in der Kammer befanden. Aus diesem Grund wurden die so zu applizierenden Lösungen auch dreifach konzentriert angesetzt.

In allen Experimenten wurde die Färbung der Zellen zum Kontrollzeitpunkt mit der Färbung zum Stimulationszeitpunkt verglichen. Dazu wurden mit dem Photomultiplier Bilder von bis zu fünf Gefäßen aufgenommen und die Position der Gefäße gespeichert. Nach der Stimulation wurden erneut Bilder der Gefäße aufgenommen. Es wurde untersucht, ob eine Zunahme der Färbung im Zytoplasma der Zellen aufgetreten war. Da dies wegen der Komplexität des Präparates nur schwer zu detektieren war, wurden einige Färbungen im Beisein des Nukleinsäurefarbstoffes SYTO<sup>®</sup>59 (Färbung der Zellkerne) durchgeführt, was die Orientierung und damit auch die Auswertung erleichterte.

### **2.2.5. Statistik**

Datenwerte werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, die Anzahl der Messungen (n) wird in Klammern angegeben.

Bei normalverteilten Daten wurden die Signifikanzen durch den t-Test nach Student ermittelt, bei nicht-normalverteilten Daten (Kapitel 3.1. „Immunfluoreszenz“) wurde der nonparametrische U-Test von Mann-Whitney angewendet.

Zur Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (Kapitel 3.3. „ANG II“) wurde die logarithmische Form der Hill-Gleichung verwendet. Für die angegebenen EC<sub>50</sub>-Werte wird das 95 % Konfidenzintervall in Klammern angegeben.

Die Berechnungen wurden mit Sigma Plot 4.01 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, IL, U.S.A.), mit Stat-100 1.24 (Biosoft, Cambridge, UK) oder mit InStat<sup>™</sup> 2.02 (GraphPad Software Inc., CA, U.S.A.) durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Immunfluoreszenz

Reninsezernierende Zellen sind in der Media der afferenten Arteriole lokalisiert und befinden sich dort vornehmlich am Gefäßpol, wobei sich der reninpositive Anteil des Gefäßes je nach physiologischem Zustand des Tieres auch weiter nach proximal erstrecken kann (Taugner *et al.*, 1982; Bührle *et al.*, 1984). Um den Anteil der reninpositiven Zellen am Gefäß in den für diese Arbeit verwendeten Versuchstieren zu bestimmen, wurden die Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Die Tiere hatten eine einmalige Applikation von Furosemid erhalten und waren anschließend mindestens zwei Wochen lang mit einer kochsalzarmen Diät ernährt worden (s. Kapitel 2.1.3., S. 37). Abbildung 3.1A zeigt einen typischen Schnitt durch die Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte, links eine Hellfeld-, rechts eine Fluoreszenzaufnahme. Abbildung 3.1B zeigt einen Schnitt durch die Niere eines Kontrolltieres, ebenfalls links die Hellfeld- und rechts die Fluoreszenzaufnahme.

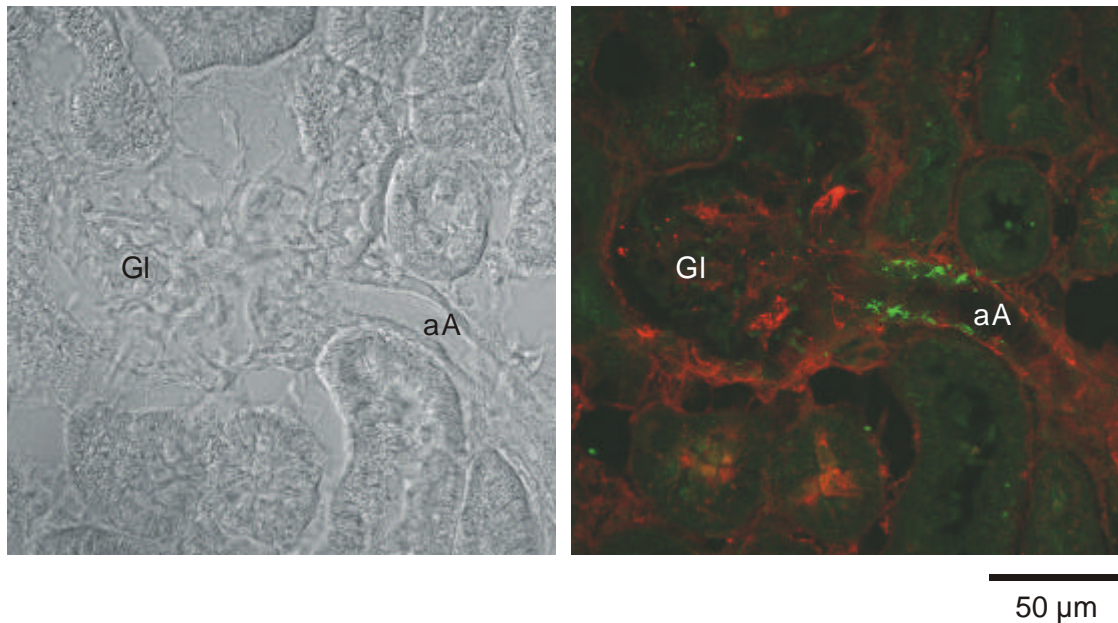
Durch Vergleich von kochsalzarm ernährten mit normal ernährten Ratten (s. Kapitel 2.1.3., S. 37) konnte gezeigt werden, dass der Anteil an reninpositiven Zellen vom physiologischen Zustand abhängig ist. Dabei war bei kochsalzarmen Ernährung nicht nur die Anzahl der reninpositiven Arteriolen insgesamt (93.5 % gegenüber 76.7 % bei Normaldiät), sondern auch die Länge des reninpositiven Bereichs (RPB) der Arteriolen selbst erhöht (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten aus Rattennieren kochsalzarm- bzw. normal ernährter Ratten.

	Anzahl der Glomerula ohne RPB	Anzahl der Glomerula RPB 0-20 µm	Anzahl der Glomerula RPB > 20 µm	Gesamtanzahl Glomerula mit RPB	Länge wenn RPB > 20 µm
<b>NaCl-arme Diät*</b>	19 (6.5 %)	203 (69.5 %)	70 (24 %)	273 (93.5 %)	53 ± 4 µm
<b>Normaldiät*</b>	101 (23.3 %)	288 (66.5 %)	44 (10.2 %)	332 (76.7 %)	45 ± 2 µm

\* Jede Gruppe umfaßte 4 Tiere, wobei im Fall der kochsalzarmen Diät 32 Kryoschnitte, im Fall der Normaldiät 35 Kryoschnitte ausgewertet wurden.

**A**



**B**

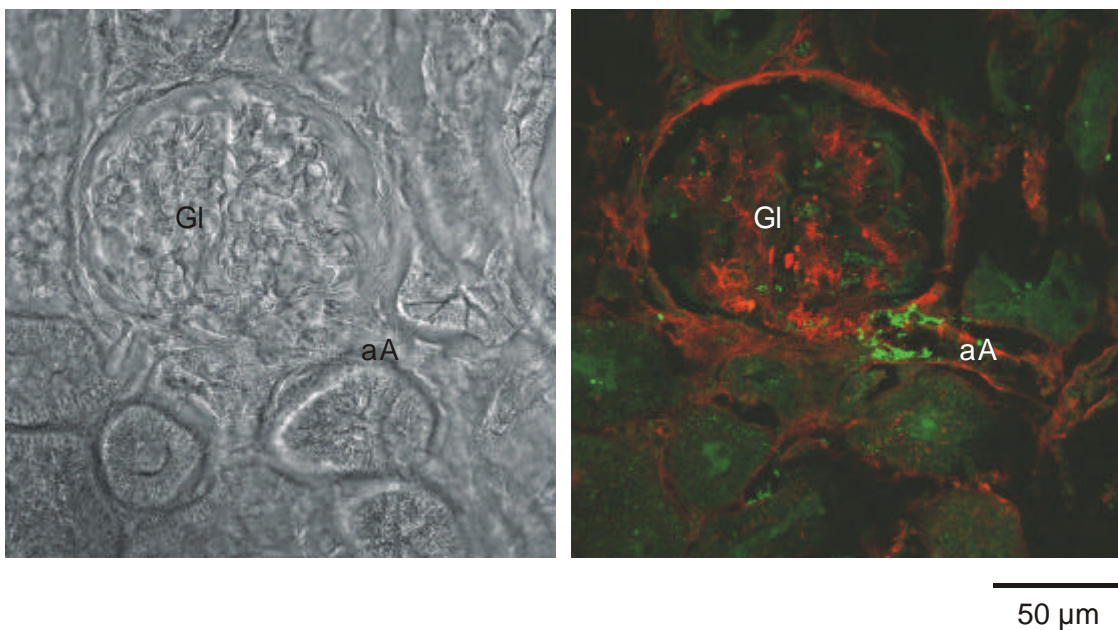


Abb. 3.1A und B: Reninsezernierende Zellen in der afferenten Arteriole einer kochsalzarm (A) bzw. normal ernährten (B) Ratte.

Der reninpositive Bereich erstreckt sich in (A) über eine Distanz von ca. 45 µm, in (B) über eine Distanz von ca. 30 µm.

Die Kryoschnitte wurden mit einem Kaninchen Anti-Rattenrenin Antikörper (AK1) in Verbindung mit Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG (AK2; grüne Färbung) sowie einem Antikörper aus der Maus gegen den humanen von Willebrand Faktor (AK1) in Verbindung mit Cy5 Ziege Anti-Maus IgG (AK2; rote Färbung) gefärbt.

aA, afferente Arteriole; Gl, Glomerulus.

Unterteilt man die afferente Arteriole in Abschnitte bestimmter Länge und trägt die Häufigkeit in Prozent auf, mit der dort reninsezernierende Zellen gefunden wurden, so ergibt sich folgendes Ergebnis:

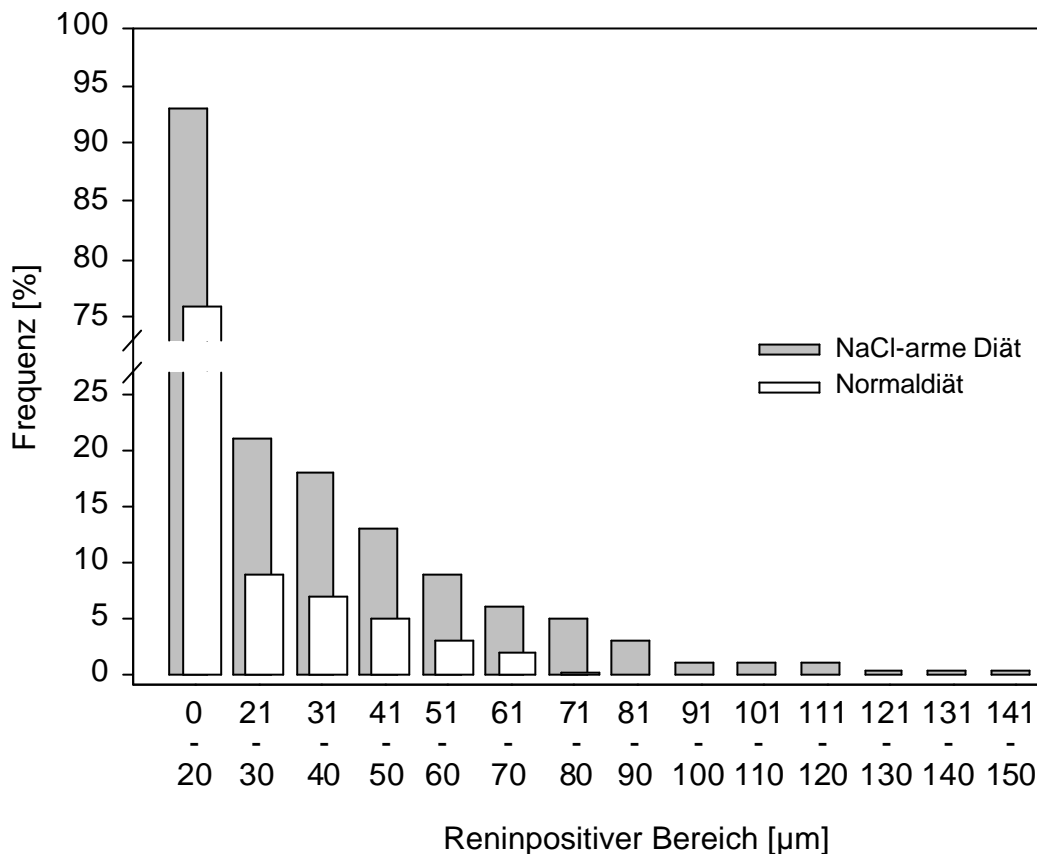


Abb. 3.2: Häufigkeit in % mit der ein RPB einer bestimmten Länge in der afferenten Arteriole der Ratte auftritt. Es wird deutlich, dass bei Verabreichung einer kochsalzarmen Diät die Wahrscheinlichkeit einen reninpositiven Anteil einer best. Länge anzutreffen gegenüber der Normaldiät in jedem Fall erhöht ist. Dies ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Anzahl reninpositiver Zellen pro Gefäß.

Um die kochsalzarm ernährten Ratten mit normal ernährten Ratten hinsichtlich der Häufigkeit mit der die jeweiligen RPB auftreten vergleichen zu können, wurde der U-Test von Mann-Whitney angewendet. Bei diesem nonparametrischen Test können nicht-normalverteilte, unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden. Als Ergebnis wurde ein p-Wert von  $1.28 \cdot 10^{-8}$  ermittelt, d.h. beide Gruppen sind signifikant verschieden voneinander. Eine einmalige Applikation von Furosemid und eine mindestens 14 tägige kochsalzarme Diät (s.

Kapitel 2.1.3., S. 37) führt also zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl der reninsezernierenden Zellen pro afferenter Arteriole.

In frisch isolierten reninsezernierenden Zellen konnten mit dem hier verwendeten Kaninchen Anti-Rattenrenin Antikörper die Reninvesikel dargestellt werden (Abb. 3.3). Die hierbei verwendeten Zellen stammten alle aus kochsalzarm ernährten Tieren (vgl. Kapitel 2.1.3., S. 37).

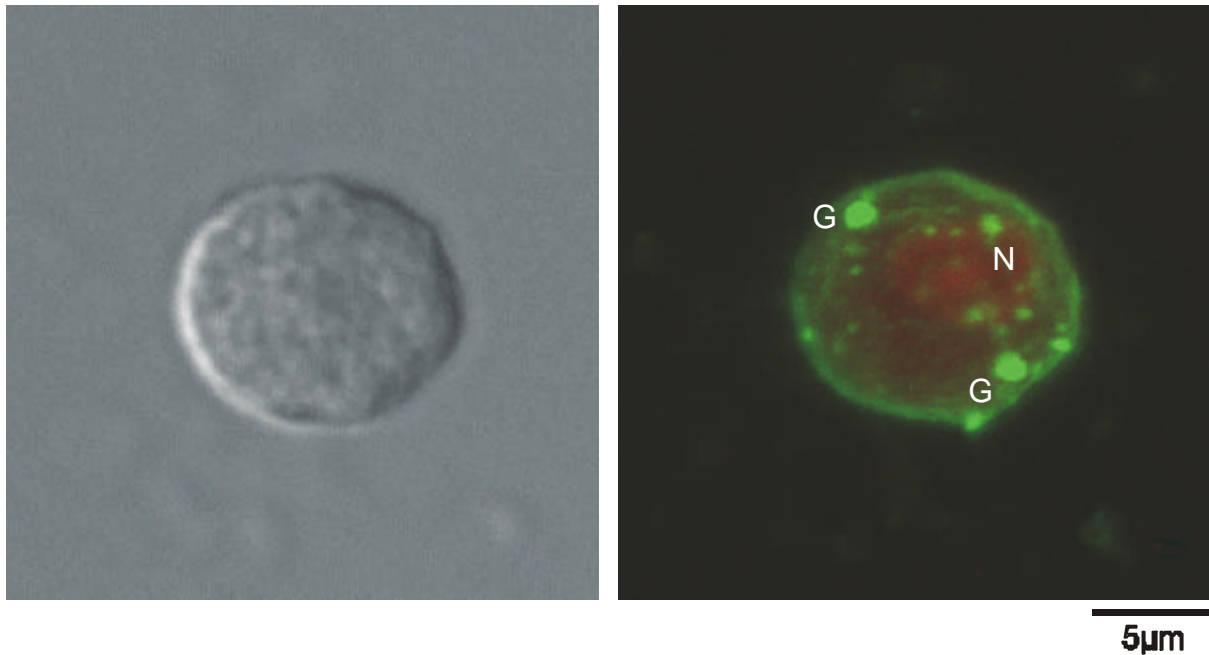


Abb. 3.3: Isolierte reninsezernierende Zelle aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Im Inneren der Zelle sind deutlich die grün gefärbten Reningranula zu sehen.

Die Zellen wurden mit Kaninchen Anti-Rattenrenin IgG in Kombination mit Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG sowie dem Nukleinsäurefarbstoff SYTO 62 (rot) gefärbt.

N, Nukleus; G, Granula.



### 3.2. Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration vom Membranpotential und von der extrazellulären Calcium-Konzentration

#### 3.2.1. Depolarisation mit Kalium

Ein Anstieg der  $[K^+]_o$  führt zu einem verringerten Kalium-Ausstrom, was nach der Nernst-Gleichung (Kapitel 2.2.3.b, S. 51) zu einer Depolarisation der Zellen führt. Um die Effekte einer Depolarisation auf  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Kaliumkonzentration von 2.8 mM auf 20, 30 oder 60 mM  $[K^+]_o$  erhöht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 1 und in den Abbildungen 3.4A - C dargestellt. Da das tatsächliche Membranpotential mit DiBAC nicht bekannt ist, werden nur die nach der Nernst-Gleichung berechneten Potentiale angegeben werden.

Tab. 3.2: Konzentrationsabhängiger Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

$[K^+]_o$	$E_K$	$Ca^{2+}$ -Kontrolle [nM]	$DCa^{2+}$ [nM]
20 mM	-52 mV	$136 \pm 29$ (3)	$18 \pm 3$ (3)
30 mM	-41 mV	$140 \pm 7$ (23)	$29 \pm 3$ (23)
60 mM	-23 mV	$121 \pm 4$ (33)	$38 \pm 4$ (33)

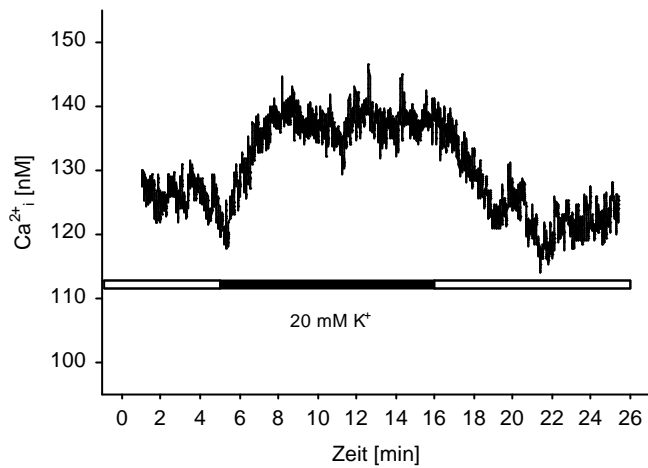
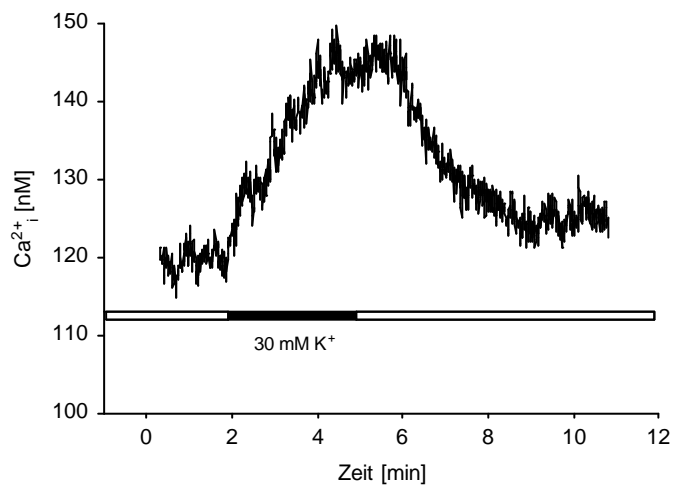
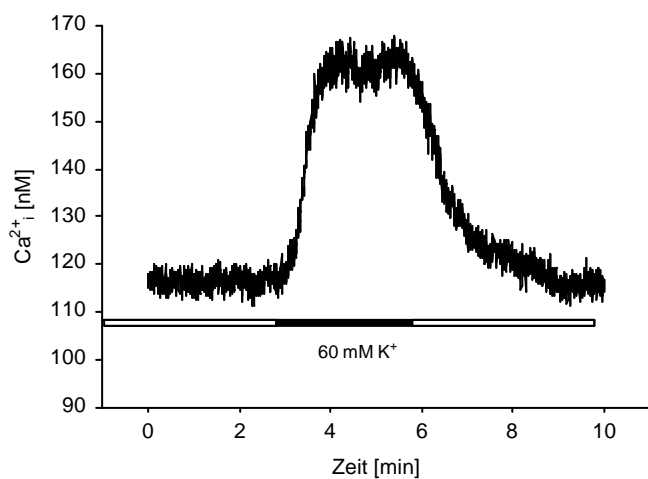


Abb. 3.4A-C: Effekt einer Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen renin-sezernierenden Zellen.

(A): Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 auf 20 mM für 11 min führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 15 nM.



(B): Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 auf 30 mM für 3 min führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 28 nM.



(C): Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 auf 60 mM für 3 min führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 47 nM.

Um die Abhängigkeit des Calcium-Anstiegs von der  $[K^+]_o$  darzustellen (s. Abb. 3.5), wurden die in Tab. 3.2 (S. 69) aufgeführten Mittelwerte ( $\Delta Ca^{2+}$ ) gegen die  $\log [K^+]_o$  aufgetragen. Es zeigt sich, daß die Abhängigkeit offensichtlich nichtlinear ist und sich bei höheren  $[K^+]_o$  eine Sättigung einstellt, die daran liegen könnte, dass eine weitere Depolarisation die Offenwahrscheinlichkeit der Calcium-Kanäle nicht weiter erhöht. Zusätzlich könnte der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  sogar zur Inaktivierung der Calcium-Kanäle geführt haben.

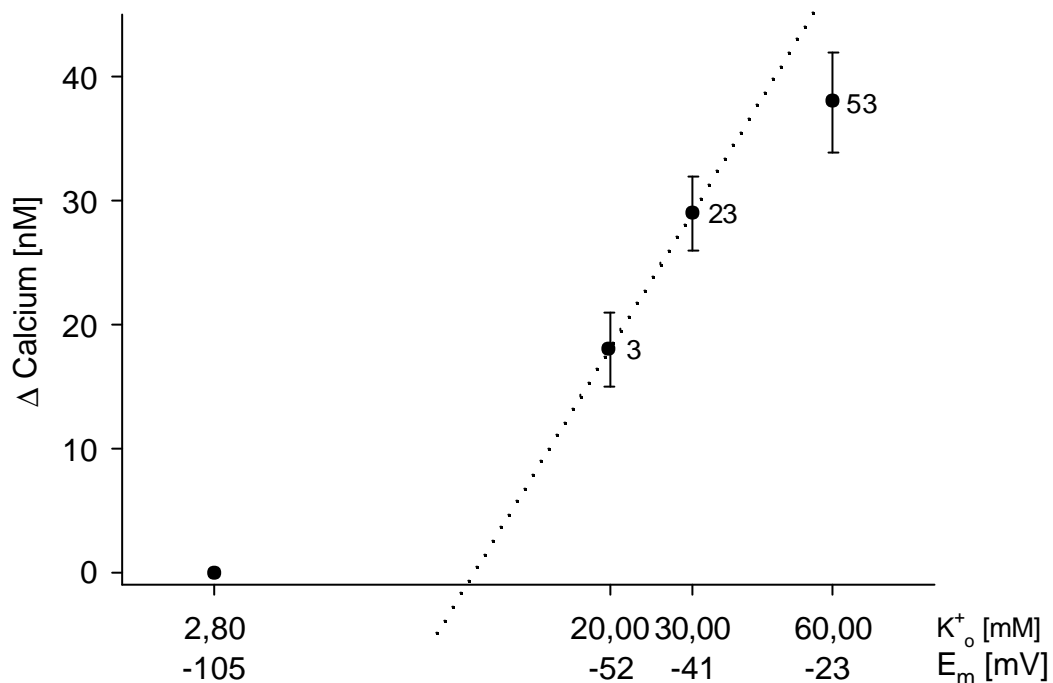


Abb. 3.5: Abhängigkeit des Calcium-Anstiegs von  $[K^+]_o$  bzw. vom Nernst-Potential. Mittelwerte  $\pm$  SEM sind gezeigt. Die gepunktete Linie stellt eine Ausgleichsgerade dar, anhand der ersichtlich ist, daß die Abhängigkeit von  $\Delta Calcium$  von  $[K^+]_o$  bzw. vom  $E_m$  nicht linear ist. Im oberen Bereich deutet sich eine Sättigung an, die auf die Sättigung des Calcium-Einstroms bei großer Depolarisation zurückzuführen ist.

### 3.2.2. Abhängigkeit des Calcium-Anstiegs von extrazellulärem Calcium

Um zu zeigen, dass der bei Depolarisation mit Kalium beobachtete Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum hervorgerufen wurde, wurden die Gefäße sowohl in Anwesenheit von  $[Ca^{2+}]_o$  als auch in Calcium-freier Lösung (0  $Ca^{2+}$ -Puffer) durch 30 mM  $[K^+]_o$  depolarisiert. In Anwesenheit von  $[Ca^{2+}]_o$  kam es zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Entzog man anschließend das  $[Ca^{2+}]_o$ , so kam es im Mittel zu einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $44 \pm 10$  nM. Erhöhte man unter diesen Bedingungen erneut  $[K^+]_o$  auf 30 mM, so kam es zu keinem signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 3.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 zusammengefaßt.

Tab. 3.3: Einfluß der  $[Ca^{2+}]_o$  auf den Kalium-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

	$Ca^{2+}$ -Kontrolle [nM]	$DCa^{2+}$ [nM]
<b>30 mM <math>[K^+]_o</math></b>	$151 \pm 14$ (5)	$32 \pm 8$ (5)
<b>0 <math>Ca^{2+}</math>-Puffer</b>	$138 \pm 14$ (6)	$-44 \pm 10$ (6)
<b>0<math>Ca^{2+}</math>-Puffer + 30 mM <math>[K^+]_o</math></b>	$94 \pm 12$ (6)	$1 \pm 1.5$ (6)

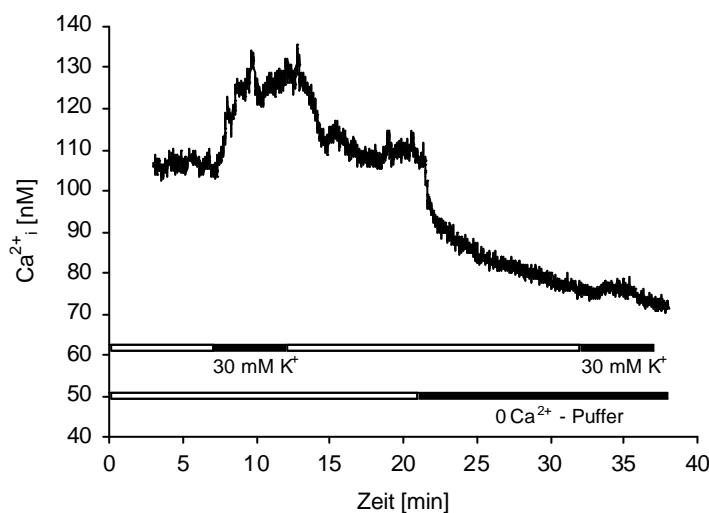


Abb. 3.6: Effekt von 0  $Ca^{2+}$ -Puffer auf den durch 30 mM  $K^+$  induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in Fura-2 beladenen reinsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 mM auf 30 mM führte zu einem reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 20 nM. Entzug des extrazellulären Calciums bei Gabe von 0  $Ca^{2+}$ -Puffer führte zu einem Abfall von  $[Ca^{2+}]_i$  um 37 nM. Anschließende Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 30 mM in Calcium-freiem Puffer führte zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um ca. 2 nM.

### 3.2.3. Effekt des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin

Nachdem gezeigt wurde, dass der durch Depolarisation mit Kalium hervorgerufene Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf einen Einstrom aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen ist, wurde untersucht ob spannungsaktivierte Calcium-Kanäle an dem Einstrom beteiligt sind. Dazu wurde zunächst in Kontrollexperimenten untersucht, ob sich bei zwei hintereinander durchgeführten Erhöhungen der  $[K^+]_o$  von 2.8 mM auf 60 mM die Effekte auf  $[Ca^{2+}]_i$  unterscheiden (Abb. 3.7). Bei der ersten Erhöhung betrug der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  im Mittel  $61 \pm 14$  nM, bei der zweiten im Mittel  $52 \pm 15$  nM. Beim Vergleich der Werte stellte sich heraus, dass der zweite Anstieg signifikant kleiner war als der erste (1 % Niveau; t-Test für gepaarte Daten). Im Mittel betrug die Differenz  $15 \pm 5$  %. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Effekt einer zweimaligen Erhöhung von  $[K^+]_o$  auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	$Ca^{2+}$ -Kontrolle [nM]	$DCa^{2+}$ [nM]
<b>1. Gabe (60 mM <math>[K^+]_o</math>)</b>	$123 \pm 13$ (7)	$61 \pm 14$ (7)
<b>2. Gabe (60 mM <math>[K^+]_o</math>)</b>	$111 \pm 10$ (7)	$52 \pm 15$ (7)

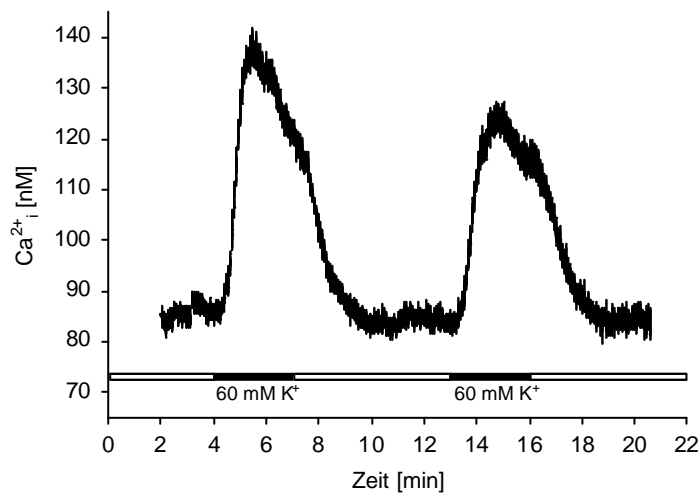


Abb. 3.7: Effekt einer zweimaligen Gabe von 60 mM  $K^+$  auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Gabe von 60 mM  $K^+$  für 3 min führte zu einem reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 52 nM. Eine wiederholte Gabe führte zu einem erneuten, reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 35 nM.

Anschließend wurden erneut Doppelpulsexperimente durchgeführt, wobei die zweite Erhöhung von 2.8 mM auf 60 mM  $[K^+]_o$  in Anwesenheit des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin erfolgte. Die erste Erhöhung auf 60mM  $[K^+]_o$  rief einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $34 \pm 6$  nM hervor. Gab man 60mM  $[K^+]_o$  in Anwesenheit von  $10^{-7}$  M Isradipin, so inhibierte dies vollständig den durch 60mM  $[K^+]_o$  hervorgerufenen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.8). Es ist auffallend, daß die durch 60 mM  $[K^+]_o$  ausgelösten Calcium-Anstiege kleiner sind in den Kontrollexperimenten (s. Tab. 3.4, S. 73), was möglicherweise daran lag, daß die Auswaschphase nicht lang genug war und sich immer noch Isradipin im System befand. Die hier ermittelten Werte sind in Tab. 3.5 zusammengefaßt.

Tab. 3.5: Effekt von 60 mM  $[K^+]_o$  bzw. 60mM  $[K^+]_o + 10^{-7}$  M Isradipin auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	<b>Ca<sup>2+</sup>-Kontrolle [nM]</b>	<b>D Ca<sup>2+</sup> [nM]</b>
<b>60 mM <math>[K^+]_o</math></b>	106 ± 10 (5)	34 ± 6 (5)
<b>60 mM <math>[K^+]_o + 10^{-7}</math> M Isradipin</b>	91 ± 10 (5)	-3 ± 1 (5)

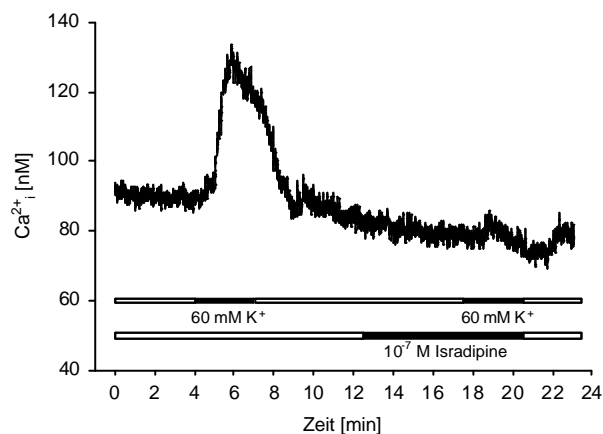


Abb. 3.8: Effekt des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin auf den durch Gabe von 60 mM  $K^+$  hervorgerufenen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 60 mM für 3 min führte zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 52 nM. Gabe von  $10^{-7}$  M Isradipin hatte keinen Einfluß auf die  $[Ca^{2+}]_i$ . Bei gleichzeitiger Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf 60 mM kam es zu keiner signifikanten Änderung von  $[Ca^{2+}]_i$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den beobachteten Zellen die Depolarisation mit Kalium zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führt, der vollständig auf einen Einstrom von Calcium durch spannungsaktivierte Calcium-Kanäle beruht.

### 3.2.4. Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration von der extrazellulären Calcium-Konzentration

Bisher wurde gezeigt, dass die Depolarisation mit Kalium zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  durch spannungsaktivierte L-Typ Calcium-Kanäle führt. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Entzug des  $[Ca^{2+}]_o$  zu einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen führt. (s. Kapitel 3.2.2., S. 72). Um zu klären ob eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  sich auch in einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  widerspiegelt und ob dieser Anstieg Isradipin empfindlich ist, wurden wieder Doppelpulsexperimente durchgeführt. Dabei wurde zunächst die  $[Ca^{2+}]_o$  zweimal hintereinander von 1 mM auf 20 mM erhöht, was zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führte, der bei der ersten Erhöhung 35 nM, bei der zweiten 30 nM betrug (Abb. 3.9). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Effekt einer zweimaligen Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	$Ca^{2+}$ -Kontrolle [nM]	$DCa^{2+}$ [nM]
<b>1. Gabe (20 mM <math>[Ca^{2+}]_o</math>)</b>	$102 \pm 7$ (4)	$35 \pm 10$ (4)
<b>2. Gabe (20 mM <math>[Ca^{2+}]_o</math>)</b>	$90 \pm 5$ (4)	$30 \pm 10$ (4)

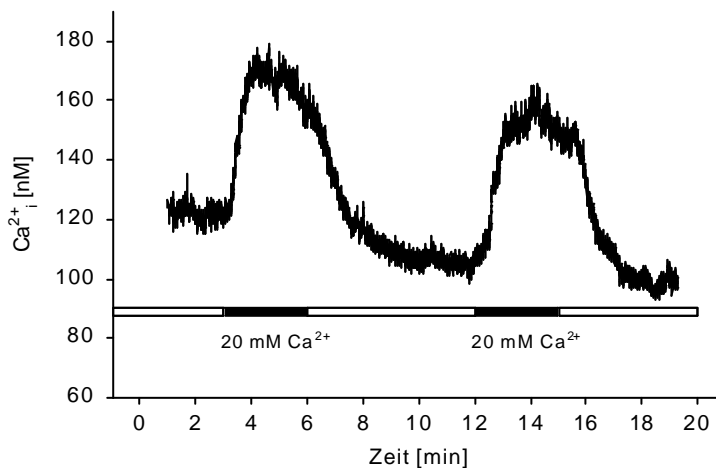


Abb. 3.9: Effekt einer zweimaligen Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 mM auf 20 mM in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM für 3 min führte zu einem reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 54 nM. Eine zweite Erhöhung für 3 min rief einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 58 nM hervor.

In den nachfolgenden Experimenten wurde überprüft, ob an dem Calcium-Einstrom nach Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  spannungsaktivierte L-Typ Calcium-Kanäle beteiligt sind. Dazu wurden Doppelpulsexperimente durchgeführt, wobei bei der zweiten Stimulation der L-Typ Calcium-Kanalblocker Isradipin ( $10^{-7}$  M) anwesend war. Zunächst wurden die Zellen mit 20mM  $[Ca^{2+}]_o$  stimuliert, was einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 33 nM hervorrief. Danach erfolgte eine Vorapplikation von Isradipin, um eine etwaige Wirkung auf den  $[Ca^{2+}]_i$ -Ruhewert auszuschließen (Abb. 3.10). Anschließend wurde während der Gabe von Isradipin  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20mM erhöht, was einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 37 nM hervorrief. Diese Ergebnisse sind in Tab. 3.7 zusammengefaßt.

Tab. 3.7: Effekt von 20 mM  $[Ca^{2+}]_o$  bzw. 20 mM  $[Ca^{2+}]_o + 10^{-7}$  M Isradipin auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	<b>Ca<sup>2+</sup>-Kontrolle [nM]</b>	<b>D Ca<sup>2+</sup> [nM]</b>
<b>20 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub></b>	128 ± 10 (4)	33 ± 5 (4)
<b>20 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> + 10<sup>-7</sup> M Isradipin</b>	120 ± 6 (4)	37 ± 8 (4)

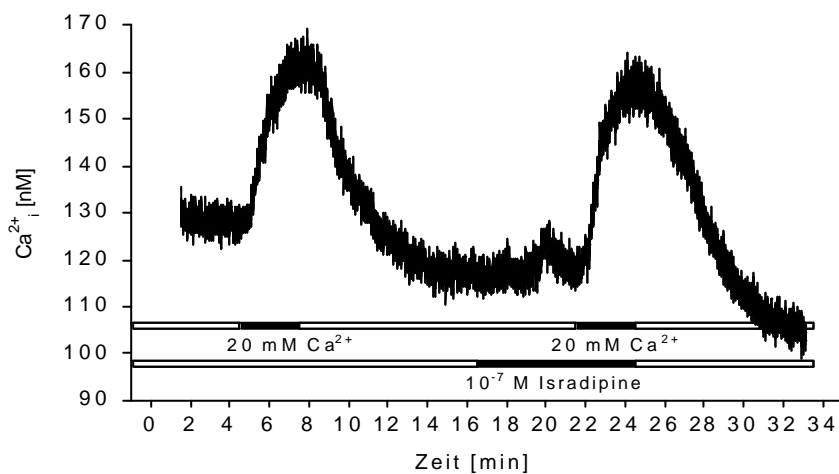


Abb. 3.10: Effekt des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin auf den durch 20 mM  $[Ca^{2+}]_o$  hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 auf 20 mM für 3 min rief einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 34 nM hervor. Gabe von  $10^{-7}$  M Isradipin hatte keinen Einfluß auf  $[Ca^{2+}]_i$ . Gleichzeitige Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_o$  auf 20 mM rief einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 42 nM hervor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Isradipin unter diesen Bedingungen die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht hemmen konnte, diese also nicht auf einem Einstrom durch spannungsaktivierte L-Typ Calcium-Kanäle beruht.



### 3.3. Effekte von ANG II auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration

Der Vasokonstriktor ANG II ist ein wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. ANG II entfaltet seinen Effekt über Bindung an AT<sub>1</sub>-Rezeptoren was zur Aktivierung eines G-Proteins und darüber zur Synthese von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) führt, welches die intrazelluläre Freisetzung von Calcium bewirkt (vgl. Kapitel 1.3.2., S. 20). ANG II wirkt auch auf die reninsezernierenden Zellen und inhibiert dort die Reninsekretion, die invers an eine Erhöhung der Calcium-Konzentration gekoppelt ist (Calcium-Paradox, vgl. Kapitel 1). Aus diesen Gründen war es von Interesse, den Effekt von ANG II auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in reninsezernierenden Zellen zu untersuchen.

Stimulation mit ANG II rief einen Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hervor, der je nach verwendeter Konzentration unterschiedlich gestaltet war. Niedrige Konzentrationen (3\*10<sup>-9</sup> M, 1\*10<sup>-8</sup> M und z.T. auch 3\*10<sup>-8</sup> M ANG II) riefen einen monophasischen Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hervor (Abb. 3.11A), während z.T. bei 3\*10<sup>-8</sup> M, immer aber bei 1\*10<sup>-7</sup> M und 1\*10<sup>-6</sup> M ANG II ein biphasischer Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu beobachten war, der in eine Peak- und eine Plateau-Phase gegliedert war (Abb. 3.11B). Um der Änderung des Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs über die Zeit bei der Auswertung gerecht zu werden, wurde das Flächenintegral des Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs ab Beginn des Effektes (t<sub>0</sub>) bis 8 min nach Beginn (t<sub>8</sub>) vermessen. Von diesen Messwerten wurde der jeweilige Hintergrund abgezogen und die Mittelwerte gebildet.

Bezogen auf die Fläche von t<sub>0</sub> bis t<sub>8</sub> ergab sich folgende Beziehung:

Tab. 3.8: Abhängigkeit des Flächenintegrals des Calcium-Anstiegs von der verwendeten Konzentration an ANG II.

ANG II [M]	Effekt [willkürliche Einheiten]
3*10 <sup>-9</sup>	3.31 ± 0.73 (6)
1*10 <sup>-8</sup>	4.99 ± 1.73 (5)
3*10 <sup>-8</sup>	7.53 ± 1.11 (9)
1*10 <sup>-7</sup>	10.41 ± 3.02 (4)
1*10 <sup>-6</sup>	10.95 ± 2.19 (5)

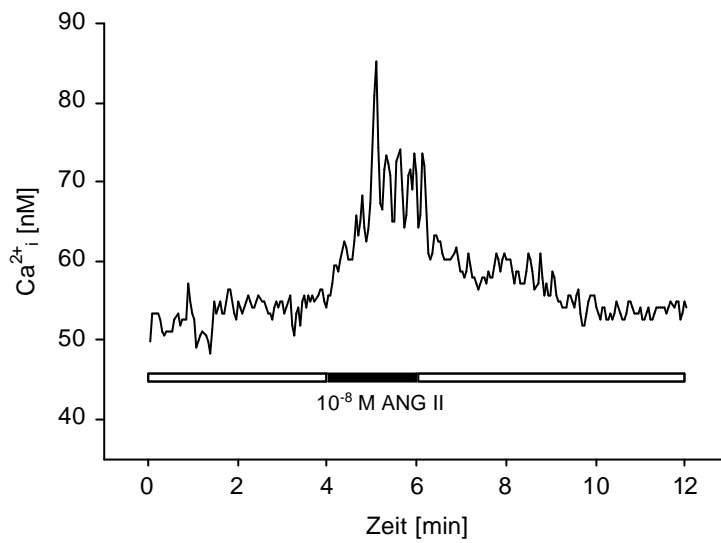
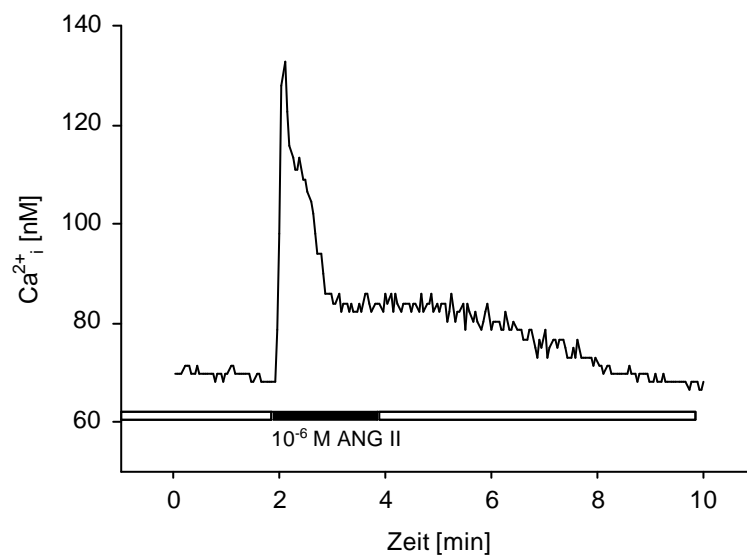
**A****B**

Abb. 3.11A und B: Effekt von  $10^{-8}$  M (A) bzw.  $10^{-6}$  M (B) ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Gabe von  $10^{-8}$  M ANG II für 2 min rief einen monophasischen, reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 15 nM hervor (A), während Gabe von  $10^{-6}$  M ANG II einen biphasischen, reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 62 nM (Peak) bzw. um 16 nM (Plateau) hervorrief.

Die Daten aus Tab. 3.8 (S. 77) wurden gegen die ANG II-Konzentration aufgetragen und die logarithmische Form der Hill-Gleichung an die Daten angepasst (Abb. 3.12). Die Gleichung lautet:

$$y = a * (1 + 10^{n(px - pK)})^{-1} \quad (6)$$

wobei :

- a = maximale Amplitude des Effektes
- n = Hill-Koeffizient (= 1)
- px =  $-\log [\text{ANG II}]$
- x =  $[\text{ANG II}]$
- pK =  $-\log K$
- K =  $\text{EC}_{50}$  (ANG II-Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt auftrat)

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

- a =  $11.1 \pm 0.6$
- $p\text{EC}_{50}$  =  $7.96 \pm 0.1 \text{ nM}$
- $\text{EC}_{50}$  = 11 nM (7 nM; 17 nM)

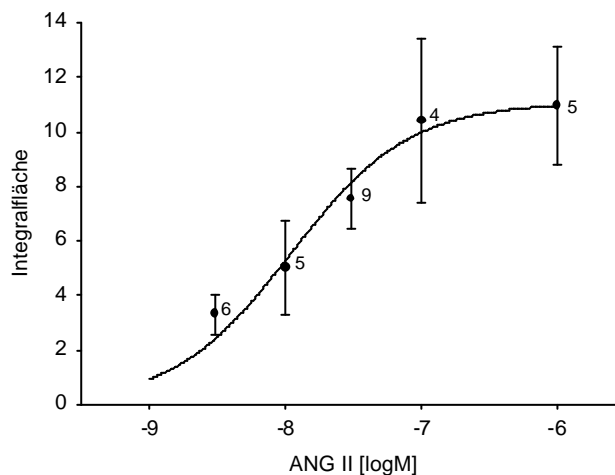


Abb. 3.12: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

Konzentrationsabhängiger Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  repräsentiert durch die Integralfläche (Integral von  $t_0$  bis  $t_8$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM sind gezeigt. Die Kurve zeigt den Hill-Fit über die Mittelwerte.  $\text{EC}_{50} = 11 \text{ nM}$  (7;17)

Da die Peak-Phase erst ab einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M ANG II auftrat, wurden in einem zweiten Ansatz die monophasischen Reaktionen sowie die Plateau-Phasen der biphasischen Reaktionen getrennt davon ausgewertet. Um eine Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit der Peak-Phase machen zu können, wurde das Flächenintegral des Calcium-Anstiegs ab Beginn des Effektes ( $t_0$ ) bis 1 min nach Beginn ( $t_1$ ) vermessen, also über einen Zeitraum von 1 min. Zur Erfassung der Plateau-Phase wurde das Flächenintegral des Calcium-Anstiegs ab 1 min nach Beginn des Effektes ( $t_1$ ) bis 8 min nach Beginn ( $t_8$ ) vermessen. Die Mittelwerte sind in der folgenden Tabelle (3.9) zusammengefaßt:

Tab. 3.9: Konzentrationsabhängiger Effekt von ANG II auf die Peak- bzw. Plateauphase des Calcium-Anstiegs.

ANG II [M]	Peak ( $t_0 - t_1$ )	Plateau ( $t_1 - t_8$ )
$3 \cdot 10^{-9}$	---	$2.33 \pm 0.48$ (6)
$1 \cdot 10^{-8}$	---	$4.53 \pm 0.12$ (5)
$3 \cdot 10^{-8}$	$1.04 \pm 0.08$ (5)	$5.53 \pm 0.12$ (9)
$1 \cdot 10^{-7}$	$1.99 \pm 0.35$ (4)	$8.64 \pm 0.12$ (4)
$1 \cdot 10^{-6}$	$1.78 \pm 0.32$ (5)	$8.09 \pm 0.15$ (5)

Die Daten der Plateau-Phase wurden wie oben beschrieben gegen die ANG II-Konzentration aufgetragen und mit der oben angegebenen Formel gefittet (Abb. 3.13). Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

$$a = 8.5 \pm 0.6$$

$$pEC_{50} = 8.03 \pm 0.2 \text{ nM}$$

$$EC_{50} = 9 \text{ nM (4 nM; 23 nM)}$$

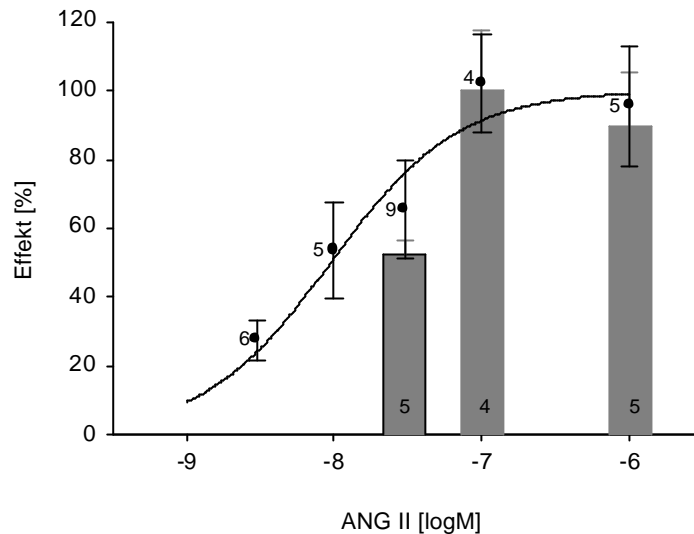


Abb. 3.13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Abhängigkeit von der  $[ANG II]_o$ . Dargestellt ist die Plateauphase (Integralfläche von  $t_1$  bis  $t_8$ ; Kurve) sowie die Peakphase (Integral von  $t_0$  bis  $t_1$ ; Säulendiagramm). Mittelwerte  $\pm$  SEM sind gezeigt.

Die Kurve zeigt den Hill-Fit über die Mittelwerte.  $EC_{50} = 9 \text{ nM}$  (4;23).

### 3.4. Effekte des $K_{ATP}$ -Kanalöffners Levromakalim und des $K_{ATP}$ -Kanalblockers Glibenclamid auf das Membranpotential und die intrazelluläre Calcium-Konzentration

#### 3.4.1. Effekt auf das Membranpotential

Um Änderungen des Membranpotentials in reninsezernierenden Zellen zu messen, wurden diese mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) beladen, welcher auf Hyperpolarisationen mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, auf Depolarisationen mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität reagiert (s. Kapitel 2.2.4, S. 62). Superfundierte man 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK, so nahm die Fluoreszenzintensität um  $4.3 \pm 2.3 \%$  ab, was einer Hyperpolarisation der Zellmembran um  $18 \pm 10 \text{ mV}$  ( $n = 10$ ) entspricht (Abb. 3.14A). Superfusion von 1.0  $\mu\text{M}$  LCRK bewirkte eine Intensitätsabnahme um  $3.6 \pm 1.1 \%$ , was einer Hyperpolarisation um  $15 \pm 5 \text{ mV}$  entspricht ( $n = 9$ ). Zusätzliche Gabe von GBC (1  $\mu\text{M}$ ) während einer durch LCRK ausgelösten Hyperpolarisation führte zu einer Zunahme der

Fluoreszenzintensität, was einer Repolarisation der Membran zurück zum Ausgangspotential entspricht (n = 4 bei 0.3  $\mu\text{M}$  und n = 2 bei 1.0  $\mu\text{M}$  LCRK, s. Abb. 3.14B). Applikation von GBC (1  $\mu\text{M}$ ) alleine oder gleichzeitig mit LCRK (0.3  $\mu\text{M}$ ; Abb. 3.14C) bewirkte keine Änderung der Fluoreszenzintensität (n = 6 bzw. 5).

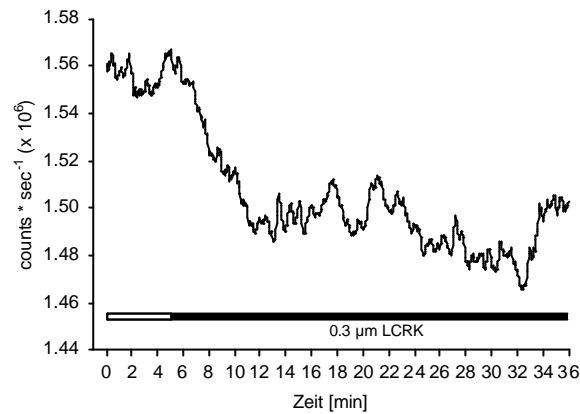


Abb. 3.14A: Effekt von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK auf das Membranpotential in DiBAC<sub>4</sub>(3)-beladenen reninsezernierenden Zellen.

Gabe von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK führte zu einer Abnahme der Fluoreszenz um 4.5 % (entspricht einer Hyperpolarisation um ca. 18 mV).

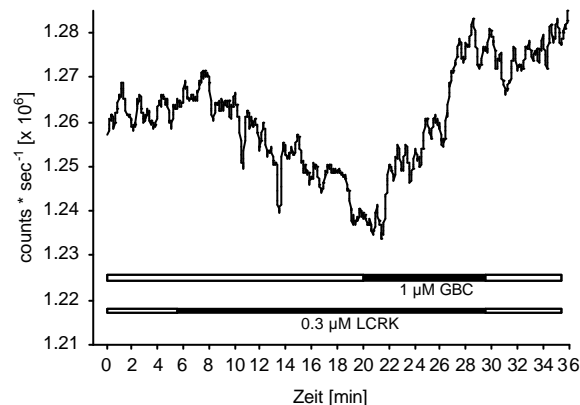


Abb. 3.14B: Effekt von GBC auf die durch Gabe von LCRK hervorgerufene Hyperpolarisation von DiBAC<sub>4</sub>(3)-beladenen reninsezernierenden Zellen.

Gabe von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK führte zu einer Abnahme der Fluoreszenz um 2 % (entspricht einer Hyperpolarisation um ca. 8 mV). Gleichzeitige Superfusion mit 1  $\mu\text{M}$  GBC führte zu einer Zunahme der Fluoreszenz zurück auf den Ausgangswert. Der leichte Anstieg der Fluoreszenz über die Dauer des Experimentes spiegelt wahrscheinlich eine kontinuierliche Farbstoffaufnahme wieder.

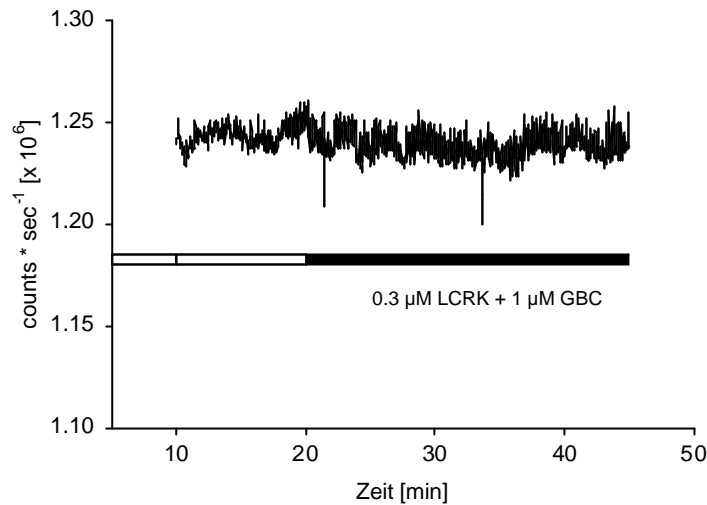


Abb. 3.14C: Effekt von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK + 1  $\mu\text{M}$  GBC auf DiBAC<sub>4</sub>(3)-beladene reninsezernierende Zellen.

Gleichzeitige Superfusion von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK und 1  $\mu\text{M}$  GBC für 25 min führte zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität.

### 3.4.2. Effekt auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$

#### a) Effekt von LCRK auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen

Um zu klären, ob die durch LCRK induzierte Hyperpolarisation einen Effekt auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der reninsezernierenden Zellen hat, wurde zunächst die Wirkung von LCRK auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen untersucht. In diesen Experimenten wurde vor der Gabe von LCRK eine Kontrollstimulation durchgeführt.

In einer ersten Serie wurde das Präparat für 1 min mit ANG II ( $3 \cdot 10^{-9}$  M) gereizt (vgl. Kapitel 3.3., S.77). Nach einer Auswaschphase in HEPES-PS wurde 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK in HEPES-PS superfundiert, wobei es sich um eine Konzentration handelte, die bereits eine maximale Hyperpolarisation erzeugt (Russ *et al.*, 1999). 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK zeigte aber keinen Effekt auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  betrug vor der Gabe  $126 \pm 15$  nM, während der Gabe trat keine Änderung auf ( $\Delta\text{Ca}^{2+} = -1 \pm 3$  nM; n = 4).

In einer zweiten Serie wurde die  $[\text{K}^+]_o$  von 2.8 auf 60 mM erhöht, was einen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zur Folge hatte (Kapitel 3.2.1., S. 69). Superfundierte man im Anschluß 1  $\mu\text{M}$  LCRK

in HEPES-PS, so war kein Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  festzustellen. Unter Ruhebedingungen (2.8 mM  $[K^+]_o$ ) betrug  $[Ca^{2+}]_i$   $100 \pm 6$  nM und änderte sich nicht während der Gabe von 1  $\mu$ M LCRK ( $\Delta Ca^{2+} = -4 \pm 2$  nM; n = 4).

*b) Effekt von LCRK auf  $[Ca^{2+}]_i$  während Stimulation*

Im Anschluß wurde der Effekt von LCRK (0.3  $\mu$ M) auf den durch ANG II ( $3 \times 10^{-9}$  M) hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht. Dazu wurde in Doppelpulsexperimenten zunächst untersucht, ob sich die durch zwei hintereinander durchgeführte Stimulationen mit ANG II ausgelösten Calcium-Anstiege unterscheiden. Die erste Stimulation resultierte in einem Anstieg um  $18 \pm 5$  nM (n = 5), der durch die zweite Stimulation ausgelöste Anstieg betrug  $17 \pm 4$  nM (n = 5). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 dargestellt und in Tab. 3.10 nochmals zusammengefaßt.

Tab. 3.10: Effekt einer zweimaligen Stimulation mit  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	<b>Ca<sup>2+</sup>-Kontrolle [nM]</b>	<b>DCa<sup>2+</sup> [nM]</b>
<b>1. Gabe (<math>3 \times 10^{-9}</math> M ANG II)</b>	$106 \pm 13$ (5)	$18 \pm 5$ (5)
<b>2. Gabe (<math>3 \times 10^{-9}</math> M ANG II)</b>	$102 \pm 12$ (5)	$17 \pm 4$ (5)

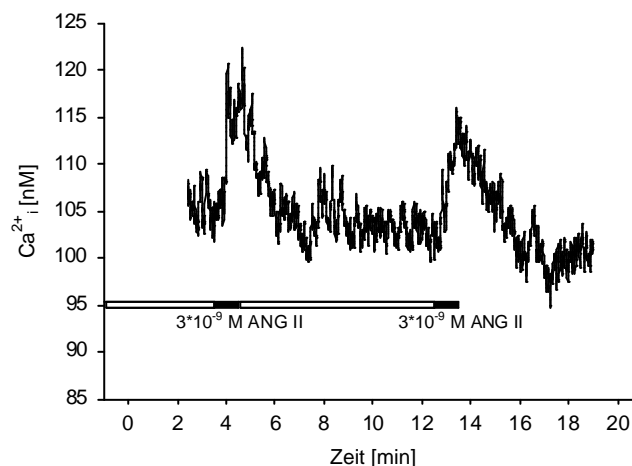


Abb. 3.15: Effekt einer zweimaligen Gabe von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II auf  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Gabe von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II für 1 min führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 9 nM. Eine wiederholte Gabe von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II führte zu einem erneuten, reversiblen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  um 10 nM.



Danach wurden wiederum Doppelpulseperimente durchgeführt, wobei die zweite ANG II-Stimulation in Anwesenheit von LCRK (0.3  $\mu$ M) durchgeführt wurde. Die erste Stimulation mit ANG II führte zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $28 \pm 13$  nM (n = 4). Eine anschließende Superfusion mit LCRK (0.3  $\mu$ M) hatte keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen (s.o.). Zusätzliche Gabe von ANG II führte zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $34 \pm 13$  nM (n = 4). Die beiden Calcium-Anstiege waren nicht signifikant verschieden (Abb. 3.16).

Tab. 3.11: Effekt von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II bzw.  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II + 0.3 mM LCRK auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	<b>Ca<sup>2+</sup>-Kontrolle [nM]</b>	<b>DCa<sup>2+</sup> [nM]</b>
<b>3 * 10<sup>-9</sup> M ANG II</b>	130 ± 14 (4)	28 ± 13 (4)
<b>3 * 10<sup>-9</sup> M ANG II + 0.3 M LCRK</b>	119 ± 15 (4)	34 ± 13 (4)

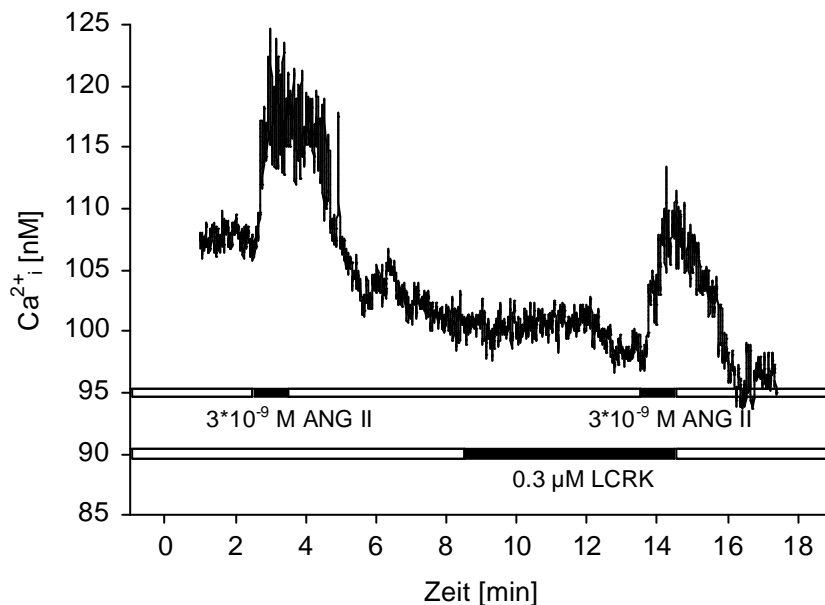


Abb. 3.16: Effekt von 0.3  $\mu$ M LCRK auf den durch  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen. Gabe von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II für 1 min rief einen reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 8 nM hervor. Gabe von 0.3  $\mu$ M LCRK führte zu keiner Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Gleichzeitige Gabe von  $3 \times 10^{-9}$  M ANG II für 1 min rief einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 10 nM hervor.

Im Anschluß an diese Experimente wurde überprüft, ob LCRK einen Einfluß auf den durch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  hat. Dazu wurde zunächst die  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 mM auf 5mM bzw. 20mM erhöht, was einen reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um  $15 \pm 4$  nM ( $n = 4$ ) bzw.  $64 \pm 18$  nM ( $n = 6$ ) hervorrief. Zusätzlich wurde während der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  0.3µM LCRK gegeben, was jedoch keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  hatte. Reduzierte man die  $[Ca^{2+}]_o$  wieder auf 1 mM, so kehrte die  $[Ca^{2+}]_i$  auf ihren Ausgangswert zurück (Abb. 3.17 und 3.18).

Tab. 3.12: Effekt von 5 mM bzw. 20 mM  $[Ca^{2+}]_o$  auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	<b>Ca<sup>2+</sup>-Kontrolle [nM]</b>	<b>ΔCa<sup>2+</sup> [nM]</b>
<b>5 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub></b>	112 ± 9 (4)	15 ± 4 (4)
<b>20 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub></b>	127 ± 9 (6)	64 ± 18 (6)

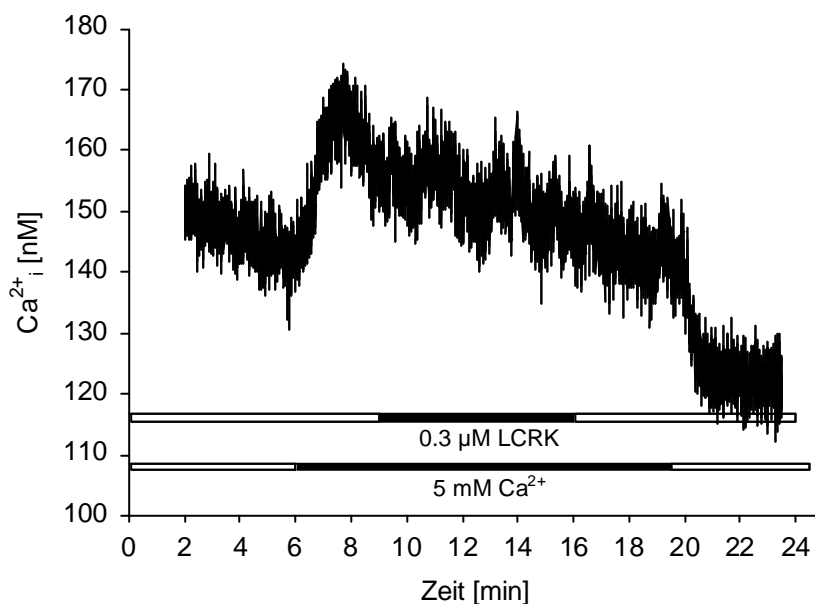


Abb. 3.17: Effekt von 0.3 µM LCRK auf den durch Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  von 2 auf 5 mM hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  auf 5 mM führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 26 nM. Gleichzeitige Gabe von 0.3 µM LCRK für 7 min führte zu keiner weiteren Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ .

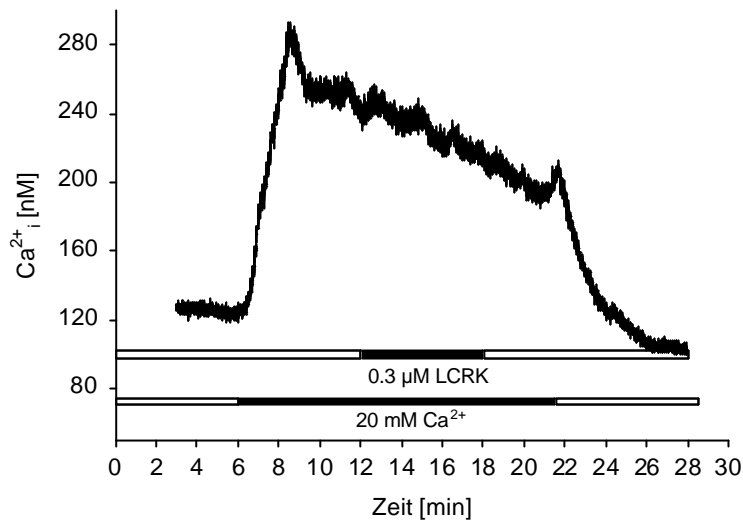


Abb. 3.18: Effekt von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK auf den durch Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  von 2 auf 20 mM hervorgerufenen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen.

Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  auf 20 mM führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um 137 nM. Gleichzeitige Gabe von 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK führte zu keiner weiteren Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Da auch hierbei kein Effekt des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffners festzustellen war, wurde in weiteren Experimenten sowohl  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  von 1 mM auf 5 mM als auch  $[\text{K}^+]_o$  von 2.8 mM auf 20 mM erhöht. Das Ruhemembranpotential der reninsezernierenden Zellen liegt unter normalen Bedingungen ( $[\text{K}^+]_o = 2.8 \text{ mM}$ ) bei  $-61 \pm 1 \text{ mV}$  (Russ *et al.*, 1999). Berechnet man mit Hilfe der Nernst-Gleichung (s. Kapitel 2.2.3.b, S. 50) unter den gleichen Bedingungen das Kalium-Gleichgewichtspotential, so liegt dies bei  $-102 \text{ mV}$ . Da das Membranpotential positiver ist als das Kalium-Gleichgewichtspotential, führt die Öffnung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen zu einem Ausstrom von Kalium und dadurch zu einer Hyperpolarisation. Erhöht man  $[\text{K}^+]_o$  auf 20 mM, so beträgt das Kalium-Gleichgewichtspotential nur noch  $-51 \text{ mV}$ . Gleichzeitig werden die Zellen aber auf ungefähr  $-40 \text{ mV}$  depolarisiert (Haeusler, 1983; Korbmacher *et al.*, 1989), so dass die Öffnung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle immer noch zu einem Kalium-Ausstrom und damit zu einer Hyperpolarisation führt.

Gabe des 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -20 mM  $\text{K}^+$ -Puffers führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $31 \pm 7 \text{ nM}$  ( $n = 8$ ). Gab man während des dadurch hervorgerufenen Calcium-Anstiegs zusätzlich 0.3  $\mu\text{M}$  LCRK, so war keine Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  festzustellen (Abb. 3.19).

Tab. 3.13: Effekt von 5 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 20 mM  $[K^+]_o$  auf  $[Ca^{2+}]_i$ .

	$Ca^{2+}$ -Kontrolle [nM]	$DCa^{2+}$ [nM]
<b>5 mM <math>[Ca^{2+}]_o</math> + 20 mM <math>[K^+]_o</math></b>	$106 \pm 6$ (8)	$31 \pm 7$ (8)

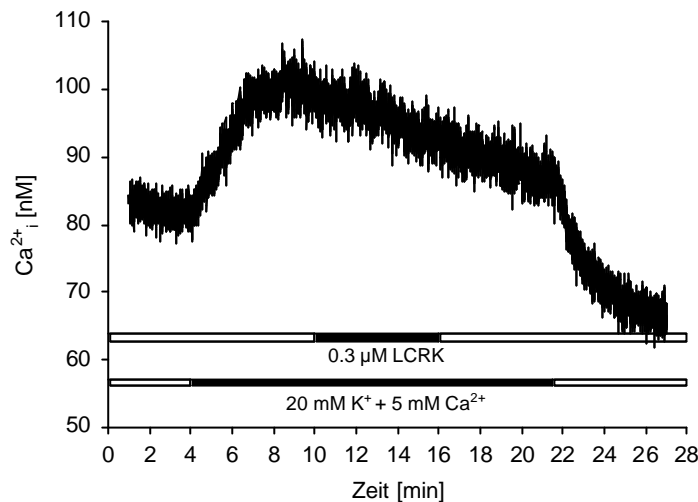


Abb. 3.19: Effekt von 0.3  $\mu$ M LCRK auf den durch gleichzeitige Erhöhung der  $[K^+]_o$  und der  $[Ca^{2+}]_o$  hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Fura-2 beladenen reinsezernierenden Zellen.

Gleichzeitige Erhöhung der  $[K^+]_o$  von 2.8 auf 20 mM sowie der  $[Ca^{2+}]_o$  von 2 auf 5 mM führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um 19 nM. Zusätzliche Gabe von 0.3  $\mu$ M LCRK führte zu keiner weiteren Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß LCRK zwar eine geringe Hyperpolarisation hervorruft, aber weder die  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen noch während Stimulation ( $3 \cdot 10^{-9}$  M ANG II, 5 mM  $[Ca^{2+}]_o$ , 20 mM  $[Ca^{2+}]_o$  oder 5 mM  $[Ca^{2+}]_o$  + 20 mM  $[K^+]_o$ ) beeinflusste.

### 3.5. Untersuchung der Exo- und Endozytose mit FM 1 - 43

Die Idee für die nachfolgend beschriebenen Experimente begründet sich auf der Tatsache, dass es bei exozytotischen Vorgängen an einer Stelle der Plasmamembran zur Verschmelzung von zytoplasmatischen Vesikeln mit der Plasmamembran und damit zu einer Vergrößerung der Oberfläche kommt. Um diese Vergrößerung der Zelloberfläche zu kompensieren, werden Teile der Plasmamembran wieder eingeschnürt und in das Zellinnere verlagert (Endozytose).

Exo- und Endozytose sind also über einen ständigen Membranfluß von und zur Plasmamembran miteinander verknüpft („vesicle recycling“). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde zunächst versucht, endozytotische Prozesse in reninsezernierenden Zellen der Ratte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FM 1-43 nachzuweisen (Kapitel 2.2.4, S. 62). Geht man von obiger Annahme eines permanenten Membranflusses aus, so wäre dies auch ein Nachweis für exozytotische Vorgänge (= Reninsekretion).

Da die FM 1-43 - Pufferlösungen aus Preisgründen nicht superfundiert werden konnten, mußte zu diesem Zweck die Perfusion abgeschaltet werden und die Substanzen mit einer Mikroliterspritze appliziert werden. Dies hatte in den meisten Fällen geringe Erschütterungen zur Folge, welche einen minimalen Positionswechsel der Gefäße und der zu beobachtenden Zellen nach sich zog und einen Vergleich auf subzellulärer Ebene unmöglich machte. Auf der anderen Seite hätte selbst die durch den Badfluß ausgelösten Erschütterungen eine Aufnahme mit dem LSM unmöglich gemacht, weswegen die Art der Substanzgabe bei zukünftigen Experimenten verbessert werden muß. Von insgesamt 120 untersuchten Gefäßen konnten aufgrund dieses Problems nur 35 Gefäße zur Auswertung herangezogen werden, wobei folgendermaßen verfahren wurde:

- Es wurden vier Versuchsserien durchgeführt, wobei in allen 35 Experimenten die Färbung der Zellen nach einer ersten Periode mit der Färbung nach einer zweiten (Stimulations-) Periode verglichen wurde. Während der ersten Periode wurde die Reninsekretion der reninsezernierenden Zellen entweder nicht beeinflusst (HEPES-PS) oder inhibiert (HEPES-PS + 1  $\mu\text{M}$  ANG II, 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + 100 nM ANG II, 100 mM Sucrose-Puffer). In der Stimulationsperiode wurde die Reninsekretion angeregt (HEPES-PS + 10  $\mu\text{M}$  Forskolin + 100  $\mu\text{M}$  IBMX, nominal Calcium-freier Puffer, nominal Calcium-freier Puffer + 10  $\mu\text{M}$  Forskolin + 100  $\mu\text{M}$  IBMX). Sowohl während der ersten Periode als auch während der Stimulationsperiode war FM 1-43 anwesend, wobei sowohl die Dauer der ersten Periode als auch der Stimulationsperiode und damit auch die Dauer der Färbung variiert wurde.
- Da aufgrund der ständigen Anwesenheit des Farbstoffes während der gesamten Meßzeit die Hintergrundfärbung anstieg, fiel der Vergleich der Färbungen sehr schwer. Daher wurde in 11 der 35 Experimente versucht, überschüssigen Farbstoff aus der Membran auszuwaschen, um so eine eventuell erfolgte intrazelluläre Färbung besser detektieren zu können. Das Auswaschen des Farbstoffs geschah zwischen den beiden Perioden (8

Experimente) oder danach, falls eine zweite Stimulation durchgeführt wurde (3 Experimente).

- Aus dem gleichen Grund wurde in 3 der 35 Experimente die Reninsekretion nach einer ersten Stimulationsperiode in einer zweiten Stimulationsperiode in Abwesenheit des Farbstoffes FM 1-43 erneut angeregt. Wenn während der ersten Stimulationsperiode Farbstoff aufgenommen wird, kann in einer zweiten Stimulationsperiode in Abwesenheit des Farbstoffes überprüft werden, ob die intrazelluläre Färbung wieder abnimmt. Dies ist dann ein Hinweis dafür, daß die farbstoffgefüllten endozytierten Membranvesikel erneut zum Aufbau von Reningranula benutzt und bei der darauffolgenden Stimulation in den Extrazellulärraum exozytiert wurden (Betz und Bewick, 1992).

### 1. Serie

Während der ersten Periode wurden die Gefäße mit HEPES-PS superfundiert, anschließend wurde eine Stimulation mit dem Adenylatzyklaseaktivator Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) und dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Wie oben vermerkt, war der Farbstoff während der gesamten Zeit anwesend.

Die Anzahl der untersuchten Gefäße betrug 7, die Experimente wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 5 min Kontrollperiode, anschließend 5 min Stimulationsperiode (3 Gefäße).
- 5 min Kontrollperiode, anschließend 15 min Stimulationsperiode (1 Gefäß).
- 15 min Kontrollperiode, anschließend 15 min Stimulationsperiode (3 Gefäße).

In keinem Fall war ein Unterschied zwischen den unstimulierten und den stimulierten Gefäßen zu sehen.

### 2. Serie

Bei diesen Experimenten wurde während der ersten Periode die Reninsekretion mit HEPES-PS + ANG II (1  $\mu\text{M}$ ) inhibiert. Danach wurde wie beim ersten Vergleich eine Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Forskolin + 100 $\mu\text{M}$  IBMX durchgeführt (Abb. 3.20A und B). Auch in diesen Experimenten war der Farbstoff immer anwesend, nur nicht während der Waschperioden.

Es wurden insgesamt 17 Gefäße untersucht, wobei folgende Protokolle verwendet wurden:

- 5 min Inhibitionsperiode, anschließend 5 min Stimulationsperiode (8 Gefäße).
- 5 min Inhibitionsperiode, anschließend 10 min Stimulationsperiode (2 Gefäße).
- 10 min Inhibitionsperiode, anschließend 10 min Stimulationsperiode (2 Gefäße).

- 6 min Inhibitionsperiode, anschließend 6 min Stimulationsperiode. Danach wurden die Gefäße für 9 min in HEPES-PS gewaschen und anschließend in Abwesenheit von FM 1-43 für 15 min stimuliert (3 Gefäße).
- 15 min Inhibitionsperiode, 6 min waschen in HEPES-PS, anschließend 6 min Stimulationsperiode (2 Gefäße).

Auch bei diesen Experimenten zeigte sich kein Unterschied zwischen den unstimulierten und den stimulierten Gefäßen.

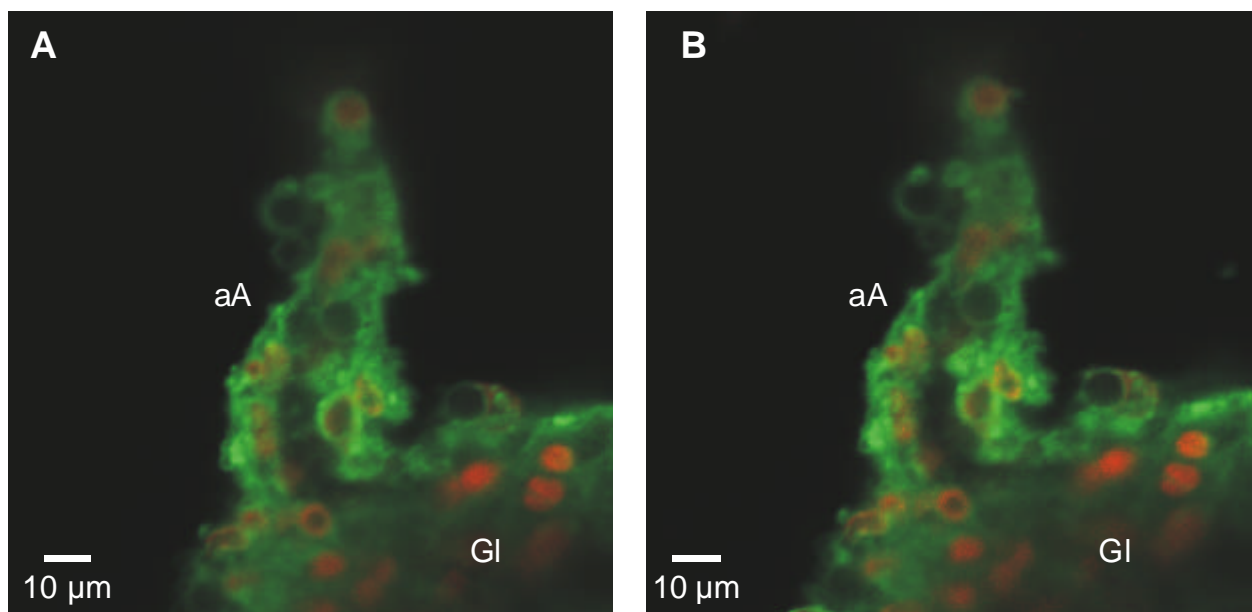


Abb. 3.20: Konfokale Aufnahme eines frisch isolierten Glomerulus mit anhängender afferenter Arteriole aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Das Präparat wurde mit dem Exo-, Endozytosemarker FM 1-43 (grün), sowie dem Nukleinsäurefarbstoff Syto 59 (rot) gefärbt. FM 1-43 lagert sich in die Plasmamembran der Zellen ein und wird bei endozytotischen Prozessen in Vesikel eingeschlossen und in die Zellen aufgenommen, was zu einer Anfärbung des Zytoplasmas führt.

Während der ersten Periode wurde die Reninsekretion für 5 min mit 1 µM ANG II inhibiert (A), wogegen sie während der zweiten Periode für 5 min mit 10 µM Forskolin + 100 µM IBMX stimuliert wurde (B). Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist kein Unterschied in der Färbung festzustellen..

aA, afferente Arteriole; Gl, Glomerulus.

### 3. Serie

Während der ersten Periode wurde die Reninsekretion mit 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + 100 nM ANG II inhibiert. Während der sich anschließenden Stimulationsperiode wurden die Gefäße mit nominal Calcium-freiem Puffer superfundiert.

Bei den beiden untersuchten Gefäße wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 6 min Inhibitionsperiode, 6 min waschen in HEPES-PS, anschließend 5 min Stimulationsperiode (2 Gefäße).

In beiden Experimenten war kein Unterschied zwischen den Färbungen vor und nach Stimulation erkennbar.

### 4. Serie

Bei diesem Vergleich wurde die Reninsekretion während der ersten Periode mit 100 mM Sucrose-Puffer inhibiert (osmotische Inhibition), wogegen die Stimulation in nominal Calcium-freiem Puffer (Abb. 3.21A-C) oder nominal Calcium-freiem Puffer + 10  $\mu\text{M}$  Forskolin + 100  $\mu\text{M}$  IBMX durchgeführt wurde.

Die Anzahl der untersuchten Gefäße betrug 7 bei Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und 2 bei Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + Forskolin + IBMX.

Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer

- 5 min Inhibitionsperiode, anschließend 5 min Stimulationsperiode (3 Gefäße).
- 5 min Inhibitionsperiode, 5 min waschen in HEPES-PS, anschließend 5 min Stimulationsperiode (3 Gefäße).
- 15 min Inhibitionsperiode, 5 min waschen in HEPES-PS, anschließend 5 min Stimulationsperiode (1 Gefäß).

Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + Forskolin + IBMX

- 5 min Inhibitionsperiode, anschließend 5 min Stimulationsperiode (2 Gefäße).

Es war weder nach Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, noch nach Stimulation mit 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + Forskolin + IBMX ein Effekt auf die Färbung der Zellen festzustellen.



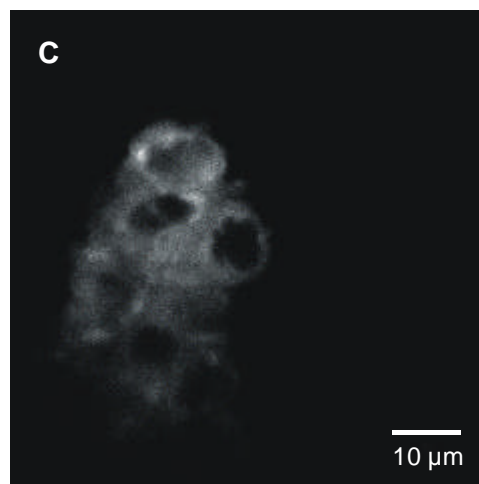
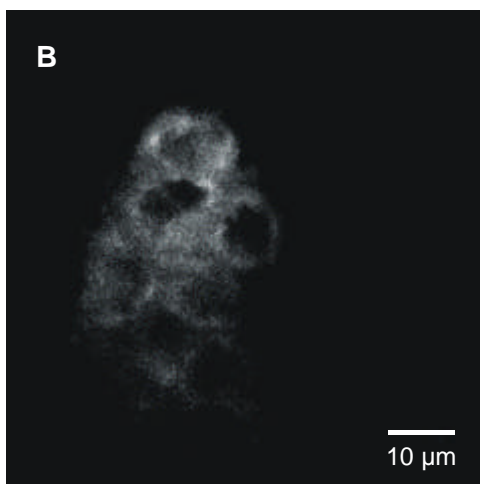
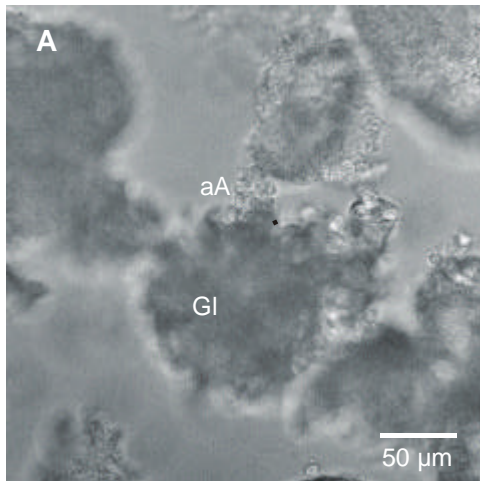


Abb. 3.21A-C:

(A): Hellfeldbild eines frisch isolierten Glomerulus einer kochsalzarm ernährten Ratte mit anhängender afferenter Arteriole. aA, afferente Arteriole; Gl, Glomerulus.

(B) und (C): Konfokale Aufnahmen eines Teils der afferenten Arteriole des in (A) gezeigten Präparates, welches mit dem Exo-, Endozytosemarker FM 1-43 gefärbt wurde.

Während der ersten Periode wurde die Reninsekretion für 5 min mit 100 mM Sucrose-Puffer inhibiert (A); in der zweiten Periode wurde die Sekretion für 5 min mit 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer stimuliert (B). Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist kein Unterschied in der Färbung zu sehen.

Bei keinem der hier durchgeführten Experimente konnte mit dem Exo-, Endozytosemarker FM 1-43 der Vorgang der Reninsekretion sichtbar gemacht werden. Diese Beobachtung war weder von der verwendeten Inhibition, von dem verwendeten Stimulus, noch von der Stimulationszeit oder den Auswaschzeiten des Farbstoffs abhängig.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Immunfluoreszenz

Die Lokalisation der reninsezernierenden Zellen sowie die Auswirkungen einer kochsalzarmen Diät auf die Häufigkeit der reninsezernierenden Zellen erfolgte in dieser Arbeit mit Immunfluoreszenzfärbungen an fixierten Kryoschnitten aus der Rattenniere. Zur Lokalisierung wurde ein polyklonaler Anti-Rattenrenin-Antikörper aus dem Kaninchen und ein Endothelzell-spezifischer Antikörper aus der Maus gegen den „von-Willebrand-Faktor“ verwendet (s. Kapitel 2.1.2.b, S. 31). Letzterer ermöglichte eine bessere Orientierung im Schnitt, da durch diese Färbung der Verlauf der Gefäße verfolgt werden konnte. Die reninsezernierenden Zellen waren in der afferenten Arteriole lokalisiert, was sich mit in Paraffinschnitten gewonnenen Befunden von Taugner *et al.* (1982) und Bührlé *et al.* (1984) deckt. Sosath beschrieb 1999 unter Verwendung des gleichen Anti-Rattenrenin-Antikörpers eine ebensolche Lokalisierung der reninsezernierenden Zellen in isolierten Glomerula.

Reninsezernierende Zellen sind metaplastisch veränderte glatte Muskelzellen und befinden sich in der Media der afferenten Arteriole (s. Kapitel 1). Die Anzahl der reninpositiven afferenten Arteriolen und die Anzahl der reninpositiven Zellen pro Arteriole ist nicht konstant, sondern ändert sich z.B. während der Ontogenese. So beschreiben Reddi *et al.* (1997) eine Reduktion der Anzahl reninpositiver Zellen während der Entwicklung der Ratte ausgehend vom Fetus bis zum adulten Tier.

Weiterhin können auch pathophysiologische Vorgänge Einfluß auf die Anzahl der reninsezernierenden Zellen und reninpositiven Arteriolen nehmen. Beim Menschen stellten Konda *et al.* (1996) eine Erhöhung der Anzahl reninpositiver Gefäße bei fibrotischen Veränderungen der Niere als Folge von Harnwegserkrankungen fest.

Auch unter Normalbedingungen sind die reninsezernierenden Zellen weder gleichmäßig über alle afferenten Arteriolen verteilt, noch ist ihre Anzahl pro Gefäß konstant, da eine ständige Anpassung an physiologische Vorgänge stattfindet (Taugner *et al.*, 1982 und Hackenthal *et al.*, 1987). So ist bekannt, daß es unter Kochsalzrestriktion zu einer vermehrten Umwandlung von glatten Muskelzellen in reninsezernierende Zellen kommt und sich der RPB damit weiter nach proximal erstreckt (Bührlé *et al.*, 1984; Hackenthal *et al.*, 1987). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde einem Teil der Ratten eine einmalige Applikation von Furosemid verabreicht. Diese Tiere wurden anschließend noch mind. 14 Tage kochsalzarm

ernährt (s. Kapitel 2.1.3., S. 37). Das Schleifendiuretikum Furosemid bewirkte eine vermehrte Ausscheidung von NaCl, was bereits zu Beginn der kochsalzarmen Diät die Menge an körpereigenem NaCl erniedrigte und den Umwandlungsprozeß der glatten Muskelzellen in reninsezernierende Zellen beschleunigte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Furosemidapplikation in Kombination mit einer kochsalzarmen Diät sowohl die Anzahl reninpositiver Arteriolen um rund 17 % (76.7 % bei Normaldiät bzw. 93.5 % bei NaCl-armer Diät) als auch die Länge des RPB im Mittel um ca.  $8 \pm 4.5 \mu\text{m}$  von  $45 \pm 2 \mu\text{m}$  ( $n = 70$  Gefäße) bei Normaldiät auf  $53 \pm 4 \mu\text{m}$  ( $n = 44$  Gefäße) bei NaCl-armer Diät steigerte. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit weiteren Befunden. Hackenthal *et al.* (1987) beschreiben für normal ernährte Mäuse eine Länge des reninpositiven Bereichs der afferenten Arteriole von  $45.4 \pm 10.5 \mu\text{m}$  ( $n=60$  Gefäße), wogegen bei NaCl-armer Ernährung die Länge auf  $54.3 \pm 13.7 \mu\text{m}$  ( $n=60$  Gefäße) ansteigt. Für normal ernährte Ratten geben sie eine Länge von  $36.8 \pm 35 \mu\text{m}$  ( $n=38$  Gefäße) an, wogegen bei Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch Adrenalektomie die Länge auf  $52 \pm 49 \mu\text{m}$  ( $n=29$  Gefäße) ansteigt.

In frisch isolierten reninsezernierenden Zellen konnten mit Hilfe des hier verwendeten Anti Rattenrenin-Antikörpers und der konfokalen Mikroskopie sogar im Cytosol liegende Reningranula dargestellt werden. Die Granula konnten bisher nur durch die Elektronenmikroskopie dargestellt werden (z.B. Hackenthal *et al.*, 1990), so dass dies die erste Darstellung der Reningranula mit Immunfluoreszenz ist. Kurtz *et al.* (1986) waren zwar ebenfalls in der Lage, isolierte reninsezernierende Zellen in Primärkultur mit der Immunfluoreszenz nachzuweisen, jedoch erfolgte der Nachweis der Granula mit der Protein A-Gold Technik in Ultradünnschnitten mit Hilfe eines Elektronenmikroskops. Die hier gewonnenen Ergebnisse stehen in Einklang mit Befunden von Sosath (1999), die mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode ebenfalls isolierte reninsezernierende Zellen anfärben konnte, und unterstreicht die Ergebnisse von Albinus *et al.* (1998), die dieses Präparat zur quantitativen Bestimmung der Reninsekretion verwenden.

Wie in Kapitel 2.2.2.b (S. 40) schon erwähnt, steht eine Aufreinigung des Anti-Rattenrenin-Antikörpers sowie die Überprüfung der Spezifität im Western-Blot noch aus. Die sehr gute Übereinstimmung der in dieser Arbeit erhaltenen Resultate bezüglich der Lokalisation der reninsezernierenden Zellen in Kryoschnitten der Rattenniere mit bereits veröffentlichten Untersuchungen sowie der Nachweis der Reningranula in isolierten reninsezernierenden Zellen belegen jedoch deutlich, dass es sich um eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion handelt.

## 4.2. Charakterisierung der in mikrofluorimetrischen Experimenten untersuchten Zellen

An dieser Stelle soll zunächst diskutiert werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit die in den mikrofluorimetrischen Experimenten untersuchten Zellen tatsächlich reninsezernierende Zellen waren.

Wie in Kapitel 2.2.3.a (S. 43) angegeben betrug die Länge des Messfensters bei Verwendung des Photomultipliers 30  $\mu\text{m}$ , die Länge der ausgewerteten Region (ROI) bei Verwendung der Restlichtkamera betrug ca. 20-30  $\mu\text{m}$ . Geht man von den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung aus, so besitzen 93.5 % aller afferenter Arteriolen aus kochsalzarm ernährten Ratten reninsezernierende Zellen bis in eine Entfernung von 20  $\mu\text{m}$  proximal vom Gefäßpol und 21 % besitzen reninsezernierende Zellen bis in eine Entfernung von 30  $\mu\text{m}$  proximal vom Gefäßpol (s. Kapitel 3.1, Abb. 3.2, S. 67). Bei Verwendung des Photomultipliers wurden wie in Kapitel 2.2.3.a (S. 43) beschrieben keine Haltepipetten verwendet, so dass sich das Messfenster möglicherweise nicht immer genau am Gefäßpol befand sondern weiter proximal. Die Gründe hierfür liegen darin begründet, dass erstens im Durchlicht der Übergang der afferenten Arteriole in den Glomerulus nur schwer zu erkennen ist und es zweitens auch möglich ist, dass der Gefäßpol etwas unterhalb des Glomerulus lag. Die Entfernung, um die das Messfenster in einigen Fällen möglicherweise weiter proximal vom Gefäßpol lag, beträgt schätzungsweise nicht mehr als 20  $\mu\text{m}$ . Es ist unwahrscheinlich, dass der Glomerulus größere Teile des Gefäßes bedeckt hätte, da dies eine schlechte Haftung und damit eine instabile Lage zur Folge gehabt hätte. Rechnet man die 20  $\mu\text{m}$  zu den 30  $\mu\text{m}$  (Länge des Meßfensters) hinzu, so ergibt sich eine maximale Distanz von 50  $\mu\text{m}$  vom Glomerulus. Die Wahrscheinlichkeit, afferente Arteriolen mit einem reninpositiven Bereich von 50  $\mu\text{m}$  zu finden liegt nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenz nur bei ca. 13 %. Dies würde bedeuten, dass nicht nur reninsezernierende Zellen sondern auch glatte Muskelzellen innerhalb des Messfensters lagen. Diese Abschätzung ist aber nur richtig, wenn eine zufällige Auswahl unter den Gefäßen getroffen wird, was aber nicht der Fall war. Es wurden nur solche Gefäße für Experimente verwendet, die abgerundete, plumpe Zellen aufwiesen, also nicht dem spindelförmigen Zelltyp der glatten Muskelzelle entsprachen (Gattone *et al.*, 1984; Bührle *et al.*, 1985; Hackenthal *et al.*, 1990; Kapitel 1.2, S. 8). Es ist zwar denkbar, dass die Methode der enzymatischen Präparation (Kapitel 2.2.1, S. 37) Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen hatte, jedoch waren beide Zelltypen trotzdem oft deutlich zu unterscheiden und bei Verwendung der Restlichtkamera wurde die Region über die ausgewertet wurde nur über diese rundlichen Zellen gelegt (s. Kapitel 2.2.3.a, Abb.2.5, S. 49).

Schließlich ist noch anzumerken, dass alle Zellen innerhalb des Gefäßes, also auch solche, die sich nicht innerhalb des Messfensters befanden auf die in dieser Arbeit untersuchten Stimuli gleich reagierten und diesbezüglich keine Unterschiede festzustellen waren. Dies ist für ANG II in Abbildung 4.1 A-C (S. 98) gezeigt. Daraus könnte man folgern, dass sich glatte Muskelzellen und die daraus entstehenden reninsezernierenden Zellen (s. Kapitel 1.2, S.8) hinsichtlich der Reaktion auf in dieser Arbeit untersuchte Stimuli nicht unterscheiden, was auf die gleichen Calcium-Regulationsmechanismen hindeutet. Man muß aber berücksichtigen, daß die reninsezernierenden Zellen mit glatten Muskelzellen, mit EGM und mit Endothelzellen über gap junctions verbunden sind, so daß es unmöglich ist, aus diesen Beobachtungen auf den Kanalbesatz der reninsezernierenden Zellen zu schließen (s.a. Kapitel 1.3.1., S. 14 sowie Kapitel 4.3.1., S. 97).

### **4.3. Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration vom Membranpotential und von der extrazellulären Calcium-Konzentration**

#### **4.3.1. Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Calcium-Einstrom bei Depolarisation mit Kalium**

Eine Erhöhung der  $[K^+]_o$  führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte, der bei einer Erhöhung von 2.8 mM  $[K^+]_o$  auf 20 mM  $[K^+]_o$   $18 \pm 3$  nM, bei einer Erhöhung auf 30 mM  $[K^+]_o$   $29 \pm 3$  nM und bei einer Erhöhung auf 60 mM  $[K^+]_o$   $38 \pm 4$  nM betrug (Kapitel 3.2.1, S. 70, Abb. 3.4). Dieser Anstieg beruhte auf einem Einstrom von extrazellulärem Calcium, was durch Entzug des extrazellulären Calciums (0  $Ca^{2+}$ -Puffer) gezeigt werden konnte (Kapitel 3.2.2, S. 72, Abb. 3.6). Diesem Puffer wurde nicht nur kein  $CaCl_2$  zugesetzt, die  $[Ca^{2+}]_o$  war durch Zusatz von 5 mM EGTA so stark gepuffert worden, daß der Calcium-Gradient definitiv nicht mehr einwärtsgerichtet war und kein Einstrom mehr erfolgen konnte. Superfundierte man die Zellen mit diesem Puffer, so kam es zu einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  (Kapitel 3.2.2, S. 72), was auch für Tubuluszellen der Henle-Schleife, für Zellen der Macula Densa (Salomonsson *et al.*, 1991) sowie für glatte Muskelzellen (Somlyo und Himpens, 1989) beschrieben wurde. Bei gleichzeitiger Gabe von 30 mM  $[K^+]_o$  war unter diesen Bedingungen keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  mehr festzustellen. Unter Normalbedingungen (HEPES-PS) erfolgte der Einstrom über spannungsaktivierte Calcium-Kanäle, was durch gleichzeitige Gabe des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin gezeigt werden konnte (Kapitel 3.2.3, S. 74, Abb. 3.8). Isradipin gehört zur Gruppe der

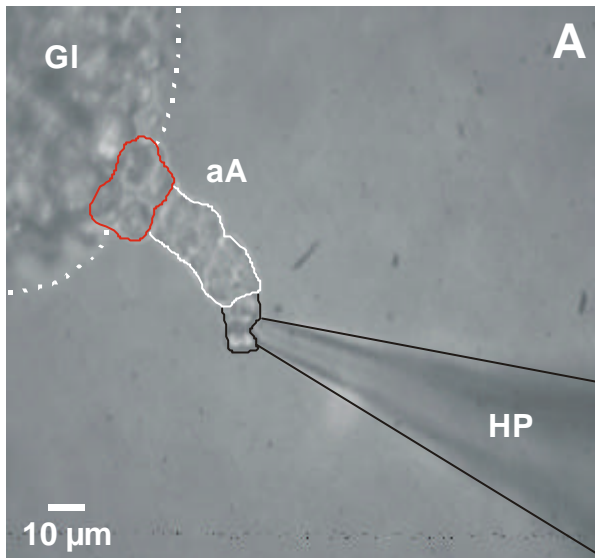


Abb. 4.1A: Hellfeldbild eines frisch isolierten Glomerulus mit anhängender afferenter Arteriole aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Der rote Rahmen kennzeichnet das Meßfeld (ROI), in dem die reninsezernierenden Zellen liegen, der weiße Rahmen den proximalen Abschnitt des Gefäßes, in dem sich die glatten Muskelzellen befinden, der schwarze Rahmen die Haltepipette (HP) sowie die Zellen, an denen die HP ansetzt. Die gestrichelte weiße Linie kennzeichnet die sichtbaren Grenzen des Glomerulus. aA, afferente Arteriole; GI, Glomerulus.

Die Aufnahme erfolgte mit einer Restlichtkamera (IC-200, PTI) unter Verwendung eines 100x Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektivs (Nikon).

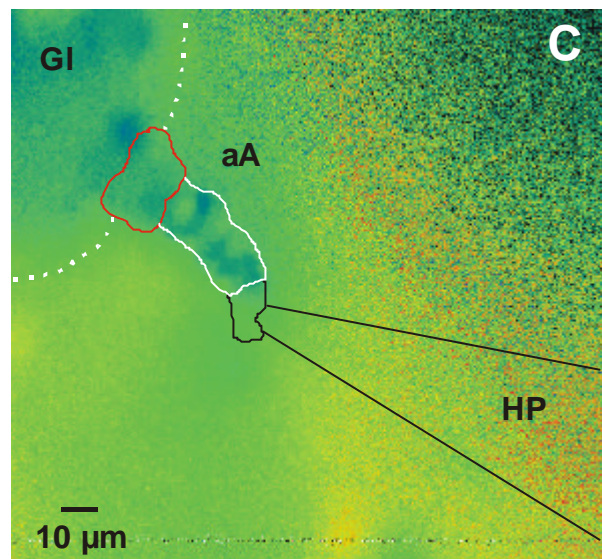
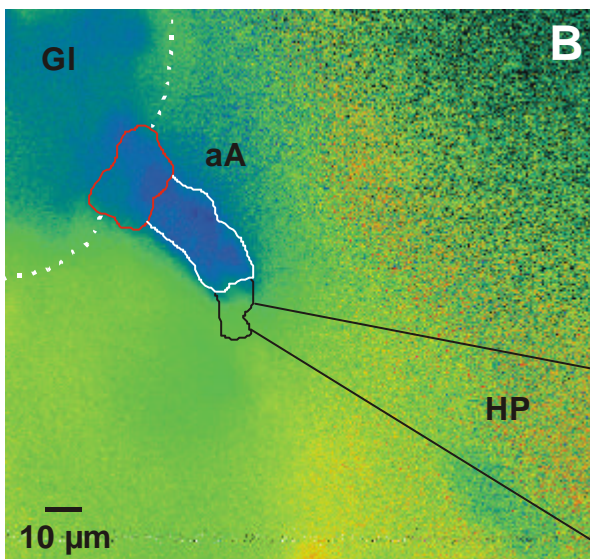


Abb. 4.1B und C: Falschfarbendarstellung des in 4.1A dargestellten Präparates.

Die Farben spiegeln die  $[Ca^{2+}]_i$  in den Zellen wieder, wobei blau eine geringe Konzentration (hier ca. 85 nM), grün eine höhere Konzentration (hier ca. 120 nM) codiert. Bei den hier gezeigten Abbildungen handelt es sich um errechnete Bilder, welche den Quotienten aus zwei getrennten Aufnahmen darstellen. Zunächst wurde die Fluoreszenzintensität bei 340 nm Anregung, dann bei 380 nm Anregung (gemessen bei 510 nm) aufgenommen, die Hintergrundfärbung abgezogen und dann die hier gezeigten Bilder berechnet. Der scheinbare Calcium-Gehalt des Hintergrundes entspricht nicht der Realität sondern beruht auf dem, in diesem Fall nutzlosen, Rechenergebnis des Programms. (B) ist eine Darstellung der  $[Ca^{2+}]_i$  während der Perfusion mit HEPES-PS, während (C) die Situation während Stimulation mit  $1 \cdot 10^{-8}$  M ANG II widerspiegelt. Es ist deutlich zu sehen, daß alle Zellen innerhalb wie außerhalb des Meßfeldes (roter Rahmen) gleich auf den Stimulus reagieren.

Dihydropyridine, einer der drei Substanzgruppen, die als Blocker spannungsaktivierter Calcium-Kanäle beschrieben werden. Die Dihydropyridine binden mit hoher Affinität an inaktivierte Calcium-Kanäle, wobei sie ihre Bindungsstelle von der extrazellulären Seite aus erreichen (Catterall und Striessnig, 1992).

Die hier gewonnenen Ergebnisse werden durch bereits veröffentlichte Daten gestützt. Fishman beschrieb bereits 1976, daß eine Erhöhung der  $[K^+]_o$  auf ungefähr 60 mM reninsezernierende Zellen der Maus depolarisierte. Depolarisation führt in glatten Gefäßmuskelzellen, aus denen sich reninsezernierende Zellen entwickeln, zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , der auf einem Calcium-Einstrom beruht (Somlyo und Himpens, 1989). Weiterhin konnten Salomonsson *et al.* (1997) in afferenten Arteriolen vom Kaninchen einen durch Applikation von 25 mM  $[K^+]_o$  ausgelösten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  messen, von dem sie annehmen, daß er durch einen Einstrom durch L-Typ Calcium-Kanäle erfolgte. Im Gegensatz dazu konnten Kurtz und Penner (1990) in Fura-2 beladenen reninsezernierenden Zellen der Maus bei Applikation von 80 mM  $[K^+]_o$  zwar ebenfalls eine Depolarisation jedoch keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  messen. Die hier gezeigten Experimente machen einen Calcium-Einstrom über spannungsaktivierte L-Typ Calcium-Kanäle sehr wahrscheinlich (s. Kapitel 3.2.3, S. 73), wobei es allerdings bezüglich deren Vorhandensein in reninsezernierenden Zellen widersprüchliche Ergebnisse gibt. Kurtz und Penner (1990) konnten nicht nur keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachten (s.o.), sie konnten in voltage clamp Experimenten auch keine für spannungsaktivierte Calcium-Kanäle typischen Einwärtsströme messen, was allerdings auch auf einen schnellen Aktivitätsverlust der Kanäle zurückzuführen sein kann (Kurtz und Penner, 1990). Sie untersuchten 150 Zellen, die bis zu 100  $\mu$ m vom Glomerulum entfernt waren, ohne daß Unterschiede bezüglich des Verhaltens dieser Zellen festgestellt werden konnten (Kurtz und Penner, 1990). In weiteren Experimenten konnten Scholz und Kurtz (1995) in glatten Muskelzellen, die sich in einer Entfernung von mehr als 100  $\mu$ m vom Glomerulum entfernt befanden einen Dihydropyridin-sensitiven Calcium-Anstieg auf Depolarisation nachweisen, nicht jedoch in Zellen in einer Entfernung bis maximal 50  $\mu$ m vom Glomerulum. Laut Hackenthal *et al.* (1990) kommen reninsezernierende Zellen in der afferenten Arteriole der Maus bis in eine Entfernung von über 100  $\mu$ m vor, jedoch beträgt bereits in einer Entfernung von 30  $\mu$ m die Wahrscheinlichkeit eine solche Zelle anzutreffen nur noch 50 %. Neben reninsezernierenden Zellen kommen in den afferenten Arteriolen noch glatte Muskelzellen vor (Hackenthal *et al.*, 1990), von denen bekannt ist, daß sie über spannungsaktivierte Calcium-Kanäle verfügen. Karaki *et al.* (1997) nennen den L-Typ Calcium-Kanal als einen der Hauptwege für einen Calcium-Einstrom in glatten Muskelzellen.

Weiterhin konnte durch Depolarisation mit Kalium die Reninsekretion inhibiert werden, was in Kapitel 1.3.1. (S.14) bereits erläutert wurde. Der hier beobachtete  $[K^+]_o$ -abhängige Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beruht wahrscheinlich auf einer Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsaktivierten Calcium-Kanäle mit zunehmender Depolarisation, wie es für glatte Gefäßmuskelzellen bereits beschrieben wurde (Nelson *et al.*, 1990). In diesem Zusammenhang wäre es interessant den Nachweis der L-Typ Calcium-Kanäle auf reninsezernierenden Zellen mittels Immunfluoreszenz zu versuchen, da die Probleme, die einen elektrophysiologischen Nachweis erschweren, dabei keine Rolle spielen.

Eine weitere Möglichkeit, die zu den beobachteten Anstiegen der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen bei Depolarisation mit Kalium geführt haben könnte, beruht auf der Tatsache, dass diese Zellen über gap junctions mit den benachbarten glatten Muskelzellen, den EGM sowie den Endothelzellen verbunden sind (Kapitel 1.3.1., S.13). Es wäre denkbar, dass die Depolarisation mit  $[K^+]_o$  zu einem Calcium-Einstrom über spannungsaktivierte Calcium-Kanäle in glatte Muskelzellen führte und sich dieser Calcium-Anstieg als „Calcium-Welle“ über die gap junctions in die benachbarten reninsezernierenden Zellen ausbreitete. Dies würde auch erklären, weshalb bei Gabe des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zu sehen war, da ein möglicherweise die „Calcium-Welle“ auslösender Einstrom über spannungsaktivierte Calcium-Kanäle in glatte Muskelzellen ebenfalls inhibiert wäre. Diese Art der Weiterleitung eines Calcium-Anstiegs in benachbarte Zellen wurde bereits für eine Vielzahl von Zellen beschrieben, so z.B. für Chondrozyten und Synovialzellen in Co-Kultur (D'andrea *et al.*, 1998), für Herzmuskelzellen (Miura *et al.*, 1998) und für Endothelzellen der Koronararterie des Schweins in Primärkultur (Domenighetti *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob solch ein Mechanismus hier eine Rolle spielt, müssen in zukünftigen Untersuchungen die gap junctions vor der Depolarisation mit  $[K^+]_o$  entkoppelt werden.

#### **4.3.2. Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bei Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration**

Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  führte zu einem reversiblen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte (Kapitel 3.2.4, S. 75, Abb. 3.9), was auf eine relativ starke Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$  von der  $[Ca^{2+}]_o$  und damit auf eine erstaunlich hohe Calcium-Permeabilität schließen läßt. Dieser Anstieg war nicht Isradipin-sensitiv, erfolgte also nicht wie bei Depolarisation mit Kalium über spannungssensitive Calcium-Kanäle (Kapitel 3.2.4., S. 75, Abb. 3.10).



Die wahrscheinlichste Ursache ist ein Calcium-Einstrom durch spannungsunabhängige Calcium-Kanäle, die unter Ruhebedingungen geöffnet sind. In Tubuluszellen der Ratte führte eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , der ebenfalls auf einen passiven Einstrom durch spannungsunabhängige Calcium-Kanäle zurückgeführt wurde (Taniguchi *et al.*, 1989). Die Einstellung eines neuen Calcium-Gleichgewichts soll dabei auf einem Gleichgewicht zwischen passivem Einstrom und aktivem Auswärtstransport (v.a. Calcium-ATPasen) beruhen, wobei es möglicherweise auch zu einer Aufnahme von Calcium in Mitochondrien, zur Stimulation von Calcium-ATPasen bei steigender Calcium-Konzentration (evtl. über Calmodulin) und / oder zu einer geringeren Permeabilität bei steigender  $[Ca^{2+}]_i$  (Calcium-abhängige Calcium-Kanäle) kommen kann (Taniguchi *et al.*, 1989).

Neben den spannungssensitiven und -insensitiven Calcium-Kanälen gibt es noch weitere Wege, die zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führen können. Bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  kommt es zu einer Verlangsamung des Natrium-Calcium-Austauschers (Mechmann und Pott, 1986), was den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  z.T. erklären könnte. Gleichzeitig wurde zur Aufrechterhaltung der Osmolalität bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 mM auf 20 mM die  $[Na^+]_o$  von 140 mM auf 111.5 mM verringert. Entzug des  $[Na^+]_o$ , durch Verwendung von nominell  $Na^+$ -freier Lösung (148 mM NaCl wurden isoosmotisch durch NMDG ersetzt), führte in afferenten Arteriolen des Kaninchens zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Fowler *et al.*, 1996), eine Beobachtung, die auch von Nelson *et al.* (1999) bei Reduktion des  $[Na^+]_o$  von 150 mM auf 2 mM in afferenten Arteriolen der Ratte gemacht, und in beiden Fällen auf eine Umkehr der Transportrichtung des Natrium-Calcium-Austauschers zurückgeführt wurde. Dazu dürfte es in den hier durchgeführten Untersuchungen wegen der vergleichsweise geringen Abnahme der  $[Na^+]_o$  zwar nicht gekommen sein, jedoch dürfte der verminderte Natrium-Gradient über der Plasmamembran zusammen mit der gleichzeitigen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  zur Verlangsamung des Natrium-Calcium-Austauschers und damit zum Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beigetragen haben.

Weiterhin könnte die verringerte  $[Na^+]_o$  zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), darüber zu einer Erhöhung der  $IP_3$ -Konzentration und dadurch zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern geführt haben, wie es für glatte Muskelzellen gezeigt werden konnte (Somlyo und Himpens, 1989 nach Smith *et al.*, 1989).

#### 4.4. Effekt von ANG II auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration

Wie in Kapitel 3.3 (S. 77) beschrieben, führte die Gabe von ANG II zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte, der ab einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M ANG II deutlich in zwei Phasen gegliedert war (s. Abb. 3.11A und B).

Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.3.2., S. 21), führt die Bindung von ANG II an seinen Rezeptor erstens zur Bildung von  $IP_3$  und darüber zu einer transienten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Peak-Phase) und zweitens zum Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum (Plateau-Phase). Auf welchem Weg Calcium aus dem Extrazellulärraum über die Plasmamembran gelangt ist umstritten. Kurtz und Penner (1989) diskutieren eine unspezifische Kationenleitfähigkeit, wohingegen andere wie z.B. Kornfeld *et al.* (1997) spannungsaktivierte Calcium-Kanäle favorisieren. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein von spannungsaktivierten L-Typ Calcium-Kanälen, da die durch Erhöhung der  $[K^+]_o$  ausgelöste Depolarisation zu einem Calcium-Einstrom im Bereich der reninsezernierenden Zellen führte, der Isradipin-sensitiv war (vgl. Kapitel 3.2.3., S. 74). Eine mögliche Signalkette könnte also ausgehend von der Bindung von ANG II an seinen Rezeptor (Kapitel 1.3.2., S. 21) über die dadurch ausgelöste Inhibition der  $K_{ir}$ -Kanäle sowie über die Aktivierung der Calcium-abhängigen Chlorid-Kanäle zur Depolarisation der Plasmamembran geführt haben. Diese Depolarisation könnte nachfolgend zur Öffnung der L-Typ Calcium-Kanäle, zum Calcium-Einstrom und schließlich zum beobachteten Calcium-Anstieg geführt haben. Diese Hypothese könnte durch ANG II Experimente in Gegenwart von Isradipin überprüft werden, jedoch wurden solche Untersuchungen noch nicht durchgeführt. Wahrscheinlicher ist aber, dass das Entleeren der intrazellulären  $IP_3$ -sensitiven Calcium-Speicher zu einem Calcium-Einstrom über CRAC-Kanäle führt, ein Mechanismus der auch in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole nachgewiesen werden konnte (Fellner und Arendshorst, 1999; s.a. Kapitel 1.3.2., S. 22).

Warum die beobachtete Gliederung des Calcium-Anstiegs in Peak- und Plateau-Phase erst ab einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M ANG II zu sehen war, läßt sich nicht genau klären. Am wahrscheinlichsten ist, daß die Peak-Phase erst eine gewisse Größe erreichen mußte, bevor sie detektiert werden konnte und eine Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M ANG II nur in manchen Fällen ausreichte, um diese Nachweisgrenze zu überschreiten.

Die in dieser Arbeit für den Gesamteffekt (Integral von  $t_0$  bis  $t_8$ ) ermittelte  $EC_{50}$  von 11 nM, steht in Einklang mit Werten aus der Literatur. So findet man Werte von 3 nM gemessen in Ratten-Podocyten (Henger *et al.*, 1997), 18 nM gemessen in Myocyten aus der Pfortader

der Ratte (Morel *et al.*, 1996) und 20 nM gemessen in humanen Fibroblasten (Ceolotto *et al.*, 1998).

#### **4.5. Effekte des $K_{ATP}$ -Kanalöffners Levromakalim und des $K_{ATP}$ -Kanalblockers Glibenclamid auf das Membranpotential und die intrazelluläre Calcium-Konzentration**

##### ***4.5.1. Effekt auf das Membranpotential***

Der Grund für diese Untersuchung war die Beobachtung, dass Gabe des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners Cromakalim zur Vasorelaxation führt und dieser Prozess von einer Hyperpolarisation der Plasmamembran der glatten Muskelzellen begleitet wird (Ferrier *et al.*, 1989 nach Hamilton *et al.*, 1986). Da reninsezernierende Zellen metaplastisch umgewandelte glatte Muskelzellen sind (Kapitel 1.2, S.8) und Cromakalim die Reninsekretion von isolierten reninsezernierenden Zellen stimuliert (Kapitel 1.3.1., S.15), wurde die Hypothese aufgestellt, dass reninsezernierende Zellen  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzen und die Hyperpolarisation infolge der Öffnung dieser Kanäle die Reninsekretion senkt (Ferrier *et al.*, 1989). Der Mechanismus, über den die  $K_{ATP}$ -Kanalöffnung die Reninsekretion erhöhte blieb jedoch unklar, so daß als mögliche Ursache neben der Hyperpolarisation per se auch ein dadurch ausgelöster Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  in Frage kommen könnte.

Der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner LCRK bewirkte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in DiBAC<sub>4</sub>(3)-beladenen reninsezernierenden Zellen um  $4.3 \pm 2.3$  % (0.3  $\mu$ M LCRK) bzw.  $3.6 \pm 1.1$  % (1  $\mu$ M LCRK), was Potentialänderungen um  $18 \pm 10$  mV (0.3  $\mu$ M) bzw.  $15 \pm 5$  mV (1  $\mu$ M) entsprach (S. 82, Abb. 3.14A). Der  $K_{ATP}$ -Kanalblocker GBC (1  $\mu$ M) hingegen bewirkte während der durch LCRK hervorgerufenen Hyperpolarisation eine Repolarisation der Membran zurück zum Ausgangspotential (S. 82, Abb. 3.14B), wohingegen Gabe von GBC (1  $\mu$ M) alleine oder gleichzeitig mit LCRK keinen Effekt auf die DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzintensität und damit auf das Membranpotential der Zellen hatte (S. 83, Abb. 3.14C).

Die hier beobachteten Effekte des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK und des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers GBC decken sich mit einer Vielzahl von Untersuchungen am gleichen und weiteren Präparaten (s. Kapitel 1.3.1., Abschnitt Membranpotential). Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf das Vorhandensein von  $K_{ATP}$ -Kanälen in reninsezernierenden Zellen hin

(s.a. Russ *et al.*, 1999), was durch weitere Befunde unterstützt wird. Erstens sind  $K_{ATP}$ -Kanäle in glatten Muskelzellen nachgewiesen worden (Übersicht in: Ashcroft und Ashcroft, 1990; Nelson und Quayle, 1995; Quast, 1996), und reninsezernierende Zellen in der afferenten Arteriole sind metaplastisch veränderte glatte Muskelzellen (Hackenthal *et al.*, 1990), zweitens beeinflussen  $K_{ATP}$ -Kanalöffner und -blocker die Reninsekretion in reninsezernierenden Zellen in Primärkultur, in isolierten afferenten Arteriolen sowie in isolierten perfundierten Nieren der Ratte (Ferrier *et al.*, 1989; Vallon *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1998) und drittens wurden in dem hier verwendeten Präparat hoch affine Bindungsstellen für den  $K_{ATP}$ -Kanalöffner P1075 nachgewiesen (Metzger und Quast, 1996).

#### 4.5.2. Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$

##### a) Effekt von LCRK auf $[Ca^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen

Der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner LCRK hatte keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen der Ratte unter Ruhebedingungen. Durch Untersuchungen an frisch dissoziierten Endothelzellen aus Kaninchenarterien kamen Katnik und Adams (1995) zu einem vergleichbaren Ergebnis. Sie fanden, dass 25  $\mu$ M LCRK keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen hatten (Katnik und Adams, 1995). Im Gegensatz dazu beobachteten Ito *et al.* (1991) sowie Itoh *et al.* (1992), daß Gabe der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Pinacidil und LCRK die  $[Ca^{2+}]_i$  glatter Muskelzellen der Mesenterialarterie des Kaninchens unter Ruhebedingungen reduzierte (vgl. Kapitel 1.3.1., S. 11).

##### b) Effekt von LCRK auf $[Ca^{2+}]_i$ während Stimulation

#### ANG II

In der hier durchgeführten Arbeit konnte kein Effekt von LCRK auf den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe des kontraktiven Agonisten ANG II gezeigt werden. Bezüglich des Effektes der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner auf den durch Agonisten induzierten Calcium-Anstieg gibt es widersprüchliche Aussagen. Bestätigt werden die hier gewonnenen Ergebnisse durch Untersuchungen an Koronararterien des Kaninchens und des Schweins, wo Cromakalim und Ki 4032 den durch 30 mM KCl hervorgerufenen Calcium-Anstieg nur z.T. inhibieren konnten

sowie durch Untersuchungen an der Mesenterialarterie der Ratte, wo Pinacidil den durch 128 mM  $[K^+]_o$  hervorgerufenen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht inhibieren konnte (Itoh *et al.*, 1992). Desweiteren gibt es Untersuchungen an der Rattenaorta und der Femoralarterie des Kaninchens, wo Cromakalim den Noradrenalin-induzierten Calcium-Anstieg nicht inhibieren konnte (Karaki *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse, die an der Aorta (Karaki *et al.*, 1997) sowie der Mesenterialarterie der Ratte (Itoh *et al.*, 1992) gewonnen wurden. In diesen Experimenten konnte der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Nicorandil den durch ANG II (Karaki *et al.*, 1997) bzw. konnte der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Pinacidil den durch Noradrenalin (Itoh *et al.*, 1992) hervorgerufenen Calcium-Anstieg vollständig inhibieren.

#### Erhöhte $[Ca^{2+}]_o$

Nachfolgend wurde durch Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 mM auf 5 bzw. 20 mM der Calcium-Gradient über der Plasmamembran erhöht, wodurch die Triebkraft für einen Calcium-Einstrom bei der LCRK-induzierten Hyperpolarisation der Plasmamembran ansteigt. Auf welchen Wegen es zu dem beobachteten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  kommen kann (spannungsunabhängige Calcium-Kanäle, Verlangsamung des Natrium-Calcium-Austauschers, Aktivierung der PLC) wurde bereits in Kapitel 4.3.2 (S. 100) diskutiert. Warum trotz eines steileren Calcium-Gradienten bei Gabe von LCRK kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zu sehen war, liegt möglicherweise an Prozessen, die auch in Kapitel 4.3.2 schon genannt wurden. Zum einen ist dies eine mögliche Aufnahme von Calcium in Mitochondrien, zum zweiten die Stimulation von Calcium-ATPasen bei steigender Calcium-Konzentration (evtl. über Calmodulin) und zum dritten eine geringere Permeabilität bei steigender  $[Ca^{2+}]_i$  (Calcium-abhängige Calcium-Kanäle) (Taniguchi *et al.*, 1989). Alle diese Prozesse könnten einem bei Hyperpolarisation möglicherweise erfolgenden Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  entgegenwirken haben, so daß kein Nettoeffekt zu sehen war. An dieser Stelle muß auch erwähnt werden, daß der durch Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  induzierte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  möglicherweise zur Inaktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle geführt haben könnte. Sowohl Hehl *et al.* (1994) als auch Hussain und Wareham (1994) konnten an inside-out patches von Skelettmuskelfasern der Maus zeigen, daß Calcium-Konzentrationen zwischen 0.1 und 2 mM an der zytoplasmatischen Seite des patches zur Inaktivierung der in der Membran befindlichen  $K_{ATP}$ -Kanäle führte. Daraus folgt, daß die Gabe von LCRK vor der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  erfolgen müßte, da die Plasmamembran dann bereits hyperpolarisiert wäre und man möglicherweise wenigstens kurzzeitig einen Calcium-Anstieg sehen könnte.

Ein weiterer Mechanismus, welcher die durch LCRK hervorgerufene Hyperpolarisation schwächen und damit auch einem verstärkten Calcium-Einstrom entgegenwirken könnte, ist die Aktivierung von Calcium-abhängigen Chlorid-Kanälen, die in glatten Muskelzellen und einer Vielzahl weiterer Zelltypen bereits nachgewiesen wurden (Übersicht in Large und Wang, 1996). Auch in reninsezernierenden Zellen konnte in patch clamp Experimenten von Kurtz und Penner (1989) diese Kanäle nachgewiesen werden, da ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zu einem gleichzeitigen Chlorid-Ausstrom führte. Der beobachtete Ausstrom von Chlorid entlang seines elektrochemischen Gradienten beruht auf dem in Bezug zum Membranpotential relativ positiv liegenden Gleichgewichtspotential von Chlorid ( $E_{Cl}$ ), welches in glatten Muskelzellen zwischen -30 und -6 mV beträgt (Large und Wang, 1996 nach Aickin, 1990). Da das Membranpotential reninsezernierender Zellen bei  $-61 \pm 1$  mV liegt (Russ *et al.*, 1999) käme es, bei einem dem  $E_{Cl}$  in glatten Muskelzellen vergleichbaren Wert, zu einem Chlorid-Ausstrom und dadurch zu einer Depolarisation der Plasmamembran, welcher der durch LCRK hervorgerufenen Hyperpolarisation entgegenwirken würde. Daneben wurde aber für glatte Muskelzellen aus der Pfortader der Ratte berichtet, daß zur Aktivierung des  $I_{Cl(Ca)}$  mindestens eine  $[Ca^{2+}]_i$  von  $\sim 180$  nM vorliegen muß und die halbmaximale Aktivierung erst bei einer  $[Ca^{2+}]_i$  von  $\sim 365$  nM zu beobachten ist (Large und Wang, 1996 nach Pacaud *et al.*, 1992). Für Zellen aus der Tränendrüse der Ratte wird für die Aktivierung des  $I_{Cl(Ca)}$  sogar ein Schwellenwert im mikromolaren Bereich angegeben (Marty *et al.*, 1984). Da die  $[Ca^{2+}]_i$  bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  in den hier durchgeführten Experimenten nur Werte von maximal 190 nM erreichte (Kapitel 3.4.2.b, Tab. 3.12., S. 86) ist es somit fraglich, ob die Aktivierung dieser Kanäle hier eine Rolle gespielt hat.

#### Erhöhte $[K^+]_o$ und $[Ca^{2+}]_o$

Bei diesen Untersuchungen sollte der Effekt des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK auf einen Kalium-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Kapitel 3.2.1, S. 69 und Kapitel 4.3.1, S. 97) untersucht werden. Wie schon beschrieben, liegt das Ruhemembranpotential der reninsezernierenden Zellen bei  $-61 \pm 1$  mV (Russ *et al.*, 1999; Kapitel 1.3.1., S. 11) und das mit der Nernst-Gleichung berechnete Kalium-Gleichgewichtspotential bei -105 mV (Kapitel 2.2.3.b, S. 51), so daß die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu einem Ausstrom von Kalium und dadurch zu einer Hyperpolarisation führt. In diesen Experimenten musste darauf geachtet werden, dass die Erhöhung der  $[K^+]_o$  relativ klein blieb, so dass die Zellen nicht zu stark depolarisierten, da mit zunehmender Depolarisation die Differenz zwischen Membranpotential und Kalium-Gleichgewichtspotential und damit die treibende Kraft für einen Kalium-Ausstrom immer

geringer wird. Aus diesem Grund wurde die  $[K^+]_o$  nur auf 20 mM erhöht, da unter diesen Bedingungen das Kalium-Gleichgewichtspotential noch negativer (-52 mV, berechnet nach der Nernst-Gleichung) als das Membranpotential (ca. -41 mV nach Haeusler, 1983 sowie nach Korbmacher *et al.*, 1989) ist, so dass die Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanäle noch zu einem Kalium-Ausstrom und damit zu einer Hyperpolarisation führt. Da die durch Depolarisation mit 20 mM  $[K^+]_o$  induzierte Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  verhältnismäßig klein ist, wurde zusätzlich die  $[Ca^{2+}]_o$  von 1 mM auf 5 mM erhöht, um einen potentiellen Calcium-Einstrom zu verstärken (S. 88, Abb. 3.19). Auch unter diesen Voraussetzungen konnte bei Gabe von LCRK keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Durch Depolarisation mit 20 mM  $[K^+]_o$  erreicht das Membranpotential der Zellen einen Wert, der die Offenwahrscheinlichkeit spannungsaktivierter Calcium-Kanäle erhöht und dadurch einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  um ca. 18 nM herbeiführt (S. 69, Tab. 3.2). Gabe von LCRK führt zu einer Hyperpolarisation der Zellen welche zum Schließen der spannungsaktivierten Calcium-Kanäle führt und dadurch diesen Calcium-Einstrom inhibiert. Gleichzeitig erfolgt aber höchstwahrscheinlich ein Einstrom über spannungsunabhängige Calcium-Kanäle (Kapitel 4.5.2, S. 105), der durch die Hyperpolarisation angetrieben wird. Zusätzlich spielen hier Prozesse wie Calcium-ATPasen eine Rolle, die bereits beschrieben wurden (Kapitel 4.5.2, S. 105). Auch in diesen Experimenten könnten also gegenläufige Prozesse dazu geführt haben, daß als Nettoeffekt keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  festzustellen war.

Warum bei Gabe des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK in keinem Fall ein Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen hatte, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen scheinen präparatspezifische Unterschiede der Wirkung der einzelnen Substanzen eine Rolle zu spielen, da sowohl unter Ruhebedingungen als auch bei Stimulation mit Agonisten in der Literatur sehr widersprüchliche Ergebnisse zu finden sind (Kapitel 4.5.2, S. 105). Zum anderen könnten zelluläre Prozesse eine Rolle gespielt haben, die die Detektion eines Effektes verhinderten. Die in der Einleitung (Kapitel 1.3.1., S. 17) geäußerte Hypothese, daß es bei der durch die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner verursachten Hyperpolarisation zu einer Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$  und darüber zu einer Stimulation der Reninsekretion kommen könnte, ist auf den ersten Blick zwar hinfällig, jedoch könnte es auch nur zu lokalen submembranären Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  kommen, die mit der hier verwendeten Methode nicht nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang wäre eine Lokalisation der Kanäle auf zellulärem Niveau von Interesse, da man dann zwischen einer möglichen lokalen Häufung oder einer gleichmäßigen Verteilung über die gesamte Zelloberfläche unterscheiden könnte.

#### 4.6. Untersuchung der Exo- und Endozytose mit FM 1-43

In dieser Arbeit wurde versucht die Reninsekretion aus reninsezernierenden Zellen der Ratte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FM 1-43 nachzuweisen. Dabei wurden vier Versuchsserien durchgeführt und immer zwischen der Färbung vor und nach Stimulation der Reninsekretion verglichen. Von welchen Faktoren die Reninsekretion abhängig ist und wie die hier verwendeten Substanzen diese inhibieren bzw. stimulieren wurde in Kapitel 1 bereits beschrieben.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode zum Nachweis exo- und endozytotischer Prozesse konnte in keinem Fall ein positives Ergebnis erbracht werden (s. Kapitel 3.5). Hauptsächlich lag dies an der Art der Substanzapplikation (Mikroliterspritze), die in 71 % (85 von 120 Experimente) aufgrund eines durch Erschütterungen bedingten Positionswechsels der Glomerula einen Vergleich überhaupt nicht zuließ (s. Kapitel 3.5). Selbst wenn die Substanzen über die Superfusion zu applizieren gewesen wären, hätten die durch den Badfluß ausgelösten Erschütterungen eine Aufnahme mit dem LSM unmöglich gemacht. Bewegungsartefakte könnten auch bei Gabe von 100 mM Sucrose-Puffer,  $1 \cdot 10^{-6}$  bzw.  $1 \cdot 10^{-7}$  M ANG II eine Rolle gespielt haben. Gabe von 90 mM Sucrose führte zur Kontraktion mikrodissozierter renaler Arteriolen und Arterien der Ratte (Jensen und Skott, 1993) und bereits 0.1 nM ANG II führte zur Kontraktion der afferenten Arteriole in Ratten (Carmines und Navar, 1989).

Warum bei den Experimenten, bei denen ein Vergleich möglich war trotzdem kein positives Ergebnis erlangt wurde, könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen war aufgrund des ständig anwesenden Farbstoffes der Vergleich zwischen den Färbungen vor und nach Stimulation sehr schwer, weswegen versucht wurde überschüssigen Farbstoff auszuwaschen. Aus dem gleichen Grund wurde in drei weiteren Experimenten durch erneute Stimulation in Abwesenheit von FM 1-43 versucht, eine Abnahme der Farbtintensität zu sehen (s. Kapitel 3.5). Bei zuvor erfolgter Endozytose farbstoffgefüllter Vesikel wäre dies ein Zeichen für die erneute Exozytose dieser Vesikel, eine Technik, die sich Betz und Bewick (1992) zunutze machten, um das Vesikel-Recycling an neuromuskulären Synapsen des Frosches *Rana pipiens* mit dem Farbstoff FM 1-43 zu untersuchen. In allen diesen Experimenten konnte zwar die Intensität der Färbung reduziert werden, jedoch war keine intrazelluläre Färbung zu sehen.

Der wahrscheinlichste Grund ist aber die geringe Menge an exozytierten Granula. Laut Skott erfolgt die Reninfreisetzung durch Exozytose (Skott, 1988) und läuft in Form von Episoden ab, wobei bei jeder Episode ein Granulum sezerniert wird (Skott, 1986). Messungen



an isolierten afferenten Arteriolen der Ratte ergaben, daß die basale Reninsekretion mit einer Frequenz von ungefähr einem freigesetzten Granulum pro 5 min pro Arteriole erfolgt (Skott, 1986 und 1988), was ein relativ seltenes Ereignis ist und den Nachweis zusätzlich erschwert. Laut Skott *et al.* (1986) beträgt die Anzahl der reninsezernierenden Zellen pro Arteriole zwischen 5 und 20, so daß eine einzelne reninsezernierende Zelle pro 5 Minuten zwischen 1/20 und 1/5 Granula sezerniert. Pro Minute liegen die Werte nur noch zwischen 1/100 und 1/25 Granulum, so daß die Wahrscheinlichkeit, daß eine einzelne reninsezernierende Zelle pro Minute ein Granulum sezerniert zwischen  $10^{-2}$  und  $4 \cdot 10^{-2}$  liegt.

Sosath (1999) konnte an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte durch verschiedene Protokolle ( $10^{-5}$  M Forskolin +  $10^{-4}$  M IBMX,  $10^{-5}$  M Forskolin +  $10^{-4}$  M IBMX in Calcium-freiem Puffer, Reduktion der  $[Ca^{2+}]_o$  von 2 auf 0 mM) die Reninsekretion um bis zu 230 % steigern. Überträgt man diese Werte auf die Angaben von Skott (1986 und 1988), so kommt man während der Stimulation auf eine Frequenz von 2.5 Granula pro 5 min pro Arteriole. Inhibition mit  $1 \cdot 10^{-7}$  M ANG II inhibierte die Reninsekretion isolierter reninsezernierender Zellen der Ratte um ca. 40 % (Sosath, 1999), was einer Frequenz von 0.6 freigesetzten Granula pro 5 min pro Arteriole (1 Granulum pro 8.3 min pro Arteriole) entsprechen würde. Betrachtet man sich die zweite in dieser Arbeit durchgeführte Versuchsserie, in der die Reninsekretion zunächst mit  $1 \cdot 10^{-6}$  M ANG II inhibiert wurde und anschließend mit 10  $\mu$ M Forskolin + 100  $\mu$ M IBMX stimuliert wurde, so ergibt sich nach Sosath zwar eine Steigerung der Reninsekretion um ungefähr das 4 fache, jedoch entspricht dies auf der Ebene der einzelnen Arteriole nur einer zusätzlichen Freisetzung von etwa 2 Granula pro 5 min. Daraus wird auch deutlich, dass selbst bei einer Stimulationszeit von 15 min die Wahrscheinlichkeit, ein solches Ereignis zu beobachten, sehr gering ist. Die geringe Frequenz dieses Ereignisses wird auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Nierenschnitten der Maus bestätigt, bei denen nur in wenigen Fällen der Nachweis der Exozytose möglich war (Ogawa *et al.*, 1995). Selbst wenn für jedes exozytierte Granulum die entsprechende Membranfläche sofort wieder endozytiert würde, dürfte dies für die hier verwendete Methode wohl an der Grenze der Nachweisbarkeit liegen.

Dazu kommt noch die Schwierigkeit der Detektion, die durch die Komplexität des Präparates bedingt ist. Da sich der Farbstoff in alle Plasmamembranen einlagert, fällt es trotz Verwendung eines konfokalen Mikroskops zuweilen sehr schwer die genauen Zellgrenzen zu sehen. Zusätzliche Färbung der Gefäße mit dem Nukleinsäurefarbstoff SYTO<sup>®</sup>59 verbesserte zwar die Detektion der einzelnen Zellen, jedoch nicht den Vergleich hinsichtlich der Färbung mit FM 1-43.

Die Tatsache, dass mit dieser Methode kein Nachweis der Reninsekretion zu erbringen war, dürfte wohl hauptsächlich in methodischen Problemen begründet sein. Würde an Stelle der Glomeruli mit anhängender afferenter Arteriole isolierte reninsezernierende Zellen verwendet, so brächte dies folgende Vorteile mit sich:

- Es gäbe kaum Artefakte durch Erschütterung, da einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe besser auf einem Objektträger haften als ein relativ großer Glomerulus, der zudem dem Flüssigkeitsstrom wesentlich mehr Widerstand bietet und deshalb auch leichter verschoben wird.
- Artefakte durch Gefäßkontraktion sind auszuschließen.
- Die Detektion der einzelnen Zellen würde keine Schwierigkeiten bereiten, da nur isolierte Zellen vorliegen würden.
- Es wäre leichter eine intrazelluläre Färbung zu detektieren, da kein komplexes dreidimensionales Gewebe vorliegt.
- Man hätte eine viel größere Anzahl von Objekten zu Verfügung, deren Färbung sich vor und nach Stimulation relativ schnell vergleichen ließe. Außerdem könnte man die Sekretion mit einer höheren Wahrscheinlichkeit beobachten, was im folgenden erläutert werden soll. Bei der Isolierung der Zellen aus Nierengewebe kann man laut Vallon *et al.* (1998) die Zellsuspension so weit aufreinigen, daß letztlich 80 - 90 % der erhaltenen Zellen reninsezernierende Zellen sind. Überträgt man diesen Wert auf die Anzahl der isolierten Zellen pro Objektträger (ca. 4500, s. Kapitel 2.2.2), so beträgt die Zahl der reninsezernierenden Zellen zwischen 3600 und 4050. Berücksichtigt man die oben angegebene Wahrscheinlichkeit, mit der eine einzelne Zelle ein Granulum pro Minute sezerniert ( $10^{-2}$  bis  $4 \cdot 10^{-2}$ ), so ergeben sich zwischen 40 und 160 Ereignisse (= Sekretion eines Granulus) pro Minute als basaler Wert. Betrachtet man sich erneut die zweite hier durchgeführte Versuchsserie, in der die Reninsekretion zunächst mit  $1 \cdot 10^{-6}$  M ANG II inhibiert und anschließend mit 10  $\mu$ M Forskolin + 100  $\mu$ M IBMX stimuliert wurde, so ergibt sich nach Sosath eine Steigerung der Reninsekretion von 60 % auf 230 % des basalen Wertes (s.o.). Bezogen auf die Anzahl der möglichen Ereignisse, könnte man unter Inhibition zwischen 24 und 160, unter Stimulation aber zwischen 96 und 384 Ereignisse pro Minute beobachten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Funktion eines Organismus ist die Konstanthaltung seines inneren Milieus (= Wasser und Elektrolythaushalt) von entscheidender Bedeutung. Gelingt es ihm nicht, den Verlust lebensnotwendiger Substanzen auszugleichen, ist er auf Dauer nicht lebensfähig. Beim Menschen wird diese Funktion von den Nieren übernommen, die dadurch auf eine Vielzahl von weiteren Funktionen wie z.B. den Blutdruck wesentlichen Einfluß nehmen. Ein wichtiges Steuerelement bei dieser Regulation ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Aktivität des RAAS wird in erster Linie durch die Sekretionsrate der Aspartyl-Protease Renin moduliert, so dass alle Faktoren, die die Reninsekretion beeinflussen gleichzeitig den Blutdruck und das Wasser- und Elektrolytgleichgewicht des ganzen Organismus beeinflussen. Renin wird in metaplastisch umgewandelten glatten Muskelzellen gebildet, die in der Media der afferenten Arteriole lokalisiert sind. Die Anzahl dieser Zellen ist variabel und hängt z.B. von der Menge an Kochsalz ab, die über die Nahrung aufgenommen wird. Die Reninsekretion wird hauptsächlich durch das Nervensystem, den Barorezeptor-Mechanismus sowie den Macula Densa-Mechanismus reguliert. Unter all den Faktoren und Mediatoren, über die diese Mechanismen auf die Reninsekretion Einfluß nehmen, spielt das Calcium eine besondere Rolle. Ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den reninsezernierenden Zellen führt im Gegensatz zu den meisten anderen sekretorischen Prozessen zu einem Abfall der Reninsekretion und umgekehrt (Calcium-Paradox). Um mehr über die nur unzureichend bekannten zellulären Regulationsmechanismen der reninsezernierenden Zellen zu erfahren, wurde die Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$  sowie der Sekretion von verschiedenen Stimuli untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde mittels eines Kaninchen-Anti-Rattenrenin-Antikörpers die Lokalisation der reninsezernierenden Zellen in Kryoschnitten aus Nieren normal sowie kochsalzarm ernährter Tiere durchgeführt und diese Daten miteinander verglichen. Die Zellen waren in der Media der afferenten Arteriole lokalisiert, wobei die Anzahl der reninpositiven Arteriolen und die Anzahl der reninpositiven Zellen pro Arteriole in kochsalzarm ernährten Tieren signifikant größer war als in normal ernährten Tieren. Weiterhin war es erstmals möglich in isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte mit Hilfe einer Antikörperfärbung und unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops Reningranula darzustellen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 die  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen sowie die Regulation der Calcium-Homöostase untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine Erhöhung der  $[K^+]_o$  zur Membrandepolarisation und zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den untersuchten Zellen führte, der von der Anwesenheit von  $[Ca^{2+}]_o$  abhängig war. Dieser Anstieg war durch Gabe des L-Typ Calcium-Kanalblockers Isradipin inhibierbar, was ein eindeutiger Beleg für die Anwesenheit spannungsaktivierter Calcium-Kanäle ist. Weiterhin war die  $[Ca^{2+}]_i$  auch durch Änderungen der  $[Ca^{2+}]_o$  stark zu beeinflussen, was auf eine hohe Calcium-Permeabilität der Plasmamembran der Zellen und damit auf weitere Calcium-Wege (spannungsunabhängige Calcium-Kanäle, Natrium-Calcium-Austauscher) über die Membran hindeutet. Auch an dieser Stelle muß wieder auf die Tatsache hingewiesen werden, daß die reninsezernierenden Zellen durch gap junctions an die glatten Muskelzellen sowie die EGM gekoppelt sind und es deshalb nicht möglich ist, eine Aussage über den Kanalbesatz der reninsezernierenden Zellen zu machen.

Gabe des Vasokonstriktors ANG II führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in reninsezernierenden Zellen, der ab einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M ANG II in eine Peak- und eine Plateau-Phase gegliedert war. Die in dieser Arbeit ermittelte  $EC_{50}$  von 11 nM steht in Einklang mit Werten aus der Literatur, die zwischen 3 (Ratten-Podozyten) und 20 nM (Myozyten aus der Pfortader der Ratte) liegen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde untersucht, ob reninsezernierende Zellen über  $K_{ATP}$ -Kanäle verfügen und ob die Aktivität dieser Kanäle Auswirkungen auf  $[Ca^{2+}]_i$  der Zellen hat. Es ist bekannt, daß  $K_{ATP}$ -Kanalöffner die Reninsekretion stimulieren (s. Kapitel 1.3, S.15), wogegen  $K_{ATP}$ -Kanalblocker diese inhibieren, weswegen angenommen wurde, daß dieser Effekt Calcium-abhängig ist. Mit Hilfe des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC<sub>4</sub>(3) konnte ein Effekt des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK und des  $K_{ATP}$ -Kanalblockers Glibenclamid auf das Membranpotential der reninsezernierenden Zellen festgestellt werden. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass diese Zellen über ATP-sensitive Kaliumkanäle verfügen. Gleichzeitig konnte jedoch kein Effekt des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners LCRK auf die  $[Ca^{2+}]_i$  festgestellt werden, weder unter Ruhebedingungen noch während Stimulation mit  $3 \cdot 10^{-9}$  M ANG II. Auch bei Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  auf 5 bzw. 20 mM oder bei gleichzeitiger Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_o$  auf 5 mM und der  $[K^+]_o$  auf 20 mM konnte kein Effekt festgestellt werden. Die Hypothese, daß die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner-abhängige Stimulation der Reninsekretion über einen Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgt, konnte aber nicht bestätigt werden. Es könnte jedoch auch zu

lokalen subzellulären Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  gekommen sein, die mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht detektiert werden konnten.

Im letzten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe des Exo-, Endozytosemarkers FM 1-43 versucht, die Abhängigkeit der Reninsekretion von verschiedenen Stimuli darzustellen. Trotz verschiedener Versuchsanordnungen konnte kein Nachweis erbracht werden, was wahrscheinlich an der geringen Häufigkeit lag, mit der dieses Ereignis auf zellulärer Ebene stattfindet.

Die in dieser Arbeit an reninsezernierenden Zellen kochsalzarm ernährter Ratten gewonnenen Daten leisten einen Beitrag zur Charakterisierung der reninsezernierenden Zellen, insbesondere zur Aufklärung der vielfältigen Calcium-Regulationsmechanismen und damit der Reninsekretion selbst.

## 6. LITERATUR

- Agalakova, N. I., Lapin, A. V., Gusev, G. P.: Differential effects of glycolytic and oxidative metabolism blockers on the Na-K pump in erythrocytes of the frog, *Rana temporaria*. *J. Comp. Physiol.* 167: 576-581 (1997)
- Albinus, M., Finkbeiner, E., Sosath, B., Osswald, H.: Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 275: F991-F997 (1998)
- Ashcroft, S. J. H., Ashcroft, F. M.: Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell. Signal.* 2: 197-214 (1990)
- Beavo, J. A.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implication of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75: 725-748
- Beierwaltes, W. H., Schryner, S., Olson, P. S., Romero, J. C.: Control of renin release in isolated rat glomeruli. *Hypertension* 3: SII 30-SII 34 (1981)
- Betz, W. J., Bewick, G. S.: Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255: 200-203 (1992)
- Betz, W. J., Mao, F., Bewick, G. S.: Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 12: 363-375 (1992)
- Bray, K. M. und Quast, U.: A specific binding site for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J. Biol. Chem.* 267: 11689-11692 (1992)
- Bührle, C. P., Nobile, R., Mannek, E., Schneider, D., Hackenthal, E., Taugner, R.: The afferent glomerular arteriole. Immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: S383-S393 (1984)
- Bührle, C. P., Nobile, R., Taugner, R.: Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am. J. Physiol.* 249: F272-F281 (1985)
- Bührle, C. P., Scholz, H., Hackenthal, E., Nobile, R., Taugner, R.: Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45: 37-47 (1986)
- Bräuner, T., Hülser, D. F., Strasser, R. J.: Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim. Biophys. Acta* 771: 208-216 (1984)
- Cantin, M., Araujo-Nascimento, M.-de-F., Desormeaux, Y.: Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. *Am. J. Pathol.* 87: 581-602 (1977)

- Carmines, P. K., Navar, G. : Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Am. J. Physiol.* 256: F1015-F1020 (1989)
- Carmines, P. K., Fowler, B. C., Bell, D. P. : Segmentally distinct effects of depolarization on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in renal arterioles. *Am. J. Physiol.* 265: F677-F685 (1993)
- Casteels, R., Droogmans, G.: Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells in the rabbit ear artery. *J. Physiol.* 317: 263-279 (1981)
- Catterall, W. A., Striessnig, J.: Receptor sites for  $Ca^{2+}$  channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 13 : 256-262 (1992)
- Ceolotto, G., Pessina, A. C., Iori, E., Monari, A., Trevisan, R., Winkleswski, P., Semplicini, A.: Modulatory effect of insulin on release of calcium from human fibroblasts by angiotensin II. *J. Hypertens.* 16: 487-493 (1998)
- Churchill, P. C.: Second messengers in renin secretion. *Am. J. Physiol.* 249: F175-F184 (1985)
- Churchill, P.C.: First and second messengers in renin secretion. In: Laragh, J. H., Brenner, B. M. (eds): *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management.* Raven Press, New York: 1233-1246 (1990)
- Churchill, P.C.: First and second messengers in renin secretion. In: Laragh, J. H., Brenner, B. M. (eds): *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management.* Second edition. Raven Press, New York: 1869-1885 (1995)
- D'andrea, P., Calabrese, A., Grandolfo, M.: Intercellular calcium signalling between chondrocytes and synovial cells in co-culture. *Biochem. J.* 329: 681-687 (1998)
- Della Bruna, R., Pinet, F., Corvol, P., Kurtz, A.: Regulation of renin secretion and synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 1: 98-110 (1991)
- Della Bruna, R., Pinet, F., Corvol, P., Kurtz, A.: Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 47: 1266-1273 (1995)
- Domenighetti, A. A., Bény, J. L., Chabaud, F., Frieden, M.: An intercellular regenerative calcium wave in porcine coronary artery endothelial cells in primary culture. *J. Physiol.* 513: 103-116 (1998)
- Dousa, T. P.: Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55: 29-62 (1999)

- Dudel, J.: Grundlagen der Zellphysiologie. In: Schmidt, R. F., Thews, G. (eds): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1995)
- Epps, D. E., Wolfe, M. L., Groppi, V.: Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye *bis*-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac<sub>4</sub>(3)) in model systems and cells. *Chem. Phys. Lipids* 69: 137-150 (1994)
- Fellner, S. K., Arendshorst, W. J.: Capacitative calcium entry in smooth muscle cells from preglomerular vessels. *Am. J. Physiol.* 277: F533-F542 (1999)
- Ferrier, C. P., Kurtz, A., Lehner, P., Shaw, S. G., Pusterla, C., Saxenhofer, H., Weidmann, P.: Stimulation of renin secretion by potassium-channel activation with cromakalim. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36 : 443-447 (1989)
- Fierro, L., DiPolo, R., Llano, I.: Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J. Physiol.* 510: 499-512 (1998)
- Fishman, M. C.; Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* 260: 542-544 (1976)
- Fluorescence Masters Series, User's Manual: RatioMaster und Quantamaster Hardware und FeliX Software, Photon Technology International, Inc. (1995)
- Fowler, B. C., Carmines, P.K., Nelson, L. D., Bell, P. D. : Characterization of sodium-calcium exchange in rabbit renal arterioles. *Kidney Int.* 50: 1856-1862 (1996)
- Frederiksen, O., Leyssac, P. P., Skinner, S. L.: Sensitive osmometer function of juxtaglomerular cells in vitro. *J. Physiol.* 252: 669-679 (1975)
- Friis, U., Jensen, B. L., Aas, J. K., Skøtt, O.: Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ. Res.* 84: 929-936 (1999)
- Fujita-Yoshigaki, J.: Divergence and convergence in regulated exocytosis: the characteristics of cAMP-dependent enzyme secretion of parotid salivary acinar cells. *Cell. Signal.* 10: 371-375 (1998)
- Gambaryan, S., Wagner, C., Smolenski, A., Walter, U., Poller, W., Haase, W., Kurtz, A., Lohmann, S. M.: Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9003-9008 (1998)
- Gattone II, V. H., Luft, F. C., Evan, A. P.: Renal afferent and efferent arterioles of the rabbit. *Am. J. Physiol.* 247: F219-F228 (1984)



- Ginesi, L. M., Munday, K. A., Noble, A. R.: Secretion control for active and inactive renin: effects of calcium and potassium on rabbit kidney cortex slices. *J. Physiol.* 344: 453-463 (1983)
- González, E., Salomonsson, M., Kornfeld, M., Gutiérrez, A. M., Morsing, P., Persson, A. E. G.: Different action of angiotensin II and noradrenalin on cytosolic calcium concentration in isolated and perfused afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 145: 299-300 (1992)
- Gopalakrishnan, M., Whiteaker, K. L., Molinari, E. J., Davis-Traber, R., Scott, V. E. S., Shieh, C.-C., Buckner, S. A., Milicic, I., Cain, J. C., Postl, S., Sullivan, J. P., Brioni, J. D.: Characterization of the ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) expressed in guinea pig bladder smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 551-558 (1999)
- Greger, R.: Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol. Rev.* 65: 760-797 (1985)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.: A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450 (1985)
- Hackenthal, E., Metz, R., Bührle, C. P., Taugner, R.: Intrarenal and intracellular distribution of renin and angiotensin. *Kidney Int.* 34: S4-S17 (1987)
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., Taugner, R.: Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol. Rev.* 70: 1067-1116 (1990)
- Hackenthal, E.: Antihypertensiva. In: Oberdisse, E., Hackenthal, E., Kuschinsky. (eds): *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997)
- Haeusler, G.: Contraction, membrane potential, and calcium fluxes in rabbit pulmonary arterial muscle. *FASEB* 42: 263-268 (1983)
- Hehl, S., Moser, C., Weik, R., Neumcke, B.: Internal  $Ca^{2+}$  ions inactivate and modify ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1190: 257-263 (1994)
- Henger, A., Huber, T., Fischer, K.-G., Nitschke, R., Mundel, P., Schollmeyer, P., Greger, R., Pavenstädt, H.: Angiotensin II increases the cytosolic calcium activity in rat podocytes in culture. *Kidney Int.* 52: 687-693 (1997)
- Holevinsky, K. O., Fan, Z., Makielski, J. C., Groppi, V., Nelson, D. J.: ATP-sensitive  $K^+$  channel opener acts as a potent  $Cl^-$  channel inhibitor in vascular smooth muscle cells. *J. Membrane Biol.* 137: 59-70 (1994)
- Hussain, M., Wareham, A. C.: Rundown and reactivation of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) in mouse skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 141: 257-265 (1994)

- Ito, S., Kajikuri, J., Itoh, T., Kuriyama, H.: Effects of lemakalim on changes in  $Ca^{2+}$  concentration and mechanical activity induced by noradrenaline in the rabbit mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 104: 227-233 (1991)
- Itoh, T., Seki, N., Suzuki, S., Ito, S., Kajikuri, J., Kuriyama, H.: Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J. Physiol.* 451: 307-328 (1992)
- Jensen, B. L., Skøtt, O.: Osmotically sensitive renin release from permeabilized juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 265: F87-F95 (1993)
- Jensen, B. L., Gambaryan, S., Scholz, H., Kurtz, A.:  $K_{ATP}$  channels are not essential for pressure-dependent control of renin secretion. *Pflügers Arch.* 435: 670-677 (1998)
- Jones-Dombi, T., Churchill, P.: The baroreceptor mechanism for controlling renin secretion: effect of calcium channel blockers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 274-278 (1993)
- Kakinuma, Y., Fogo, A., Inagami, T., Ichikawa, I.: Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int.* 43: 1229-1235 (1993)
- Kamishima, T., Davies, N. W., Standen, N. B.: Mechanisms that regulate  $[Ca^{2+}]_i$  following depolarization in rat systemic arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* 522: 285-295 (2000)
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K.-I., Harada, K.-I., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K.-J., Sato, K.: Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 49: 157-230 (1997)
- Katnik, C., Adams, D. J.: An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *J. Physiol.* 485: 595-606 (1995)
- Konda, R., Orisaka, S., Sakai, K., Ota, S., Kimura, N.: The distribution of renin containing cells in scarred kidneys. *J. Urol.* 156: 1450-1454 (1996)
- Korbmayer, C., Helbig, H., Stahl, F., Coroneo, M., Haller, H., Lindschau, C., Quass, P., Wiederholt, M.: Continuous membrane voltage recordings in A10 vascular smooth muscle cells: effect of AVP. *Am. J. Physiol.* 257: C323-C332 (1989)
- Kornfeld, M., Gutiérrez, A. M., Persson, A. E. G.: Angiotensin II induces a tachyphylactic calcium response in the rabbit afferent arteriole. *Acta Physiol. Scand.* 160: 165-173 (1997)
- Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Hutter, A., Bührle, C., Nobiling, R., Taugner, R., Hackenthal, E., Bauer, C.: Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J. Physiol.* 250: C563-C571 (1986)

- Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J., Bauer, C.: Role of cGMP as a second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33: 798-803 (1988)
- Kurtz, A.: Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113: 1-40 (1989)
- Kurtz, A., Penner, R.: Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3423-3427 (1989)
- Kurtz, A., Penner, R.: Effects of angiotensin II on intracellular calcium and electrical function of mouse renal juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 38: S51-S54 (1990)
- Kurtz, A., Skott, O., Chegini, S., Penner, R.: Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch.* 416: 281-287 (1990)
- Kurtz, A., Wagner, C.: Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 275: F849-F862 (1998)
- Kurtz, A., Götz, K.-H., Hamann, M., Kieninger, M., Wagner, C.: Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am. J. Physiol.* 274: F709-F712 (1998)
- Kurtz, A., Götz, K.-H., Hamann, M., Sandner, P.: Mode of nitric oxide action on the renal vasculature. *Acta Physiol. Scand.* 168: 41-45 (2000)
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D.: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-306 (1998)
- Langheinrich, U., Daut, J.: Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K<sup>+</sup> channel openers and glucose deprivation. *J. Physiol.* 502: 397-408 (1997)
- Large, W. A., Wang, Q.: Characteristics and physiological role of the Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 271: C435-C454 (1996)
- Linseman, D. A., Lawson, J. A., Jones, D. A., Ludens, J. H. : Glyburide attenuates calmodulin antagonist-stimulated renin release from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 269: F242-F247 (1995)
- Lorenz, J. N., Greenberg, S. G., Briggs, J. P.: The macula densa mechanism for control of renin secretion. *Semin. Nephrol.* 13: 531-542 (1993)
- Ma, H.-T., Patterson, R. L., van Rossum, D., B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D. L.: Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 287: 1647-1651 (2000)

- Marty, A., Tan, Y. P., Trautmann, A.: Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *J. Physiol.* 357: 293-325 (1984)
- Mechmann, S., Pott, L.: Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 319: 597-599 (1986)
- Metzger, F., Quast, U.: Binding of [<sup>3</sup>H]-P1075, an opener of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, to rat glomerular preparations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 452-459 (1996)
- Miura, M., Boyden, P. A., ter Keurs, H. E.: Ca<sup>2+</sup> waves during triggered propagated contractions in intact trabeculae. *Am. J. Physiol.* 274: H266-H276
- Morel, J. L., Macrez-Lepêtre, N., Mironneau, J.: Angiotensin II-activated Ca<sup>2+</sup> entry-induced release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in rat portal vein myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 118: 73-78 (1996)
- Naftilan, A. J., Oparil, S.: inhibition of renin release from rat kidney slices by the angiotensins. *Am. J. Physiol.* 235: F62-F68 (1978)
- Nelson, L. D., Unlap, M. T., Lewis, J. L., Bell, P. D.: Renal arteriolar Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol.* 276: F567-F573 (1999)
- Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F., Standen, N. B.: Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 259: C3-C18 (1990)
- Nelson, M. T., Quayle, J. M.: Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268: C799-C822 (1995)
- Oberdisse, E.: *Pharmaka zur Behandlung von Funktionsstörungen des endokrinen Systems.* In: Oberdisse, E., Hackenthal, E., Kuschinsky. (eds): *Pharmakologie und Toxikologie.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997)
- Ogawa, K., Yamasato, M., Taniguchi, K.: Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat. Rec.* 243: 336-346 (1995)
- Osswald, H., Schmitz, H. J., Kemper, R: Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303: 95-99 (1978)
- Osswald, H., Quast, U.: Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells. In: Scherübl, H., Hescheler, J. (eds): *The electrophysiology of neuroendocrine cells.* CRC Press, Boca Raton, Florida: 301-314 (1995)
- Palade, P., Dettbarn, C., Alderson, B., Volpe, P.: Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup>- or caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular membrane systems. *Mol. Pharmacol.* 36: 673-680 (1989)

- Parekh, A. B., Penner, R.: Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77: 901-930 (1997)
- Park, C. S., Han, D. S., Fray, J. C.: Calcium in the control of renin secretion:  $\text{Ca}^{2+}$  influx as an inhibitory signal. *Am. J. Physiol.* 240: F70-F74 (1981)
- Putney, J. W., Jr.: Capacitative calcium entry revisited. *Cell calcium* 11: 611-624 (1990)
- Quast, U.: Do the  $\text{K}^+$  channel openers relax smooth muscle by opening  $\text{K}^+$  channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 332-337 (1993)
- Quast, U. und Glocker, S.: Vascular pathology and the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel. In: Yellon, D. M., Gross, G. J. (eds): *Myocardial protection and the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel*. Kluwer Verlag: 31-50 (1995)
- Quast, U.: ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in the kidney. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 213-225 (1996)
- Raeymaekers, L., Wuytack, F., Casteels, R.: Subcellular fractionation of pig stomach smooth muscle: a study of the distribution of the  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$  activity in plasmalemma and endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 815: 441-454 (1985)
- Ralevic, V., Burnstock, G.: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492 (1998)
- Reddi, V., Zaglul, A., Pentz, E. S., Gomez, R. A.: Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 63-71 (1998)
- Reinhardt, R. R., Chin, E., Zhou, J., Taira, M., Murata, T., Manganiello, V. C., Bondy, C. A.: Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Clin. Invest.* 95: 1528-1538 (1995)
- Renström, E., Eliasson, L., Rorsman, P.: Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by camp in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* 502: 105-118 (1997)
- Russ, U., Rauch, U., Quast, U.: Pharmacological evidence for a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J. Physiol.* 517: 781-790 (1999)
- Salomonsson, M., Gonzáles, E., Westerlund, P., Persson, A. E. G.: Intracellular cytosolic free calcium concentration in the macula densa and in ascending limb cells at different luminal concentrations of sodium chloride and with added furosemide. *Acta Physiol. Scand.* 142: 283-290 (1991)
- Salomonsson, M., Kornfeld, M., Gutiérrez, A. M., Magnusson, M., Persson, A. E. G. : Effects of stimulation and inhibition of protein kinase C on the cytosolic calcium concentration in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiol. Scand.* 161: 271-279 (1997)

- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., Ruth, P.: Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP<sub>3</sub> receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 404: 197-201 (2000)
- Scholz, H., Kaissling, B., Inagami, T., Kurtz, A.: Differential response of renin secretion to vasoconstrictors in the isolated perfused rat kidney. *J. Physiol.* 441: 453-468 (1991)
- Scholz, H., Kurtz, A.: Differential regulation of cytosolic calcium between afferent arteriolar smooth muscle cells from mouse kidney. *Pflügers Arch.* 431: 46-51 (1995)
- Schricker, K., Della Bruna, R., Kurtz, A.: Extracellular calcium exerts a dual effect on renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch.* 423: 14-20 (1993)
- Schricker, K., Kurtz, A.: Role of membrane-permeable ions in renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 269: F64-F69 (1995)
- Schwertschlag, U., Hackenthal, E.: Forskolin stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 84 : 111-113 (1982)
- Seiler, S. M., Arnold, A. J., Stanton, H. C.: Inhibitors of inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from isolated platelet membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 36: 3331-3337 (1987)
- Sidky, A. O., Baimbridge, K. G.: Calcium homeostatic mechanisms operating in cultured postnatal rat hippocampal neurones following flash photolysis of nitrophenyl-EGTA. *J. Physiol.* 504: 579-590 (1997)
- Skøtt, O.: Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch.* 407: 41-45 (1986)
- Skøtt, O.: Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am. J. Physiol.* 255: F1-F10 (1988)
- Somlyo, A. P., Himpens, B.: Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB* 3: 2266-2276 (1989)
- Sosath, B.: Untersuchungen zur Regulation der Reninsekretion an isolierten superfundierten juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1999)
- Standen, N. B., Quayle, J. M.: K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* 164: 549-557 (1998)
- Sugiyama, T., Goldman, W. F.: Measurement of SR free Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in permeabilized smooth muscle cells with use of furaptra. *Am. J. Physiol.* 269: C698-C705 (1995)

- Taniguchi, S., Marchetti, J., Morel, F.: Cytosolic free calcium in single microdissected rat cortical collecting tubules. *Pflügers Arch.* 414: 125-133 (1989)
- Taugner, R., Hackenthal, E., Rix, E., Nobiling, R., Poulsen, K.: 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.* 22: S33-S43 (1982)
- Taugner, R., Nobiling, R., Metz, R., Taugner, F., Bührle, C., Hackenthal, E.: Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res.* 252: 687-690 (1988)
- Timmermanns, P. B. M. W. M., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. M., Smith, R. D.: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251 (1993)
- Vallon, V., Kirschenmann, D., Brenner, I., Albinus, M., Osswald, H.: Potassium diet as a determinant for the renal response to systemic potassium channel modulation in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: 245-252 (1998)
- Vander, A. J., Geelhoed, G. W.: Inhibition of renin secretion by angiotensin II. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 120: 399-403 (1965)
- Weihprecht, H., Lorenz, J. N., Briggs, J. P., Schnermann, J.: Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am. J. Physiol.* 266: F227-F239 (1994)
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., Shutter, G., Casteels, R.: 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: 45-52 (1982)
- Yamagishi, T., Yanagisawa, T., Taira, N.:  $\text{K}^+$  channel openers, cromakalim and Ki4032, inhibit agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in canine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346: 691-700 (1992)

## **Publikationsverzeichnis**

### **Originalpublikationen**

Russ, U., Rauch, U., Quast, U.: Pharmacological evidence for a  $K_{ATP}$  channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J. Physiol.* 517: 781-790 (1999)

### Kongreßbeiträge

Quast, U., Russ, U., Rauch, U., Albinus, M.: The response of renin secreting cells from rat kidney to levcromakalim and glibenclamide. *Pflügers Arch.* 437 Suppl. R100 (1999)

Rauch, U., Russ, U., Albinus, M., Quast, U.: Renin secreting cells in the rat vas afferens: Immunofluorescent identification, electrophysiological studies and regulation of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Pflügers Arch.* 439 Suppl. R374 (2000)



## Lebenslauf

Name: Ulrich Christian Rauch

Geburtsdatum: 08.08.1969

Geburtsort: Pirmasens

### Schulbildung:

1976 – 1980 Grundschule Wittelsbach in Pirmasens

1980 – 1989 Staatliches Leibniz - Gymnasium Pirmasens

18.05.1989 Abitur

### Wehrdienst:

1989 – 1990 Grundwehrdienst

3./ PzbtI 153 Koblenz

### Hochschulbildung:

ab WS 1990/91 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern

17.11.1992 Vordiplom in Biologie

20.11.1995 Diplom in Biologie

01.12.1995 – 31.08.1997 Promotion bei Prof. Dr. J. W. Deitmer in der Abteilung für Allgemeine Zoologie der Universität Kaiserslautern

15.09.1997 – 31.08.2000 Promotion bei Prof. Dr. U. Quast am Pharmakologischen Institut der Eberhard - Karls - Universität Tübingen, Abteilung für Molekularpharmakologie;

Thema: Untersuchungen zu Lokalisation, intrazellulärer Calciumkonzentration, Membranpotential und sekretorischer Aktivität reninsezernierender Zellen in der afferenten Arteriole der Ratte