

Aus dem Institut für vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Verminderte renale Corin-Expression trägt zur Volumenretention
bei proteinurischen Nierenerkrankungen bei**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Danny Bernd Polzin

aus Hamburg

Gutachter: 1.: Prof. S. Bachmann

2.: Prof. R. Kettritz

3.: Prof. R. Mrowka

Datum der Promotion: 24.02.2012

Für Britta

Abstract

Patients with proteinuric kidney diseases often have symptoms of salt and water retention. It has been hypothesized that dysregulated sodium absorption is due to increased proteolytic cleavage of epithelial sodium channels (ENaCs) and increased Na,K-ATPase expression. Microarray analysis identified a reduction in kidney corin mRNA expression in rat models of puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome (PAN) and acute anti-Thy1 glomerulonephritis (GN). As atrial natriuretic peptide (ANP) resistance is a mechanism accounting for volume retention, we analyzed the renal expression and function of corin a type II transmembrane serine protease that converts pro-ANP to active ANP. By immunohistochemical analysis we found that corin was co-localized with ANP. The nephrotic and glomerulonephritic models exhibited concomitantly increased pro-ANP and decreased ANP protein levels in the kidney consistent with low amounts of corin. Importantly, kidneys from corin knockout mice had increased amounts of renal beta-ENaC and its activators, phosphodiesterase (PDE) 5 and protein kinase G II, when compared to wild-type mice. A similar expression profile was also found in cell culture suggesting the increase in PDE5 and protein kinase G II could account for the increase in beta-ENaC seen in nephrotic syndrome and GN. Thus, we suggest that corin might be involved in the salt retention seen in glomerular diseases.

Schlagwörter:

Corin, Corin Knock-Out, ANP, PAN, Anti-Thy1 GN, ENaC, PDE5, PKGII

Keywords:

Corin, Corin Knock-out, ANP, PAN, anti-Thy1 GN, ENaC, PDE5, PKGII

Danksagung

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben. Insbesondere trifft dies auf Prof. S. Bachmann, Franziska, Kerstin, Frauke, Henriette und Christian zu. Außerdem danke ich Sven, Theresa, Jessica und Susanne für eine schöne gemeinsame Zeit. Zuletzt geht mein Dank außerdem an all jene Menschen, die mir mein Studium erst ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	11
1.1. Renale Volumenregulation	11
1.1.1. Transportsysteme der tubulären Natriumrückresorption	11
1.1.2. Regulationssysteme von Volumenhaushalt und tubulärer Rückresorption	13
1.2. Epidemiologie von Nierenerkrankungen	14
1.3. Glomerulopathien und Proteinurie	14
1.3.1. Physiologische Grundlagen	14
1.3.2. Klassifikation von Proteinurien	15
1.3.3. Klassifikation der Glomerulopathien	16
1.3.4. Progression glomerulärer Schädigungen	16
1.4. Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen	16
1.4.1. Das nephrotische Syndrom	17
1.4.2. Das nephritische Syndrom	17
1.5. Tiermodelle der Glomerulonephritis	18
1.5.1. Puromycin Aminonucleoside Nephrosis (PAN)	18
1.5.1.1. PAN-Induktion	19
1.5.1.2. Pathogenese und Krankheitsverlauf	19
1.5.2. anti-Thy1 Glomerulonephritis (GN)	19
1.5.2.1. Thy1 GN-Induktion	20
1.5.2.2. Pathogenese und Krankheitsverlauf	20
1.5.3. Volumenretention in PAN und anti-Thy1 GN Ratten	21
1.6. Mechanismen der Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen	22
1.6.1. Die Volumenüberschuss-Hypothese	22
1.7. Primäre Volumenretention bei Proteinurie	23
1.7.1. Veränderungen der Expressionsrate tubulärer Transportsysteme	23
1.7.2. Veränderungen im proximalen Tubulus	23
1.7.2.1. Veränderungen im distalen Tubulus und Sammelrohr	23
1.7.3. Einflussfaktoren auf die tubulären Transportsysteme bei Proteinurie	24

1.7.3.1.	Systemisch-hormonelle Systeme	24
1.7.3.2.	Membranlipide und Lipid rafts	24
1.7.3.3.	Mikrotubulärer Apparat	25
1.7.3.4.	Proteolytische ENaC Aktivierung	25
1.7.3.5.	Resistenz gegen die Wirkung von Atrial natriuretisches Peptid (ANP)	26
1.8.	ANP-System und Corin	26
1.8.1.	Familie der natriuretischen Peptide	27
1.8.1.1.	Atrial Natriuretisches Peptid (ANP)	28
1.8.2.	Rezeptorbindung und Signaltransduktion	28
1.8.2.1.	Rezeptortypen	28
1.8.2.2.	Signaltransduktion nach ANP-Bindung	29
1.8.3.	Renale Effekte von ANP	30
1.8.4.	Corin	30
1.8.5.	Bluthochdruck in Corin Knock-Out (Corin ^{-/-}) Mäusen	31
2.	Zielsetzung dieser Arbeit	32
3.	Material und Methoden	34
3.1.	Lösungen	34
3.2.	Versuchstiere	35
3.2.1.	Versuchstiere für die Studien an Corin-defizienten Mäusen (Corin ^{-/-})	35
3.2.2.	Versuchstiere der proteinurischen Modelle PAN und anti-Thy1 GN	35
3.2.3.	Induktion der anti-Thy1 GN	35
3.2.4.	Induktion der PAN-Nephritis	36
3.2.5.	Bestimmung von Trinkmenge und Urinvolumen	36
3.2.6.	Analyse der Plasma- und Urinparameter	36
3.3.	Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung	37
3.4.	Isolation und Präparation der Plasmamembran (PM)	37
3.5.	Hek-293, mpkCCD _{CL4} Zellkultur, Transfektion und Aufarbeitung	38
3.5.1.	Verwendete cDNA-Vektoren zur Transfektion	38
3.5.2.	Transfektion der Hek293 und mpkCCD _{CL4} Zellen	38
3.5.3.	Biochemische Aufbereitung der Zellkultur	39
3.5.4.	mpkCCD _{CL4} Zellkultur	39
3.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.7.	Biochemische Analyseverfahren	40
3.7.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting	40
3.8.	Real-Time quantitative PCR	41
3.8.1.	mRNA Isolierung	41
3.8.2.	Reverse Transkription – cDNA Synthese	41

3.8.3.	Durchführung der TaqMan® Real-Time-PCR Reaktion _____	42
3.9.	Transkriptomanalyse mittels DNA MicroArray _____	42
3.9.1.	Polymerase-Kettenreaktion _____	43
3.10.	Morphologische Analyse _____	44
3.10.1.	Immunhistochemische Analyse _____	44
3.11.	Verwendete Antikörper _____	45
3.12.	ANP-ELISA zur Gewebemessung in PAN und anti-Thy1 GN Ratten _____	45
3.13.	Herstellung des monoklonalen anti-Corin-Antikörpers _____	46
3.13.1.	Expression des rekombinanten Antigens in E. Coli _____	46
3.13.2.	Immunisierung der Tiere _____	47
3.13.3.	Kultivierung von Myelomzellen _____	48
3.13.4.	Zellfusion von Myelomzelle und B-Zelle (Maus) zur Hybridomzelle _____	48
3.13.5.	Kultivierung der Hybridomzellen _____	49
3.13.6.	Spezifitätskontrolle der einzelnen Klone _____	49
3.14.	<i>In situ</i> Hybridisierung _____	49
3.14.1.	cDNA Generierung _____	49
3.14.2.	Transformation _____	50
3.14.3.	In-vitro-Transkription _____	50
3.14.4.	Hybridisierung _____	51
3.14.5.	Entfernen nicht hybridisierter Riboproben _____	51
3.14.6.	Detektion der hybridisierten Riboproben _____	52
3.15.	Statistische Auswertung _____	52
4.	Ergebnisse _____	53
4.1.	Klinische und laborchemische Analysen _____	53
4.1.1.	Klinische Parameter _____	53
4.1.2.	Plasmaparameter _____	53
4.1.3.	Renale Funktionsparameter _____	53
4.1.4.	Urinparameter _____	54
4.2.	Verifikation des anti-Corin-Antikörpers _____	54
4.2.1.	Lokalisation von Corin in der Niere _____	56
4.3.	Lokalisationsstudien von ANP in der Niere _____	57
4.3.1.	mRNA Darstellung von ANP in der Niere _____	58
4.3.2.	Immunhistochemische Darstellung von ANP in der Niere _____	58
4.4.	Veränderungen von Corin und ANP in PAN- und anti-Thy1 GN _____	59
4.4.1.	mRNA Transkriptionsraten in Microarray und Taq®-Man Real-Time-PCR _____	59

4.4.2.	Veränderte Gewebekonzentrationen von Corin, ANP und Pro-ANP	60
4.5.	Untersuchungen am Corin ^{-/-} Modell	62
4.5.1.	Auswirkungen von Corin ^{-/-} auf Transportprozesse und ANP-Signalkaskade	63
4.5.2.	Aldosteron Signalkaskade in Corin ^{-/-} Tieren	65
4.6.	Proteinexpressionslevel von β -ENaC und ANP-Signalkomponenten nach cGMP Reduktion sowie PDE5 und PKGII Überexpression	67
4.7.	Veränderung von β -ENaC und ANP-Signalkomponenten in PAN und anti-Thy1 GN	68
5.	Diskussion	70
6.	Zusammenfassung	80
7.	Literaturverzeichnis	82
	Erklärung	90
	Publikationsliste	91
	Curriculum Vitae	92

Abkürzungsverzeichnis

PAN	Puromycin Aminonukleosid Nephrose
GN	Glomerulonephritis
NPR-A,B,C	Natriuretisches Peptid Rezeptor-A,B,C
HEK-293	Human Embryonic Kidney-293
PKG II	Proteinkinase G II
PDE	Phosphodiesterase
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
NO	Stickstoffmonoxid
Aa.	Arteriae
GTP	Guanosintriphosphat
PEG	Polyethylenglykol
PM	Plasmamembran
KG	Körpergewicht
BNP	Brain Natriuretisches Peptid
DMEM	Dulbeccos Modified EAGLe Medium
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
GBM	Glomeruläre Basalmembran
PDGF	Platelet-Derived Growth-Factor
11 β HSD2	11 β Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoform 2
IgA	Immunglobulin A
TGF	Tubulo-glomeruläres Feedback
AQP-1,2	Aquaporin-1,2
NKA	Natrium-Kalium ATPase
ADH	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
ANG I	Angiotensin I
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
NKCC2	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Kotransporter
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
TAL	Dicker Teil der aufsteigenden Henle'schen Schleife
ANP	Atrial Natriuretisches Peptid
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NCC	Natrium-Chlorid Symporter
ebd.	ebenda
NaPi-lia	Natrium abhängiger Phosphat-Transporter lia
bFGF	Basic fibroblast growth factor
KO, ^{-/-}	Knock-Out

1. Einleitung

1.1. Renale Volumenregulation

Die Nieren haben zentrale Bedeutung für die Aufrechterhaltung und Regulation der extrazellulären Elektrolyt- und Wasser-Homöostase. Das innere Milieu im menschlichen Organismus wird angesichts sich ständig ändernder Bedingungen eng kontrolliert, reguliert und angepasst. Das im Kreislaufsystem zirkulierende Blutvolumen muss kontinuierlich aufrechterhalten werden, um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen und den Abtransport von Kohlendioxid und Stoffwechselendprodukten sicherzustellen. Neben Kontrolle und Regulation des Elektrolythaushalts kommt der Niere entscheidende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks im Plasma zu: eine der Hauptfunktionen der beim Menschen etwa 1.000.000 Glomeruli jeder Niere ist die Filtration niedermolekularer Stoffwechselprodukte aus dem Plasma unter gleichzeitiger Retention von Proteinen und anderen Makromolekülen. Trotz Produktion von täglich 180 l Tubulusfiltrat, dem Primärharn, werden der Blutproteingehalt von 50 bis 70 g/l sowie das zirkulierende Blutvolumen durch die Mechanismen der glomerulären Filterfunktion und der tubulären Rückresorption aufrechterhalten. Als Stellgröße der Volumenregulation dient die Konzentration von Natrium als überwiegender Elektrolyt im extrazellulären Milieu. Positive und negative Natriumbilanzen führen deshalb durch die parallele Retention bzw. Ausscheidung von elektrolytfreiem Wasser zu Volumenproblemen.

1.1.1. Transportsysteme der tubulären Natriumrückresorption

Die Kontrolle des Flüssigkeitsvolumens erfolgt durch die kontrollierte Filtration und Rückresorption von Natrium und Wasser an verschiedenen Transportsystemen entlang des Nephrons. Glomerulär frei filtrierte Natrium wird von den Tubuluszellen an der luminalen Seite aufgenommen und unter Energieverbrauch an der basolateralen Seite zurück ins Blut gepumpt. Etwa 70 Prozent des filtrierten Natriums wird im proximalen Tubulus rückresorbiert (Rose 1994). In diesem Segment stellt der Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 3 (NHE3) den überwiegenden Transportweg der Natriumrückresorption dar (Knepper and Brooks 2001). Daneben kann, z.B. bei Störungen dieses Transportwegs, ein Großteil der Natriumrückresorption durch den

Natrium-Phosphat-Kotransporter Isoform 2a (NaPi-IIa) kompensatorisch erfolgen (ebd.). Die Diffusion von Wasser erfolgt im proximalen Tubulus, wie auch im absteigenden Teil der Henle'schen Schleife, durch den Wasserkanal Aquaporin (AQP) 1 (Nielsen, Smith, Christensen, Knepper and Agre 1993). Die Rückresorption in den distalen Tubulusabschnitten, zu denen Henle'schen Schleife, distales Konvolut, Verbindungstubulus und Sammelrohr gehören, ist für die Regulation des Salz- und Wasserhaushalt entscheidend (Rose 1994). Hierbei kommen dem Verbindungstubulus und dem kortikalen Sammelrohrsystem besondere Bedeutung für die Feinregulation des Salz- und Wasserhaushalts zu. Die Hormone ADH und Aldosteron sind für die Steuerung dieser Feinregulation verantwortlich; ihre Rezeptoren befinden sich in diesen Nephronabschnitten. In der Henle'schen Schleife werden 20 bis 25 Prozent, im distalen Konvolut 10 Prozent und im Verbindungstubulus und Sammelrohr etwa 1-5 Prozent des filtrierten Natriums rückresorbiert (Hierholzer and Fromm 2005). An der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife wird der apikale Natriumeinstrom zu 90% durch den Na^+ , K^+ , 2Cl^- -Kotransporter Isoform 2 (NKCC2) sowie, in geringem Umfang, durch NHE3 gewährleistet. Die Wasserundurchlässigkeit der aufsteigenden Henle'schen Schleife bewirkt einen Konzentrierungseffekt der Nierenmedulla sowie einen Verdünnungseffekt des Tubulusfiltrats vor Eintritt in das distale Konvolut. Im Rahmen dieser Abläufe spielt NKCC2 eine bedeutende Rolle (Masilamani, Knepper and Burg 2000). Im distalen Konvolut kommt dem Thiazid-sensitiven Na^+ , Cl^- -Kotransporter (NCC) für die Natriumrückresorption entscheidende Bedeutung zu. Zudem wird im distalen Konvolut, wie auch im Verbindungstubulus sowie im kortikalen und medullären Sammelrohr der Aldosteron-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC) exprimiert (Duc, Farman, Canessa, Bonvalet and Rossier 1994). ENaC gilt als der wichtigste und mengenlimitierende Faktor der spätdistalen Natriumrückresorption (Yu, Schumacher, Frey, Frey and Vogt 2005). Alle apikalen Natriumtransporte in proximalen und distalen Tubulusabschnitten sind von der Aktivität der basolateral lokalisierten Natrium-Kalium-ATP (Adenin-Triphosphat)-ase (NKA) abhängig, die unter Energieaufwand drei Ionen Natrium nach extrazellulär gegen zwei Kalium nach intrazellulär austauscht. Der über Diffusion verlaufende Wassertransport wird im proximalen Tubulus über AQP1 und im Sammelrohr, zur Feinregulation, über AQP2 gewährleistet. AQP2 wird in der Membran sowie in intrazellulären Vesikeln von Hauptzellen exprimiert (Nielsen, Smith et al. 1993) und über das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert.

1.1.2. Regulationssysteme von Volumenhaushalt und tubulärer Rückresorption

Das effektiv zirkulierende Blutvolumen wird mittels Dehnungsrezeptoren in Gefäßen und kardialen Vorhöfen bestimmt. Vasokonstriktorische Effekte des sympathischen Nervensystems sowie hormonelle Kontrolle durch Angiotensin II (Ang II), ein Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), ermöglichen Sofortkorrekturen von Kreislaufstörungen. In der Niere können durch Mechanismen der myogenen Autoregulation und des tubuloglomerulären Feedbacks (TGF) Schwankungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Rückresorptionsrate im proximalen Tubulus unmittelbar korrigiert werden. Durch Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation der glomerulären Gefäße sowie Einflüsse auf die proximale Rückresorptionsrate werden kurz- bis mittelfristige Korrekturen von Kreislaufstörungen möglich (Knotek, Rogachev, Ohara and Schrier 2000). Ein vermindertes Natrium- bzw. Chloridangebot in der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife wird von einem Plaque spezifischer Zellen, der Macula densa, erfasst und bewirkt über diese die Aktivierung des RAAS. Aus Myoepithelzellen der afferenten glomerulären Arteriole, die zum juxtaglomerulären Apparat (JGA) gehören, wird das Enzym Renin freigesetzt, welches die Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I) katalysiert (Hierholzer and Fromm 2005). Ang I ist Ausgangsprodukt für Ang II, dem als potenter Vasokonstriktor am peripheren Gefäßsystem und direkter Stimulator des Natrium-Protonen-Austauschers, dem im proximalen Tubulus eine ausgesprochene Bedeutung zukommt (Liu and Cogan 1990). Daneben bewirkt Ang II eine glomeruläre Gefäßkonstriktion, die an der afferenten Arteriole stärker ausfällt als an der efferenten Arteriole, woraus das Absinken der GFR resultiert (Kuhlmann and Walb 2008). Eine weitere wichtige Funktion von Ang II ist die Stimulation von Bildung und Sekretion des Mineralokortikoids Aldosteron aus den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron regt in den Hauptzellen des Sammelrohrs die Natriumrückresorption durch ENaC an. Dies kann bei Dysregulation zur renalen Volumenretention führen. Auch die Ausschüttung von ADH aus der Neurohypophyse, kann als nicht-osmotische Reaktion, durch Ang II ausgelöst werden. Neben vasokonstriktorischen Effekten bewirkt ADH im renalen Sammelrohr allerdings hauptsächlich die Exozytose vesikulär gespeicherter Aquaporine und damit deren Einbau in die apikale Zellmembran, wodurch eine vermehrte Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn ermöglicht wird.

1.2. Epidemiologie von Nierenerkrankungen

Die Progression von Nierenerkrankungen ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Im Jahr 2006 lebten in Deutschland etwa 87.000 Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz, jährlich kommen etwa 200 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner hinzu (Frei and Schober-Halstenberg 2006). In westlichen Ländern bilden die diabetische oder hypertensive Nephropathie sowie Glomerulonephritiden (GN) die häufigsten Ursachen für die terminale Niereninsuffizienz. Weltweit spielen vermutlich Formen der infektiösen GN, wie durch Malaria-Plasmodien verursacht, die zahlenmäßig bedeutendste Rolle (Couser 1999). Patienten mit einem irreversiblen Verlust der glomerulären, tubulären und endokrinen Nierenfunktionen können nur durch eine Ersatztherapie wie Dialyse oder Transplantation am Leben gehalten werden. Durch die langen Wartezeiten auf Spendernieren bleibt für viele Patienten auch für längere Zeiträume die Dialyse die einzige Therapieoption. So wurden im Jahr 2006 in Deutschland fast 63.500 Patienten chronisch dialysiert. Trotz der im wesentlichen vorteilhaften Auswirkungen der Hämodialyse, ist die Lebensqualität von Dialysepatienten deutlich eingeschränkt; Morbidität und Mortalität sind deutlich erhöht (Frei and Schober-Halstenberg 2006). Außerdem gehören Nierenersatzbehandlungen nicht zuletzt zu den teuersten Therapieverfahren überhaupt (ebd.).

1.3. Glomerulopathien und Proteinurie

1.3.1. Physiologische Grundlagen

Die glomeruläre Filtration und die Retention von Makromolekülen werden durch die größen- und ladungselektiven Eigenschaften der glomerulären Filterstrukturen sowie die einwirkenden hämodynamischen Kräfte auf die glomeruläre Strombahn bestimmt (Ibrahim, Rosenberg and Hostetter 2000). Strukturell besteht der glomeruläre Filter aus einem fenestrierten Endothel mit einer spezifischen Oberfläche, der Glykokalyx, einer glomerulären Basalmembran sowie der aus interdigitierenden Fußfortsätzen epithelialer Podozyten gebildeten Schlitzmembran. Auch unter physiologischen Bedingungen werden täglich circa 5 Gramm Protein aus dem Blut in den Primärharn des Tubulusapparates filtriert (Brunkhorst, Schulze and Floege 2000). Diese ausschließlich niedermolekularen Proteine werden nicht ausgeschieden, sondern im proximalen Tubulussystem über rezeptorvermittelte Endozytose rückresorbiert (ebd.). Dem

makromolekularen Glykoprotein Megalin und seinem Cofaktor Cubilin kommen bei diesem Prozess entscheidende Bedeutung zu (Amsellem, Gburek et al. 2010; Saito, Sato, Iino and Takeda 2010). Die rückresorbierten Proteine können nach der Aufnahme in Endosomen, der Verschmelzung mit Lysosomen und dem folgenden Abbau in Aminosäuren nach Abgabe ins Blut wiederverwertet werden. Im Urin gesunder Erwachsener werden nur 80 (\pm 25) mg Protein pro Tag ausgeschieden (Dorhout, Roos, Boer, Yoe and Simatupang 1979).

1.3.2. *Klassifikation von Proteinurien*

Die Messung von Proteinen im Urin gehört als klinischer Parameter renaler Schädigungen zur nephrologischen Basisdiagnostik. Beim Erwachsenen gilt eine Proteinausscheidung größer 150 mg pro Tag als pathologisch und damit abklärungsbedürftig (Rose and Fletcher 2010). Glomeruläre Schädigungen unterschiedlichster Genese resultieren, durch Veränderungen der Permeabilität der filtrierenden Strukturen, in einer glomerulären Proteinurie (Ibrahim, Rosenberg et al. 2000). Die erhöhte Durchlässigkeit des Filters führt zum Übertritt von Proteinen in den proximalen Tubulus und übersteigt dort die Kapazitäten der endozytotischen Rückresorption. Der Verlust der negativen Ladungsbarriere, wie im Rahmen einer Minimal-Change-GN, erhöht die Durchlässigkeit für negativ geladene Proteine geringen Molekulargewichts, wie Albumin, und führt zur selektiven Proteinurie oder Mikroproteinurie. Erst bei stärkeren Schädigungen passieren höhermolekulare Proteine den glomerulären Filter; die Zusammensetzung dieser unselektiven Proteinurie entspricht weitestgehend der des Plasmas. Tubuläre und tubulo-interstitielle Schädigungen führen durch Beeinträchtigungen der proximalen Rückresorption glomerulär filtrierter Proteine zur sog. tubulären Proteinurie. Neben Albumin erscheinen im Urin dann niedermolekulare Markerproteine wie β_2 -Mikroglobulin, Lysozym (Ibrahim, Rosenberg et al. 2000), α_1 -Antitrypsin, Präalbumin sowie zelluläre und sezernierte Proteine als Zeichen der tubulären Zellschädigung (Brunkhorst, Schulze et al. 2000). Quantifizierungen ergeben eine Proteinurie von weniger als 2 g pro Tag (Ibrahim, Rosenberg et al. 2000). Massiv erhöhte niedermolekulare Proteine im Plasma treten bei Hämolyse, Rhabdomyolyse oder Paraproteinämien im Rahmen maligner Erkrankungen auf und werden ebenfalls glomerulär filtriert, jedoch nur unvollständig im Tubulussystem rückresorbiert und imponieren klinisch als sog. prärenale Proteinurie (Thews, Zywiets,

Lecher and Vaupel 1999).

1.3.3. *Klassifikation der Glomerulopathien*

Die ätiologische Unterteilung von Glomerulopathien erfolgt in primäre Formen, wie Minimal-change-GN, Immunglobulin A (IgA)-Nephropathie oder mesangioproliferative GN, sowie sekundäre Formen im Rahmen systemischer Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Vaskulitiden oder Lupus erythematodes. Morphologische Klassifikationskriterien beziehen sich auf das Vorliegen oder Fehlen proliferativer Veränderungen wie glomerulärer Mesangiumzellproliferation sowie der Infiltration von Leukozyten (Martin, Thomas and Colindres 2003) in den betroffenen Glomeruli.

1.3.4. *Progression glomerulärer Schädigungen*

Glomerulopathien sind häufige Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz. Unabhängig von der Ursache oder der Aktivität der Grunderkrankung schreitet die glomeruläre Schädigung beständig fort und mündet schließlich im vollständigen Nierenversagen (Kriz and LeHir 2005). Die Progression beginnt im Glomerulum mit dem lichtmikroskopisch nachweisbaren Verlust der Separation zwischen Kapillarknäuel und Bowman-Kapsel (ebd.). Ausgehend von Podozyten oder Parietalzellen entstehen proteinöse und/oder zelluläre Überbrückungen, die in sog. Halbmond-Bildungen (engl. *crescents*) zum Ausdruck kommen (ebd.). Erst sekundär werden tubulointerstitielle Strukturen geschädigt; am Ende stehen interstitielle Zell- und Matrixproliferation und schließlich der Verlust betroffener sowie auch zunächst nicht-betroffener Nephrone (ebd.). Mit dem Übergang der Schädigung vom endokapillären Segment auf das extrakapilläre Kompartiment, der Podozyten und der Bowman-Kapsel, ist der Verlust reparativ-regenerativen Potentials verbunden (ebd.).

1.4. **Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen**

Patienten mit proteinurischen Nierenerkrankungen weisen klinisch häufig einen Zustand der Volumenexpansion mit arterieller Hypertonie und/oder ausgeprägter Ödembildung auf. Im klinischen Alltag ist eine Unterscheidung zwischen nephritischem und nephrotischem Symptomkomplex bzw. einer entsprechenden Verlaufsform üblich (Brunkhorst, Schulze et al. 2000). Dennoch erfolgt die Zuordnung klinischer

Erscheinungsbilder zum nephritischen oder nephrotischen Syndrom häufig willkürlich, da zwischen beiden fließende Übergänge bestehen (Haller and Gross 2003). Die ursprünglichen Konzepte differenzieren zwischen dem nephritischen Syndrom durch akut-inflammatorische Erkrankungen und dem nephrotischen Syndrom, welches durch chronisch-degenerative Veränderungen hervorgerufen wird (Orth and Ritz 1998).

1.4.1. Das nephrotische Syndrom

Als nephrotisches Syndrom wird ein klinischer Symptomkomplex mit Proteinurie größer als 3,5 g pro Tag bezeichnet, welche mit einer massiven, generalisierten Ödembildung einhergeht. Zur Syndromdefinition gehören außerdem Hypoalbuminämie und Störungen im Lipidstoffwechsel mit Hypercholesterinämie bzw. Hyperlipoproteinämie und ausgeprägter Lipidurie (Marsh 2002). Das Ausmaß der Symptomausprägung variiert beim Einzelnen beträchtlich (Ibrahim, Rosenberg et al. 2000), beispielweise kann der Verlauf mit oder ohne Anstieg von Kreatinin im Serum einhergehen (Brunkhorst, Schulze et al. 2000). Der Verlust von Immunglobulinen sowie Gerinnungsfaktoren durch die unselektive Proteinurie macht Patienten mit nephrotischem Syndrom sehr vulnerabel für Infektionen sowie thrombotische und in der Folge thromboembolische Komplikationen (Porth 2007). Pathogenetisch auslösendes Ereignis ist eine glomeruläre Erkrankung, die zum Verlust der glomerulären Permselectivität führt. Dazu gehören primäre Glomerulopathien wie verschiedene GNen sowie sekundär-entzündliche Glomerulopathien. Bei Erwachsenen ist die diabetische Nephropathie die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom, während es im Kindesalter die Minimal-change-GN ist. Bedeutende nicht-diabetische Ursachen sind fokal-segmentale Glomerulosklerosen, membranöse GN, Minimal-change-GN und membranoproliferative GN (Hricik, Chung-Park and Sedor 1998).

1.4.2. Das nephritische Syndrom

Leitsymptom des nephritischen Syndroms ist eine glomeruläre Hämaturie mit dysmorphen Erythrozyten (Akanthozyten) und Erythrozytenzylindern im Urinsediment. Die Proteinurie ist in der Regel kleiner als 3 g pro Tag und selten über einen längeren Zeitraum ausgeprägt. Über 90 Prozent der Erwachsenen mit nephritischem Syndrom entwickeln ausgeprägte generalisierte Ödeme mit typischer Lokalisation an den Augenlidern, etwa 80 Prozent eine arterielle Hypertonie. Nephritische Syndrome

werden durch Erkrankungen mit proliferativ-inflammatorischen Prozessen verursacht. Typischer Vertreter dieser Gruppe ist die akute proliferative GN, als Paradebeispiel gilt hier die Poststreptokokken-GN (Yoshizawa 2000). Rapid progressive GNen, welche häufig mit geringer klinischer Symptomatik, aber raschem Verlust der Nierenfunktion einhergehen (Haller and Gross 2003), werden hauptsächlich durch immunologische Erkrankungen hervorgerufen, eine typische primäre Form ist die IgA-Nephropathie (Porth 2007).

1.5. Tiermodelle der Glomerulonephritis

Voraussetzung für das Verständnis pathophysiologischer Mechanismen bei Glomerulonephritiden ist die histologische Beurteilung von zellulären Reaktionen, Immunprozessen oder ultrastrukturellen Veränderungen. Zur Durchführung von Studien an humanem Gewebe fehlen allerdings Gewebeproben, da im klinischen Alltag nur unter strenger Indikationsstellung Biopsien gewonnen werden, da die klinische Präsentation der Erkrankung in Zusammenschau mit indirekten Verfahren, wie z.B. Serologie, Urin-Mikroskopie oder immunologischen Reaktionen, meist zur Diagnosestellung ausreicht. Hinzu kommt, dass renale Biopsien selten den klinischen Schweregrad der Erkrankung widerspiegeln können und lediglich eine Momentaufnahme darstellen. In Ermangelung einer seriellen histologischen Auswertung ist die Chance die Mechanismen der Progression der Erkrankung abzugrenzen limitiert. Eine Reihe dieser Hürden wurde durch die Etablierung geeigneter Tiermodelle überwunden, welche damit zur Erweiterung unseres Wissens über glomeruläre Erkrankungen beitragen.

1.5.1. Puromycin Aminonucleoside Nephrosis (PAN)

Seit der Erstbeschreibung vor mehr als 50 Jahren (Frenk, Antonowicz, Craig and Metcalf 1955) hat sich das PAN Modell zu einem der am meisten untersuchten Tiermodelle bezüglich glomerulärer Erkrankungen etabliert. Von vielen Wissenschaftlern als das akkurateste Modell zur Minimal-Change Glomerulonephritis angesehen, war es möglich in den letzten Jahrzehnten zahlreiche pathologische Mechanismen der Proteinurie aufzudecken.

1.5.1.1. PAN-Induktion

Obwohl Puromycin, ein antibiotisch wirksames Adenosin-Derivat aus *Streptomyces alboniger*, selbst keine Nephrose hervorruft, resultiert PAN in einer toxischen Schädigung der Podozyten mit sich anschließender Proteinurie. Ratten sind besonders anfällig für diese toxische Wirkung, Versuche, die PAN Nephrose in anderen Tierspezies zu etablieren scheiterten. Es wurden im Laufe der Zeit verschiedene Dosis-Regimes geführt, von niedrig-dosierten subkutanen Applikationen (1,67mg/100g Körpergewicht) bis hin zu hoch-dosierten einmaligen intraperitonealen Injektionen (15mg/100g Körpergewicht) (Ryan and Karnovsky 1975; Messina, Davies, Dillane and Ryan 1987).

1.5.1.2. Pathogenese und Krankheitsverlauf

Ausbruch und Verlauf der PAN sind abhängig von Tierstamm und Dosierung, innerhalb eines gewählten Tierstamms mit konstanten Dosierungs-Schemata, lässt sich der Krankheitsverlauf jedoch auf den Tag genau prognostizieren und die Daten sind damit reproduzierbar (Grond, Muller, van Goor, Weening and Elema 1988). An Tag 5 setzt die Proteinurie ein und zeigt einen Höhepunkt an Tag 12 mit eventueller Rückbildung an Tag 28. Genau wie bei der Minimal-Change GN beim Menschen ist die Lichtmikroskopie der Ratte in den ersten Tagen der Erkrankung wenig aufschlussreich, auch wenn sich in der Elektronenmikroskopie erste Podozyten-Vakuolisierungen und -Fußfortsatzablösungen zeigen. Die epithelialen Ablösungsprozesse führen zu einer Freilegung der glomerulären Basalmembran (GBM) mit unmittelbarer Entwicklung einer schweren Proteinurie (Ryan and Karnovsky 1975). In vitro Studien mit humanen Podozytenkulturen zeigten eine verminderte Expression von α -3, β 1 Integrin; die Ablösung der Podozytenfortsätze als Reaktion auf die PAN Exposition ist vereinbar mit der primären Rolle einer zellulären Diskontinuität des Nierenfilters als entscheidender Mechanismus der Proteinurie in diesem Modell (Krishnamurti, Zhou et al. 2001).

1.5.2. anti-Thy1 Glomerulonephritis (GN)

Die Thy1 Nephritis ist ein Modell für das nephritische Syndrom in der Ratte indem hier eine mesangioproliferative Glomerulonephritis auslöst wird. Thy1 Antigene sind 18 kDa schwere, glykosylierte Phosphatidylinositol-Membranproteine unklarer Funktion, die

ubiquitär auf der Oberfläche von Thymozyten sowie Mesangialzellen bzw. mesangialer Matrix exprimiert werden (Paul, Rennke, Milford and Carpenter 1984; Nakayama, Oite et al. 1998).

1.5.2.1. *Thy1 GN-Induktion*

Durch eine einzige i.v. Injektion (typischerweise 20 mg/100g KG) von anti-Thy1-Antikörpern, polyklonal oder monoklonal vom Typ OX-7 (Bagchus, Hoedemaeker, Rozing and Bakker 1986) bzw. Typ 1-22-3 (Wakasugi, Kawachi et al. 1999), wird eine akute, reproduzierbare mesangioproliferative GN induziert.

1.5.2.2. *Pathogenese und Krankheitsverlauf*

Das Binden der anti-Thy1-Antikörper löst eine Immunantwort mit Aktivierung des Komplement-Systems aus, an dessen Ende die Synthese des Membran-Lysekomplexes C5b-9 steht. In den ersten 48 Stunden der Erkrankung beginnt eine fulminante Mesangiolyse mit selektiver Depletion der Mesangiumzellen (auf 10% der Ursprungsmenge) und anschließender Auflösung der Mesangialmatrix (Jefferson and Johnson 1999). Die Stabilität benachbarter Kapillarschlingen geht verloren mit der Folge mikroaneurysmatischer Veränderungen. Die Bedeutung des Komplementsystems, insbesondere des Membran-Lysekomplexes C5b-9, für die Pathogenese der anti-Thy1 GN wird durch die Untersuchung an C-6 defizienten Ratten, die nach Applikation eines anti-Thymozyten Serums lediglich gering ausgeprägte mesangiale Schädigungen aufweisen, verdeutlicht (Brandt, Pippin et al. 1996). An Tag 3 nach Injektion der anti-Thy1-Antikörper tritt eine Invasion extraglomerulärer Mesangiumzellen mit anschließender Proliferation auf, die an Tag 5 in einem bis zu dreifachen Anstieg der Mesangialzellen resultiert.

Die gesteigerte Proliferation konnte mit veränderten Expressionsraten von den Zellzyklus regulierenden Proteinen in Zusammenhang gebracht werden (Shankland, Hugo et al. 1996). Selektive Inhibition von CDK2 mit Roscovitine, einem Purin-Analogen, reduzierte die Mesangiumzellproliferation sowie die extrazelluläre Akkumulation von Matrixproteinen signifikant was zu einer verbesserten renalen Funktionserhaltung führte (Pippin, Qu, Meijer and Shankland 1997). Thrombozyten und Makrophagen sind in erhöhter Anzahl im Glomerulus zu finden (Johnson, Garcia, Pritzl and Alpers 1990). Die Mesangialzellen synthetisieren und sezernieren eine Reihe von

mitogenen Botenstoffen, wie z.B. platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und Endothelin. Selektive Inhibition dieser Substanzen reduzierte die Proliferation der Mesangiumzellen (Johnson, Iida et al. 1991; Johnson, Raines et al. 1992; Fukuda, Yanagida et al. 1996; Haseley, Hugo, Reidy and Johnson 1999). Zusätzlich zu einem absoluten Anstieg der mesangioglomerulären Zellzahl tritt eine Transformation der Mesangialzellen zu Myofibroblasten ein, welche die Grundlage für die Akkumulation von Matrixproteinen (u.a. de novo Synthese von Kollagen I und III) bildet, weitestgehend ausgelöst durch die Effekte des transforming growth factor (TGF- β 1 (Border, Okuda, Languino, Sporn and Ruoslahti 1990). Das initiale Stadium von Mesangiolyse ist mit einer leichten Verminderung der GFR um etwa 30 Prozent verbunden (Jefferson and Johnson 1999). Die rassen- und tierindividuell unterschiedlich stark ausgeprägte Proteinurie weist eine positive Korrelation mit glomerulärer Schädigung auf (Kriz 2003) und erreicht am Tag 5 oder 6 ihr Maximum (Nakayama, Oite et al. 1998). Nach einmaliger anti-Thy1-Antikörper Applikation tritt eine spontane Erholung nach 6-8 Wochen auf mit Wiederherstellung der normalen Zellzahl durch Apoptose und Normalisierung der extrazellulären Matrixmasse (Shimizu, Kitamura et al. 1995). Eine zurückbleibende Glomerulosklerose tritt in der Regel nicht ein, bei wiederholter Applikation von anti-Thy1-Antikörpern oder unilateraler Nephrektomie können jedoch auch chronische Krankheitszustände resultieren (Jefferson and Johnson 1999).

1.5.3. Volumenretention in PAN und anti-Thy1 GN Ratten

Beide Tiermodelle weisen Zeichen vermehrter Volumenretention auf. PAN Ratten bilden generalisierte Ödeme und einen Aszites aus, der Blutdruck hingegen bleibt unverändert. Erhöhte Blutdruckwerte als Zeichen vermehrter Volumenretention zeigen dagegen anti-Thy1 GN Ratten ab Tag 2; im Gegensatz zu den PAN Ratten lagern sie aber kein Wasser im Interstitium in Form von Ödemen oder Aszites ein (Wagner, Dechow et al. 2000). Es konnten funktionelle Alterationen der tubulären Transporter durch in vivo Mikropunktionsstudien am einseitig induzierten PAN-Modell für die Retention verantwortlich gemacht werden (Ichikawa, Rennke et al. 1983). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Natriumretention hauptsächlich im Sammelrohr stattfindet; als morphologisches Korrelat wurden erhöhte Expressionsraten für α -, β - und γ - ENaC Untereinheiten im Sammelrohr und im Verbindungstubulus gefunden (Kim,

Wang et al. 2004). Ähnliche Expressionsveränderungen konnten auch für anti-Thy1 GN Ratten beobachtet werden (Gadau, Peters et al. 2009). Als Ausdruck der erhöhten Natriumretention weisen die verwendeten Tiermodelle eine verminderte fraktionelle Natriumausscheidung auf (ebd.).

1.6. Mechanismen der Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen

Proteinurische Symptomkomplexe wie nephrotisches und nephritisches Syndrom gehen mit Dysregulationen der Volumenhomöostase einher. Eine renale Volumenretention kann in Form interstitieller Flüssigkeitsansammlungen zum Ausdruck gelangen, die klinisch als generalisierte Ödeme imponieren. Es wurden zwei grundsätzliche Konzepte entwickelt, um die Mechanismen der Ödempathogenese zu erklären. Ein traditioneller Erklärungsansatz ging vom Zustand des Volumenmangels mit arterieller Hypovolämie durch einen erniedrigten kolloid-osmotischen Druck im Gefäßsystem aus, die sog. Volumenmangel-Hypothese (engl. *underfill-hypothesis*). Im Gegensatz dazu beruht eine modernere und mittlerweile weitgehend anerkannte Theorie auf der Vorstellung einer primären Volumenretention in der Niere, welche durch die renale Erkrankung an sich verursacht wird, die sog. Volumenüberschuss-Hypothese (engl. *overflow-hypothesis*).

1.6.1. Die Volumenüberschuss-Hypothese

Klinische Beobachtungen weisen auf mögliche primäre Veränderungen im renalen Natriumgang im nephrotischen Syndrom hin, da Ödeme klinisch erst ab 2-3 Liter Flüssigkeit sichtbar werden und somit nicht durch alleinige Extravasation von Plasmawasser entstehen können. Auch Ergebnisse von experimentellen Arbeiten zeigen, dass die Volumenretention bei Proteinurie nicht nur sekundär-reaktiv, sondern auch primär durch intrinsische Defekte im tubulären Natrium- und Wassertransport verursacht sind (Perico and Remuzzi 1993). Die renale Grunderkrankung selbst trage zur renalen Volumenretention und so zur Expansion des Plasmavolumens mit Überfüllung des Gefäßbettes bei. Intrinsische Mechanismen könnten die tubuläre Natriumrückresorption aktivieren, unabhängig von Hypovolämie oder veränderten kolloid-plasmatischen Druckverhältnissen. Erst die resultierende Erhöhung des hydrostatischen Kapillardrucks im Gefäßsystem bewirke die Filtration von Flüssigkeit aus dem Kapillarbett in das Interstitium, woraus das nephrotische Ödem entstehe (Brunkhorst, Schulze et al. 2000).

1.7. Primäre Volumenretention bei Proteinurie

1.7.1. Veränderungen der Expressionsrate tubulärer Transportsysteme

In den letzten Jahren wurden die wichtigsten Natriumtransporter im Tubulusepithel identifiziert und damit die Grundlage für die Untersuchung einzelner Transportsysteme gegeben (Knepper and Brooks 2001). Es konnten Veränderungen einzelner tubulärer Transporter beim nephrotischen und nephritischen Syndrom gezeigt werden und damit mögliche Mechanismen einer primären Volumenretention identifiziert und lokalisiert werden.

1.7.2. Veränderungen im proximalen Tubulus

Beim nephrotischen Syndrom wurden verminderte oder unveränderte Expressionsraten proximal lokalisierter Natriumtransporter festgestellt (Besse-Eschmann, Klisic et al. 2002; Kim, Wang et al. 2004; Kastner, Pohl et al. 2009). Dennoch könnten durch veränderte Aktivitätszustände einzelner Transporter Ursachen einer erhöhten Natriumretention auch im proximalen Tubulus lokalisiert sein (Besse-Eschmann, Klisic et al. 2002; Klisic, Zhang et al. 2003).

1.7.2.1. Veränderungen im distalen Tubulus und Sammelrohr

Für die Volumenretention beim nephrotischen Syndrom wurden hauptsächlich Dysfunktionen distal lokalisierter Transportsysteme verantwortlich gemacht. Aktivitätssteigerungen der basolateral lokalisierten NKA könnten in distalen Tubulusabschnitten eine vermehrte Natriumretention bewirken, wie in Tiermodellen (Ichikawa, Rennke et al. 1983; Buerkert, Martin, Trigg and Simon 1991) und Mikropunktionsstudien (Deschenes, Gonin et al. 2001) gezeigt werden konnte. Apikal wurde in distalen Nephronabschnitten der ENaC für die Retention von Natrium beim nephrotischen Syndrom verantwortlich gemacht (Kim, Wang et al. 2004). Offen bleibt bisher die Frage, ob zunächst der ENaC erhöhte Expressionsraten aufweist und aus Gründen der Elektroneutralität zu einer konsekutiven Expressionssteigerung der NKA führt, oder umgekehrt. ENaC ist gemeinsam mit NCC einer der wichtigsten Feinregulatoren für die Balance von Aufnahme und Ausscheidung über die Nahrung aufgenommenen Natriums (Rossier 1997; Meneton, Loffing and Warnock 2004).

Erhöhte Akkumulationsdichten von ENaC-Untereinheiten an der apikalen Zellmembran distaler Tubulussegmente könnten im Zusammenhang mit einer erhöhten Natriumretention stehen (Kim, Wang et al. 2004). Dennoch bleiben die Ergebnisse widersprüchlich, denn andere Untersuchungen konnten keine Veränderungen von ENaC feststellen (Audige, Yu et al. 2003; Yu, Schumacher et al. 2005). Auch für NHE3, NKCC2, NCC (Fernandez-Llama, Andrews, Ecelbarger, Nielsen and Knepper 1998; Kim, Wang et al. 2004) sowie den distal lokalisierten Wasserkanal AQP2 (Apostol, Ecelbarger et al. 1997; Fernandez-Llama, Andrews et al. 1998) wurden verminderte Expressionsraten im nephrotischen Zustand festgestellt.

1.7.3. Einflussfaktoren auf die tubulären Transportsysteme bei Proteinurie

1.7.3.1. Systemisch-hormononelle Systeme

Beim nephrotischen Syndrom wurden erhöhte Expressionsraten des Natriumtransporters ENaC gezeigt (Kim, Wang et al. 2004). Dessen Transkription und Translation wird durch das Mineralokortikoid Aldosteron induziert (Masilamani, Knepper et al. 2000) bzw. dessen Abbau durch Aldosteron inhibiert (Kim, Wang et al. 2004). Im nephrotischen Zustand wurden jedoch Verminderungen einzelner RAAS-Parameter wie Renin (Rodriguez-Iturbe, Colic, Parra and Gutkowska 1990) und Aldosteron festgestellt (Shapiro, Hasbargen, Hensen and Schrier 1990). In diesem Zusammenhang wurden die gestörte Bereitstellung des renalen Enzyms 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Isoform 2 (11- β -HSD2) und die dadurch fehlende Inaktivierung von 11-Hydroxysteroiden diskutiert, welche Aldosteron-analoge Effekte bewirken könnten (Kim, de Seigneux et al. 2006)

1.7.3.2. Membranlipide und Lipid rafts

Transportsysteme für Elektrolyte und Wasser sind von polaren Sortierungsmustern und zellulären Umverteilungsschritten innerhalb der Membran durch Endo- und Exozytose abhängig (Jentsch, Hubner and Fuhrmann 2004). Dabei können Veränderungen der Lipidzusammensetzung in der Membran, in der die Transportproteine lokalisiert sind, direkten Einfluss auf deren Funktion nehmen (Levi, Baird and Wilson 1990). Die wichtigsten Strukturbauteile aller Membranen sind Cholesterol, Glycerophospholipide und Sphingolipide (RV Löffler et Petrides 2003).

In polarisierten Epithelien findet die endgültige Prozessierung und funktionelle Bereitstellung von Proteinen in spezifischen Membrandomänen (engl. *Lipid rafts*) statt (Schuck and Simons 2004). *Lipid rafts* sind dynamische, in der Membran frei bewegliche Strukturen, die durch hohe Anteile von Cholesterol und Sphingolipiden gekennzeichnet sind (Füllekrug and Simons 2004). Durch Sortierung, Trennung und Konzentrierung von Proteinen und Lipiden (Simons and Toomre 2000) werden verschiedenste tubuläre Transport- und Kanalproteine über *Lipid rafts* ihrer endgültigen strukturellen und funktionellen Bedeutung zugeführt (Welker, Geist et al. 2007).

1.7.3.3. Mikrotubulärer Apparat

Voraussetzung für die endozytotische Wiederaufnahme von Proteinen ist eine intakte Organisation des intrazellulären Mikrotubuli-Netzwerkes (Gekle, Mildenerger, Freudinger, Schwerdt and Silbernagl 1997) als Bestandteil eines hochstrukturierten, dynamischen Zytoskeletts. Gerichtete Transportvorgänge, vermittelt durch Mikrotubuli, spielen eine wesentliche Rolle für die Entstehung und Erhaltung der polaren Zellorganisation im Tubulusepithel. Synthetisierte renale Transportproteine werden in Membranvesikeln durch das mikrotubuläre System an ihre Ziellokalisation transportiert und in die Membran inseriert (Pochynyuk, Staruschenko, Bugaj, Lagrange and Stockand 2007). Die experimentelle Desintegration des mikrotubulären Netzwerkes durch Colchizin, welches die Synthese von Mikrotubuli unterbindet, führt zu einer gestörten Bereitstellung funktionsfähiger renaler Transportsysteme (Lotscher, Scarpetta et al. 1999; Chalumeau, du Cheyron et al. 2001).

1.7.3.4. Proteolytische ENaC Aktivierung

Im Jahr 1980 konnte durch die Beobachtung, dass eine Inhibition von Serinproteasen zu einer Verringerung des transepithelialen Natriumtransports führte, die Hypothese aufgestellt werden, dass Proteasen eine Aktivierung des ENaC verursachen könnten (Orce, Castillo and Margolius 1980). In der Folge konnte durch Sequenzierungen herausgefunden werden, dass die α - und γ -Untereinheit des ENaC über spezifische Andockstellen für Proteasen verfügen (Hughey, Mueller et al. 2003). In neueren Arbeiten konnte Plasmin, eine Protease, sowohl beim nephrotischen Syndrom des Menschen als auch der Ratte Bedeutung für die Natrium- und Volumenretention zugeschrieben werden. Plasmin aktiviert ENaC durch proteolytische Prozessierung der

γ -Untereinheit. Plasmin und sein Vorläuferprotein Plasminogen konnten aus dem Urin nephrotischer Patienten und Ratten isoliert werden (Passero, Mueller et al. 2008; Svenningsen, Bistrup et al. 2009). Die Studien deuten darauf hin, dass Plasminogen bei glomerulärem Schaden frei filtriert und im Tubuluslumen durch die Urokinase zu Plasmin aktiviert wird. In der Folge kommt es auf diese Weise zu einer Aktivitätssteigerung des ENaC mit konsekutiver Natrium- und Volumenretention (ebd.).

1.7.3.5. Resistenz gegen die Wirkung von Atrial natriuretisches Peptid (ANP)

ANP führt bei erhöhter Volumenbelastung des Kreislaufs zu Natriuresis, Diuresis und Relaxation von Widerstandsgefäßen. Das nephrotische Syndrom präsentiert sich mit pathologischer Volumenretention, auf die keine oder nur inadäquate Kompensation in Form von Natriuresis folgt (Valentin, Qiu et al. 1992). Gleichzeitig konnten jedoch gesteigerte ANP-Konzentrationen im Plasma nephrotischer Patienten, oder in entsprechenden Tiermodellen, im Vergleich zu Gesunden, festgestellt werden (Tulassay, Rascher, Lang, Seyberth and Scharer 1987). Folglich wurde das nephrotische Syndrom als ein Zustand der ANP-Resistenz bezeichnet (Valentin, Qiu et al. 1992). In der Arbeit von Peterson et al. beispielsweise führte ein fünffacher Anstieg der Plasma-ANP-Konzentration bei nephrotischen Patienten weder zu einer Diuresis noch zu einer gesteigerten Natriumausscheidung woraus sich eine renale ANP-Resistenz im nephrotischen Patientenkollektiv ableiten ließ (Peterson, Madsen, Perlman, Chan and Myers 1988). Die Ergebnisse konnten in nephrotischen Ratten bestätigt werden, die nach ANP-Infusion, im Vergleich zu gesunden Ratten, keine oder nur geringe Natriuresis zeigten (Koepke and DiBona 1987; Perico, Delaini, Lupini and Remuzzi 1987). Die Niere wurde durch Versuche an unilateralen proteinurischen Tiermodellen (Injektion von Adriamycin in nur eine der beiden Aa.renalis) als primärer Ort der ANP-Resistenz aufgedeckt, da lediglich die nach Induktion proteinurische Niere eine verminderte Antwort auf systemische ANP-Infusion aufwies; die gesunde Niere reagierte normal (Perico, Delaini et al. 1989). Veränderungen auf Rezeptor- oder Signaltransduktionsebene wurden vermutet. Diese Arbeit soll die Hypothese prüfen, ob renale ANP-Alterationen im nephrotischen Syndrom eine Rolle spielen.

1.8. ANP-System und Corin

Das atrial natriuretische Peptid (ANP) gehört zum System der natriuretischen Peptide

und wurde erstmals im Jahr 1981 von Adolfo de Bold beschrieben wurde (de Bold, Borenstein, Veress and Sonnenberg 1981). Es handelt sich um ein System zur Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserhomöostase, das sich über die Evolution hinweg kaum verändert hat und in allen Vertebraten nachweisbar ist. Für viele Knochenfische ist das System der natriuretischen Peptide von entscheidender Relevanz für die Adaptation an Umgebungen unterschiedlich starker Salzkonzentrationen. Das natriuretische System konnte in Lebewesen wie dem Lachs und dem Aal nachgewiesen werden, die in ihrem Lebenszyklus sowohl in Süß- als auch in Salzwässern leben. Mit Ausnahme der Knochenfische existieren auf der Erde keine weiteren Lebewesen, die einer andauernden Gefährdung durch schwankende Salzkonzentrationen in ihren Lebensräumen ausgesetzt sind (Tervonen, Arjamaa, Kokkonen, Ruskoaho and Vuolteenaho 1998; Tsukada and Takei 2006). Beim Menschen kommt dem System der natriuretischen Peptide trotzdem eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des Blutvolumens und der Elektrolytbilanz zu, denn dem Menschen verfügbares Trinkwasser oder Ernährung könnten zu anderen Zeiten oder an anderen Orten stark schwankende Salzkonzentrationen aufweisen. Die natriuretischen Peptide werden als inaktive Vorläuferstufen synthetisiert und durch proteolytische Prozessierung aktiviert. Eine Signalpeptidase spaltet zunächst die Signalsequenz des Prä-Pro-Peptids ab: es entsteht das Pro-Peptid, das durch eine Protease in das N-Terminale sowie das C-Terminale, biologisch aktive Peptid, gespalten wird. Corin ist eine transmembranöse Serinprotease, die im Herzen identifiziert wurde, Pro-ANP zu ANP konvertiert und eine Molekulargröße von 150-200 kDA besitzt (Yan, Sheng, Seto, Morser and Wu 1999).

1.8.1. Familie der natriuretischen Peptide

Beim Säugetier wurden drei natriuretische Peptide nachgewiesen. Das Atrial Natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ Natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP). Allen natriuretischen Peptiden ist ihre natriuretische, diuretische und auf glatte Muskelzellen relaxierende Wirkung gemeinsam. Unterschiede bestehen bezüglich der Ausprägung der einzelnen Wirkstärken. Neben einer Ähnlichkeit ihrer biologischen Wirkungen bestehen auch Ähnlichkeiten auf genomischer und strukturbiochemischer Ebene. Die Peptide weisen eine Ringstruktur auf, deren Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen natriuretischen Peptiden konserviert und

von zentraler Bedeutung für Rezeptorerkenkung und biologische Aktivität ist. Außerhalb der Ringstruktur besitzen die natriuretischen Peptide N- und C-Terminale Aminosäureketten, die sich in Länge und Sequenz unterscheiden.

1.8.1.1. Atrial Natriuretisches Peptid (ANP)

Die natriuretischen Peptide werden als Pre-Pro-Hormone synthetisiert. Das menschliche Pre-Pro-ANP ist 151 Aminosäuren lang. Die proteolytische Prozessierung des N-Terminus führt zum 126 Aminosäuren umfassenden Pro-ANP, das die vorherrschende Speicherform in Granula des Herzvorhofgewebes bildet. Pro-ANP wird während der Sekretion durch Corin zu dem C-terminalen, 28 Aminosäuren umfassenden Peptid, ANP prozessiert (Yan, Wu, Morser and Wu 2000). ANP stellt die biologisch aktive Form dar. Corin defiziente Mäuse weisen eine atriale ANP-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze auf und sind hypertensiv (Chan, Knudson et al. 2005). ANP wird primär im Herzvorhof gebildet und in intrazellulären Vesikeln gespeichert; in niedrigeren Konzentrationen ist es ebenfalls in den Herzventrikeln und der Niere exprimiert. Der Stimulus für die Freisetzung von ANP ist eine erhöhte Wandspannung des Herzvorhofmuskels (de Bold, de Bold and Sarda 1986), die bei hohen zirkulierenden Blutvolumina entsteht und eine Sezernierung von ANP in den Koronarsinus mit konsekutiver Verteilung in den gesamten Organismus auslöst (Edwards, Zimmerman, Schwab, Heublein and Burnett 1988). Zusätzlich führen die Hormone Endothelin (Stasch, Hirth-Dietrich, Kazda and Neuser 1989), Angiotensin (Soualmia, Barthelemy et al. 1997) und ADH (Lachance, Garcia, Gutkowska, Cantin and Thibault 1986), genauso wie eine Kopfsenkung (Hollister, Tanaka et al. 1986) oder das Eintauchen in Wasser (Ogihara, Shima et al. 1986) zu einer ANP-Freisetzung. Das menschliche ANP-Gen befindet sich auf Chromosom 1p36.2. Das ANP Gen enthält genau wie das BNP und CNP Gen drei Exons (Yang-Feng, Floyd-Smith, Nemer, Drouin and Francke 1985).

1.8.2. Rezeptorbindung und Signaltransduktion

1.8.2.1. Rezeptortypen

Bisher wurden drei Rezeptorsubtypen der natriuretischen Peptide beschrieben, die als natriuretischer Peptidrezeptor (NPR) A, NPR-B und NPR-C bezeichnet wurden. Der

NPR-A und der NPR-B sind aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Rezeptoranteil aufgebaut, letzterer zeichnet sich zum einen durch eine Kinase-ähnliche Domäne und zum anderen durch eine Domäne mit Guanylatzyklase Aktivität aus. NPR-C besitzt keine intrinsische Aktivität und fungiert als Clearance-Rezeptor, indem natriuretische Peptide gebunden werden ohne intrazelluläre Wirkungen auszulösen. NPR-A und NPR-B repräsentieren zwei von bisher fünf beschriebenen transmembranären Guanylatzyklasen beim Menschen (Potter 2005). Die natriuretischen Peptidrezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Ligandenaffinitäten, Gewebeexpressionen und ihrer Regulation. ANP und BNP binden an den NPR-A, wobei die intrinsische Guanylatzyklase Aktivität nach Bindung von ANP um ein Vielfaches höher liegt als nach BNP Bindung (Koller, Lowe et al. 1991). Der NPR-B wird unter physiologischen Bedingungen durch CNP und weder durch ANP noch BNP aktiviert (ebd.). Alle drei natriuretischen Peptide (ANP > CNP > BNP) können durch den NPR-C gebunden werden (Suga, Nakao et al. 1992). Der Ligand/Rezeptor-Komplex wird internalisiert und lysosomal hydrolysiert mit konsekutivem Rezeptor Re-Cycling an die Zelloberfläche (Cohen, Koh, Nikonova, Porter and Maack 1996). NPR-A mRNA ist beim Menschen und in der Ratte in der Niere, dem terminalen Ileum, der Nebenniere, der Aorta und im Fett- sowie Lungengewebe exprimiert (Lowe, Chang et al. 1989; Schulz, Singh et al. 1989; Nagase, Katafuchi, Hirose and Fujita 1997). Western-Blot Analysen detektierten hohe Expressionslevel von NPR-A in Lunge, Niere, Nebenniere, Hoden und der Leber (Goy, Oliver et al. 2001; Muller, Mukhopadhyay et al. 2004).

1.8.2.2. Signaltransduktion nach ANP-Bindung

Die Bindung von ANP an den NPR-A Rezeptor führt zur Aktivierung der zytoplasmatischen Guanylatzyklase-Aktivität des Rezeptors. Voraussetzung für die Bindung ist eine vorherige Oligomerisation des NPR-A, der nach Bindung eine Konformationsänderung der Kinase-ähnlichen Domäne folgt. Diese ermöglicht die Bindung von ATP an die Kinase-ähnliche Domäne in deren Folge die Guanylatzyklase-Aktivität zunimmt und die Bindungsaffinität von ANP an der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne wieder abnimmt. Die Guanylatzyklase katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG) 2, eine

Serin-Threonin-Kinase, die in zwei Isoformen beschrieben worden ist. Eine zytoplasmatische Form konnte in Kardiomyozyten, eine membrangebundene in der Niere nachgewiesen werden. Neben der PKGII-Aktivierung kommt es durch Synthese und Aktivierung der Phosphodiesterase-5 (PDE-5) zu einer Antagonisierung, die zum Abbau von cGMP führt und so vor Überstimulation schützt.

1.8.3. *Renale Effekte von ANP*

Die Niere ist eines der am besten untersuchten Zielorgane von ANP. Sie reagiert auf steigende cGMP Konzentrationen mit einer Erhöhung der GFR durch Dilatation des Vas afferens und Konstriktion des Vas efferens (Marin-Grez, Fleming and Steinhausen 1986). Dieser Effekt wird durch den auf den Glomeruli exprimierten NPR-A vermittelt (Tremblay, Gerzer et al. 1985). Die Angiotensin-2 vermittelte Reabsorption von Natrium und Wasser im proximalen Tubulus wird durch peritubuläre ANP-Stimulation inhibiert (Harris, Thomas and Morgan 1987). Juxtaglomeruläre Zellen werden durch intrarenale ANP-Injektion in ihrer Renin-Sekretion durch einen PKG-2 vermittelten Prozess gehemmt (Gambaryan, Wagner et al. 1998). Zusätzlich inhibiert ANP in der Nebennierenrinde direkt die Freisetzung von Aldosteron (Kudo and Baird 1984). Hauptsächlich wird die Natrium Reabsorption im Sammelrohr durch Inhibition des Amilorid-sensitiven ENaC gehemmt (Light, Corbin and Stanton 1990).

1.8.4. *Corin*

Corin ist eine Serinprotease, die durch proteolytische Prozessierung ANP aus seinem Vorläufermolekül Pro-ANP freisetzt (Yan, Wu et al. 2000). Im Jahr 2004 wurde Corin erstmals aus dem Herzen isoliert (Yan, Sheng et al. 1999). Corin ist ein Mosaik-Protein; es besteht aus einer Transmembrandomäne nahe des N-Terminus, zwei Frizzled-Like Domänen, acht LDL-Rezeptor Repeats, einer Scavenger-Rezeptor ähnlichen und einer Trypsin ähnlichen Domäne am C-Terminus. Ein solcher Proteinaufbau ist selten; Corin ist die einzige Serinprotease mit Frizzled-Like-Domänen, die im Allgemeinen mit der Wnt-Signalkaskade assoziiert sind. Das Corin Protein des Menschen ist für eine Serinprotease außergewöhnlich groß und umfasst 1042 Aminosäuren. Die Molekularmasse von Corin schwankt, abhängig von der Spezies (Maus, Ratte oder Mensch) aus der es isoliert wird, zwischen 150 und 200 kDa. Das humane Corin-Gen befindet sich auf Chromosom 4p12-13, besteht aus 22 Exons und hat eine Länge von

>200 Kb und ist damit eines der größten bisher bekannten Gene, welches für eine Protease kodiert. Corin wird hauptsächlich im Herzen produziert. Protein- und mRNA-Expression von Corin wurde in fetalen und adulten Kardiomyozyten detektiert; im Vorhof- stärker als im Ventrikelmyokard. In der Ratte wurde Corin mRNA außerdem in Myofibroblasten entdeckt, die am Aufbau von myokardialem Bindegewebe beteiligt sind. Corin mRNA wurde in niedrigeren Mengen auch außerhalb des Herzen festgestellt. So konnte gezeigt werden, dass Corin mRNA in der Niere, dem Knochen, der Lunge und in Haarfollikeln exprimiert wird. Mit Eintreten einer Fruchtaustragung wird Corin zudem im Uterus exprimiert und scheint wichtig für die Anpassung der Volumenregulation in der Schwangerschaft zu sein. Corin konnte hingegen nicht in anderen muskelreichen Geweben wie dem Magen, dem Dünndarm, der Harnblase oder der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden.

1.8.5. *Bluthochdruck in Corin Knock-Out (Corin^{-/-}) Mäusen*

Das ANP-System ist entscheidender Bestandteil für die Regulation und Anpassung des systemischen Blutdrucks. Mäuse, die eine ANP oder NPR-A Defizienz aufweisen entwickeln einen Bluthochdruck. Corin ist für die Pro-ANP Prozessierung verantwortlich; Corin^{-/-} Mäuse zeigen daher einen ähnlichen Phänotyp wie ANP oder NPR-A defiziente Mäuse mit Erhöhung der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte und folgender Myokardhypertrophie beider Herzventrikel (Chan, Knudson et al. 2005). Während der Schwangerschaft steigt bei Corin^{-/-} Mäusen das zirkulierende Plasmavolumen an konsekutiv auch der Blutdruck, der dann bei Hoch-Salz Diät weiter zunimmt. Neben dem Blutdruckanstieg tritt außerdem eine Proteinurie auf, so dass sich insgesamt ein der Präeklampsie ähnliches Bild ergibt (ebd.). Das Corin^{-/-} Modell zeigt, dass Corin eine entscheidende Bedeutung bei der Volumenregulation einnimmt und ein Ausfall zu einer pathologischen Volumenhomöostase führen kann, wie es auch in den PAN und anti-Thy1 GN Ratten zu beobachten ist.

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Glomeruläre Erkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, sind häufig mit einer renalen Volumenretention assoziiert. Das nephritische Syndrom ist ein klinischer Symptomkomplex mit Hämaturie und Proteinurie sowie Ödemen und arterieller Hypertonie, welches sich meist als Folge akuter Glomerulonephritiden entwickelt. Das klinische Erscheinungsbild erinnert an das nephrotische Syndrom; dieses präsentiert sich ohne Hämaturie jedoch mit stärker ausgeprägter Proteinurie. Von proteinurischen Nierenerkrankungen wie dem nephritischen und nephrotischen Syndrom wird angenommen, dass die tubuläre Proteinüberladung nicht nur Ausdruck der glomerulären Schädigung ist, sondern auch die Progression der Erkrankung vorantreiben kann. Es scheint, dass die nephrotische und nephritische Volumenretention durch primäre Veränderungen der renalen Natriumresorption verursacht sind. So konnten im Tubulusepithel nephrotischer und nephritischer Nieren Veränderungen einzelner Natriumtransporter identifiziert werden, die mit einer primären Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen können.

Um Erklärungen für den Zusammenhang zwischen Proteinurie und veränderter renaler Natriumresorption zu finden, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Erklärungsmodelle entwickelt. Sie umfassten Theorien, nach denen der Verlust der strukturierten Organisation des Zytoskeletts mit einer Beeinträchtigung der Transportvorgänge epithelialer Natriumtransporter einhergeht sollte, bis hin zu durch die glomeruläre Schädigung ausgelöste, freie Filtration von Proteasen, die eine proteolytische Aktivierung des ENaC bewirken könnten. Weitere mögliche Aspekte der Pathogenese eines gestörten Natrium- und Wasserhaushalts bei proteinurischen Erkrankungen sollen hier beleuchtet werden. Es wurde eine MicroArray[®] Analyse medullären Gewebes zweier proteinurischer Tiermodelle, der Puromycin Aminonukleosid induzierten Nephrose (PAN) und der anti-Thy1 Glomerulonephritis (GN), durchgeführt, um gemeinsame dysregulierte Mechanismen der mit einer Proteinurie assoziierten Volumenretention zu charakterisieren. Corin, eine transmembranöse Serinprotease, die Pro-ANP zum biologisch aktiven ANP konvertiert und somit den Schrittmacher des ANP-Systems darstellt, wurde in beiden proteinurischen Tiermodellen signifikant vermindert nachgewiesen. Die Hypothese

eines „aus dem Gleichgewicht geratenden“ ANP-Systems bei Proteinurie wurde in der Vergangenheit häufig für die pathologische Natrium- und Wasserretention unter Proteinurie verantwortlich gemacht. Tatsächlich zeigten proteinurische Tiere und Patienten eine ANP-Resistenz der Nieren. Gegenstand dieser Arbeit soll die Untersuchung von Corin in der Niere und Veränderungen des ANP-Systems und der ANP-Signalkaskade unter Proteinurie sein. Welche Rolle spielt Corin bei der pathologischen Natrium- und Wasserretention und wie kann dies mit einem dysbalancierten ANP-System in Zusammenhang stehen? Es wurden außerdem Corin Knockout ($\text{Corin}^{-/-}$) Mäuse untersucht, die ebenso wie PAN und anti-Thy1 GN Tiere Zeichen systemischer Volumenexpansion aufweisen. Das $\text{Corin}^{-/-}$ Modell diene dazu die Auswirkungen eines Corin-Mangels auf die tubuloepithelialen Transportvorgänge und die intrazelluläre ANP-Signalkaskade zu untersuchen. Führt ein Corin-Mangel zu Veränderungen der ANP-Signalkaskade und könnten diese mit den unter Proteinurie beschriebenen Veränderungen der renalen Natriumretention in Zusammenhang stehen?

3. Material und Methoden

Die Grundsätze der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis sind in dieser Arbeit jederzeit die Maxime wissenschaftlichen Handelns gewesen. Alle Tierversuche wurden über H. Peters, Nephrologie der Charité, nach den gültigen Regeln des Tier- und Ethikschutzes betreut.

3.1. Lösungen

Agarosegelelektrophorese-Ladepuffer, 5X

400 mM Tris-Base,
1,042% Essigsäure (v/v),
10 mM EDTA,
60% Glycerol (v/v),
0,05% Bromphenolblau Na-Salz (w/v)

Citratpuffer

1,82 mM Citronensäure-Monohydrat,
8,194 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat,
pH 7,5

Elektroelutionspuffer

25 mM Tris-Base,
192 mM Glycin,
0,025% SDS (w/v)

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-Base,
192 mM Glycin,
0,1% SDS (v/v),
pH 8,3

Elutionspuffer

200 mM NaHCO₃,
pH 9

Fixierlösung

100 mM
Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat,
100 mM Saccharose,
4% HAES (v/v),
3,24 mM
Magnesiumchloridhexahydrat,
3%PFA (v/v),

pH 7,4

Hämalaun nach MAYER

0,1% Hämatoxylin (w/v),
0,02% Natriumiodat (w/v),
5% Kalialaun (w/v),
5% Chloralhydrat (w/v),
0,1% Citronensäure-Monohydrat (w/v)

Homogenisierungspuffer

250 mM Saccharose,
10 mM TEA,
pH 7,5

Kryoschnitt-Nachfixierlösung, 800 mosm

100 mM Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat,
600 mM Saccharose,
pH 7,4

Laemli-Puffer, 2X

95 mM Tris-HCl,
2% SDS,
10% Glycerol (v/v),
5% 2-Mercaptoethanol (v/v),
0,003% Bromphenolblau (w/v),
pH 6,8

LB-Agar

1% Bacto Trypton (w/v),
0,5% Bacto Yeast Extract (w/v),
1% NaCl (w/v),
1,5% Bacto Agar (w/v)

LB-Flüssigmedium

1% Bacto-Trypton (w/v),
0,5% Hefeextrakt (w/v),
1% NaCl (w/v)

Paraffinschnitt-Nachfixierlösung, 300 mosm

100 mM Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat,
100 mM Saccharose,
0,02% Natriumacid (v/v),
pH 7,4

PBS

137 mM NaCl
11,409 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
1,764 mM KH₂PO₄, 2,683 mM KCl
pH 7,4

PBS/Glycerin

33% PBS (v/v),
67% Glycerol (v/v),
pH 8,6

SOC-Medium

2% Bacto Trypton (w/v),
0,5% Bacto Yeast Extract (w/v),
10 mM NaCl,
2,5 mM KCl,
10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄,
5 mM Glucose,
pH 7

TAE-Puffer, 1X

40 mM Tris-Base,
0,1042 Essigsäure (v/v),
1 mM EDTA

25 mM Tris-Base,
192 mM Glycin,
pH 8,3

100 mM
Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat,
100 mM Saccharose,

Transferpuffer

Vorspüllösung, 300 mosm

3.2. Versuchstiere

3.2.1. Versuchstiere für die Studien an Corin-defizienten Mäusen (Corin^{-/-})

Die Tiere (n=10) stammten von Hr. Qingyu Wu aus den USA, der uns im Rahmen einer Kooperation sowohl perfusionsfixierte als auch schockgefrorene Nieren zur Verfügung stellen konnte. Die Tiere bestanden zu je gleichen Teilen aus Corin^{-/-} und Wildtypmäusen.

3.2.2. Versuchstiere der proteinurischen Modelle PAN und anti-Thy1 GN

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten (n=30) von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) (Körpergewicht (KG) 180-200 g; Gewicht am Versuchsende ca. 260 g) durchgeführt. Die Behandlung erfolgte in Kooperation mit H. Peters. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen bei 22 bis 24°C, einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-60% gehalten. Die Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt; einer Gruppe (n=10) wurde über Injektion von anti-Thy1-Antikörpern eine akute anti-Thy1 GN induziert; Tiere der zweiten Gruppe (n=10) entwickelten nach Injektion von Puromycin ein PAN assoziiertes nephrotisches Syndrom, Tiere der dritten Gruppe (n=10) erhielten Vehikel und dienten als gesunde Kontrollen. Die Versorgung und Fütterung der Tiere erfolgte mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter (Zuchtdiät #1311, 22,5% Proteinanteil, Altromin, Lage, Deutschland) unter Standardbedingungen.

3.2.3. Induktion der anti-Thy1 GN

Die Tiere bekamen in leichter Isofluran (Curamed, Karlsruhe, Deutschland)-Narkose anti-Thy1-Antikörper, Typ OX-7 (1mg/kg KG in PBS, pH 7.5) gegen glomeruläre Thy1-Epitope, in die laterale Schwanzvene injiziert (vgl. Dechow et al. 2001; Shimizu et al. 1999). Die Antikörper stammten aus Maus-Hybridomzellen und wurden

standardisiert generiert und aufgereinigt von H. Peters, Charité Universitätsmedizin Berlin. Tiere der Kontrollgruppe (n=5) erhielten eine PBS-Injektion gleichen Volumens ebenfalls in die laterale Schwanzvene injiziert.

3.2.4. Induktion der PAN-Nephritis

Die Tiere bekamen unter leichter Isofluran-Narkose, das Aminoglykosid Puromycin (150mg/kg KG), gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, subcutan injiziert. Das Aminoglykosid Puromycin wurde über SigmaAldrich bezogen. Tiere der Kontrollgruppe (n=5) erhielten eine subcutan applizierte Menge isotonischer Kochsalzlösung gleichen Volumens.

3.2.5. Bestimmung von Trinkmenge und Urinvolumen

In metabolischen Einzelkäfigen (Metabolic Cage- 3701M081, Tecniplast, Bagagiate, Italien) wurde 24-Stunden-Sammelurin gewonnen. Bakteriellern Wachstum und dadurch verursachten Änderungen der Urinparameter wurde durch Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ 10.000 µg/ml) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) in den Röhren vorgebeugt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Trinkmengen und Urinvolumina wurden registriert. Die Urinproben wurden kurz zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und für die anschließenden Parameterbestimmungen in Stickstoff schockgefroren und bei - 20°C aufbewahrt.

3.2.6. Analyse der Plasma- und Urinparameter

Die Analyse der anti-Thy1 Versuchstieren wurde bereits in Vorarbeiten von J.Gadau publiziert (Gadau, Peters et al. 2009). Die Analyse der PAN Tiere erfolgte analog.

Um die Plasmaparameter Natrium, Kalium, Kreatinin und Harnstoff zu bestimmen, wurde den Tieren einen Tag vor und zum Ende des Experiments Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen. Die Tiere wurden dafür mit Isofluran narkotisiert.

Elektrolyte in Urin und Plasma wurden durch indirekte Ionen-selektive Elektrodenmessungen (Modular Analytics, Roche Diagnostics), Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin durch eine enzymatische und kinetische Jaffé-Methode (Modular Analytics, Roche Diagnostics) bestimmt. Kreatinin-Clearance und fraktionelle Natriumexkretion wurden berechnet.

3.3. Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung

Zur Gewinnung von Nieren-Gesamthomogenaten wurden Ratten mittels Isofluran betäubt und durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (40 mg/kg KG) (Sanofi-CEVA, Bad Segeberg, Deutschland) anästhesiert. Nach Laparotomie wurden die Nieren einzeln entnommen, die Nierenkapsel entfernt, Nieren halbiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei - 80°C. Von je 3 Tieren jeder Gruppe erfolgten zu strukturellen und immunhistochemischen Untersuchungen Perfusionsfixierungen. Dazu wurden die Tiere auf einem Präparationstisch unter einem stereotaktischen Mikroskop freipräpariert. Nach Durchführung einer medianen Laparotomie erfolgte die Trennung der Aorta abdominalis von der V. cava inferior distal der Abgänge der Arteriae (Aa.) renales. Die Aorta wurde hier mit zwei dünnen Fäden angeschlungen. Anschließend wurde die Aorta unmittelbar proximal der Bifurkation vollständig präpariert und mit einem Faden verschlossen. Die Aorta abdominalis, direkt proximal der Abgänge der Aa. renales, wurde präpariert und angeschlungen. Zur Punktion wurde der Blutfluss in der Aorta durch Anspannen der proximalen Anschlingung gestoppt, die Aorta wurde angeschnitten und mittels eines Polyethylenschlauchs punktiert. Nach Fixierung des Schlauches im Gefäß mit den beiden vorher platzierten Fäden wurde der Schlauch mit dem Perfusionssystem verbunden, der Blutfluss wurde freigegeben und die Vena cava inferior zum Druckausgleich eröffnet. Die retrograde Perfusion erfolgte zunächst für 30 Sekunden mit einer Vorspüllösung (Caco-/ Haes-(4%) Puffer [Haes, MgCl₂ 6 H₂O] 300 mosmol, pH 7,35) um Blutleere zu erzielen. Die Fixierung erfolgte mit Caco-/ Haes-(4%) Puffer mit 3% PFA bei konstantem Höhendruck von 220 cm für 5 min. Die Nieren wurden so fixiert entnommen, in Scheiben geschnitten und in Nachfixierlösungen übertragen. Gewebe für Gefrierschnitte wurde zum Schutz vor Gefrierartefakten in Sucrose/ Caco-Puffer (800 mosmol, pH 7,4) bei 4°C über Nacht belassen. In stickstoffgekühltem 2-Methyl-Butan wurden die Gewebelöcke schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

3.4. Isolation und Präparation der Plasmamembran (PM)

Die bei - 80°C gelagerten halbierten Nieren wurden in medulläre und kortikale Anteile getrennt, in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml Homogenisierungspuffer (Sucrose 250 mM, TEA 10 mM, [pH 7,5] versetzt mit Proteasen-Inhibitor [Complete,

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany] 1 Tab./50 ml) aufgenommen. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min, 1000x g, 4°C) [Tischzentrifuge Hettich, Typ 2405, Mikro 200R], das Pellet P1 verworfen und der Überstand S1 erneut zentrifugiert (30 min, 15000x g, 4°C). Das Pellet P2 wurde in 500 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen, schockgefroren und bei - 20°C aufbewahrt.

3.5. Hek-293, mpkCCD_{CL4} Zellkultur, Transfektion und Aufarbeitung

Die Zelllinie Hek293 (Human Embryonic Kidney) ist eine Zelllinie menschlicher Nierenepithelzellen. Die Zelllinie wurde unter Standardbedingungen bei 37°C, einem Luft-CO₂-Gemisch (95%/5%) und einer relativen Luftfeuchte von 95% in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5g/l Glukose enthaltend, mit 10% fötalem Kälberserum (Sigma), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) kultiviert. Die mpkCCD_{CL4} Zellen wurden ebenfalls unter oben genannten Bedingungen in einem Medium, bestehend aus gleichen Teilen DMEM und Ham's F12, 60nm Na⁺-Selenat, 5µg/ml Transferrin, 50nM Dexamethason, 1nM Triiodthyronin, 100µg/ml EGF, 5µg/ml Insulin, 2% FBS und 100µg/ml Penicillin sowie Streptomycin, kultiviert.

3.5.1. *Verwendete cDNA-Vektoren zur Transfektion*

Die im Folgenden aufgelisteten cDNA-Vektoren wurden, je nach Fragestellung, in entweder Hek293 oder mpkCCD Zellen transient transfiziert.

Tab. 1. Auflistung der verwendeten cDNA-Konstrukte.

Name	Beschreibung	Hersteller
pcDNA3.1 (mock)	Leer-Vektor	Invitrogen
pcDNA3.1-ratCorin	Vollst. Länge Ratten Corin	Qingyu Wu
pcDNA3-Zeo-hPDE5A	Vollst. Länge humanes PDE5	Prof.Gambarian
pIRES2-EGFP-rPKGII	Vollst. Länge Ratten PKGII	Prof. Kösling
pcDNA3-bPKGII	Vollst. Länge bovines PKGII	Prof. Kösling

3.5.2. *Transfektion der Hek293 und mpkCCD_{CL4} Zellen*

Als Transfektion wird die Einbringung von fremder DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet wodurch die gezielte Überproduktion von Proteinen ermöglicht wird. Die Transfektion der von uns verwendeten HEK293-Zellen wurde mittels des FuGene Transfektionskits nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.5.3. *Biochemische Aufbereitung der Zellkultur*

Die transfizierten Zellkulturen wurden von ihrer Unterlage gelöst, mehrfach in PBS, gewaschen und pelletiert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer, bestehend aus 25mM Tris-HCL [pH 7.6], 150mM NaCl, 1%NP-40, 1% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS und 5mM CaCl₂, versetzt mit Proteaseninhibitor (Roche Diagnostics), durch Ultraschallbehandlung eröffnet und anschließend bei 1000xg Zellkerne und andere schwere Zellbestandteile abzentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.6) wurde der Überstand durch Zugabe von 4x Laemmli-Puffer und 5 minütiger Denaturierung bei 96°C weiterbehandelt und zur weiteren Analyse mit einer SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt.

3.5.4. *mpkCCD_{CL4} Zellkultur*

Die mpkCCD_{cl4} Zellen wurden entweder mit 500µM IBMX (Sigma Aldrich), 100µmol 8-br-cGMP (Sigma Aldrich) versetzt, oder mit IBMX alleine für 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde ein Wechsel gegen ein FCS-Insulin-Dexamethason-freies Nährmedium vollzogen und die Zellen jeweils nach 0, 4, 8 und 24 Stunden von ihrer Unterlage abgelöst, gewaschen, in RIPA Puffer lysiert, zentrifugiert und auf eine SDS-Page aufgetragen.

3.6. **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Bestimmungen der Proteinkonzentrationen in den Gesamtnierenhomogenaten erfolgte mit einem kolorimetrischen Proteinassay (Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Grundlage ist die Biuret-Reaktion mit Reduktion von Kupfer-Ionen durch Peptidbindungen in alkalischem Milieu. Nach Inkubation der Proben bei 37°C für 60 min entstand ein rosa färbender Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur Proteinkonzentration der Ausgangsprobe anstieg (Smith, Krohn et al. 1985). Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde photometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Mit Hilfe einer linearen Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin wurde die Eichkurve erstellt.

3.7. Biochemische Analyseverfahren

3.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting

Die Auftrennung der Proteine des Nierenhomogenats wurde mittels einer SDS-Page durchgeführt. Die Proben wurden hierzu in Puffer (2% SDS, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 1% Bromphenolblau, 95 mM Tris [pH 6,8]) aufgenommen und zur vollständigen Denaturierung 3 min bei 95°C inkubiert. Die Molekülmasse wurde mit Dual Precision Marker (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) bestimmt. Verwendet wurden 8 bis 12%-ige Acrylamid-Gele, Elektrophoresekammer [Biorad, Californien, USA] und Elektrophoresepuffer (SDS 0,1%, Glycin 192 mM, Tris 25 mM [pH 8,3]). Der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte unter Kühlung durch Western-Blotting im Tank-Sandwich-System mit einem Transferpuffer. Sowohl zur Qualitätskontrolle des Blotting-Verfahrens als auch zur Beurteilung der geladenen Proteinmengen wurde eine 0,5% Ponceau Färbung mit abschließender Auswaschung mittels Aquadest vor Weiterbehandlung durchgeführt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver, gelöst in PBS, für 1 Stunde gleichmäßig inkubiert. Die folgende Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend bei 4°C über Nacht. Die Membranen wurden mit PBS/0,1%igem Tween (pH 7,5) sowie abschließend mit reinem PBS gewaschen und im Folgenden mit einem Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (1:3000) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden erneut gewaschen und 1 min mit Luminol (Reagenz, ECL, Amersham, Freiburg) benetzt. Das Luminol wird im alkalischen Milieu durch die an den Sekundärantikörpern gekoppelte Peroxidase oxidiert und damit unter Lichtemission in einen energetisch niedrigeren Zustand versetzt. Die Autoradiographiefilme (Hyperfilm ECL) wurden in einer Dunkelkammer belichtet und entwickelt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit Bio-ID-Software (BIO-PROFIL Bio-ID image software; Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich). Alle Werte wurden auf β -Aktin normalisiert.

3.8. Real-Time quantitative PCR

3.8.1. mRNA Isolierung

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit Hilfe eines Kits (RNeasy Mini Kit) nach Anleitung des Herstellers. Es folgte ein 15-minütiger Verdau mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe, 2,27 U/ μ l) auf der Extraktionssäule um sicherzustellen, dass sich nach der *in vitro* Transkription in den Proben neben der synthetisierten cDNA keine genomische DNA befindet. Die Elution der mRNA erfolgte mit 30 μ l RNase freiem Wasser mit abschließender photometrischer Konzentrationsbestimmung (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg).

3.8.2. Reverse Transkription – cDNA Synthese

Die reverse Transkription der RNA, schematisch dargestellt in Abb. 1, erfolgte mit Hilfe eines cDNA-Synthese-Kits (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for reverse transcription-PCR, Invitrogen, Karlsruhe). In einem 20 μ l Ansatz wurden ca. 0,8 μ g RNA, 0,5 μ g Oligo dT Primer Mix und 10 mM dNTPs 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden 20% 5x RT-Puffer, 0,1 mM DTT, 1 μ l RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, 40 U/ μ l) hinzugegeben und der Ansatz für 2 min auf 42°C erwärmt. Die reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 1 μ l reverser Transkriptase (SuperScript™, 50 U/ μ l) für 50 min bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C. Die Konzentrationen der so erhaltenen cDNA Proben wurden photometrisch bestimmt, anschließend erfolgte die Abkühlung auf Eis und schließlich Lagerung bei -20°C.

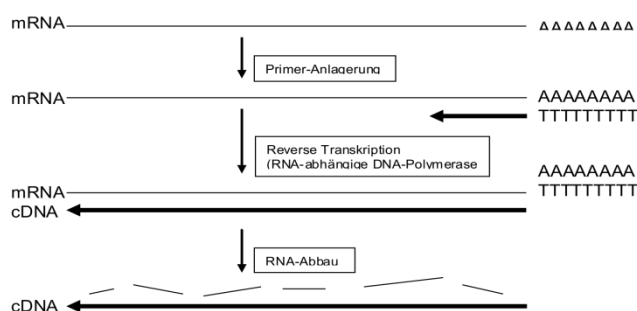


Abb. 1. Graphische Darstellung der *in vitro* cDNA Synthese. Zunächst werden Oligo(dT)-Primer an die mRNA angelagert und anschließend transkribiert die reverse Transkriptase die RNA-Vorlage in komplementäre cDNA. Die so gewonnene cDNA kann so z.B. für Klonierungen, PCR oder RNA-Sequenzierung Verwendung finden.

3.8.3. Durchführung der TaqMan® Real-Time-PCR Reaktion

Es wurden TaqMan®-Genexpressions-Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zur Analyse der Zielgene Corin (Rn00711035_m1) und ANP (Rn00561661_m1) und des Referenzgens GAPDH verwendet. Die Proben wurden in 15 µl-Triplets aufgetragen. Der Reaktionsansatz bestand aus 50% 2x TaqMan® FAST Universal PCR Master Mix, 5% [v/v] 20x TaqMan® Gene Expression Assay Mix, 5% [v/v] 20x TaqMan® Gene Expression Assay Mix [*GAPDH*], ca. 0,1 µg cDNA) und durch Klebefolie vor Verdunstung geschützt. Die Proben wurden in 45 Zyklen mit 3 Sek. Denaturierung bei 95°C und 30 Sek. Annealing und Elongation bei 60°C vervielfältigt (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Gensonden waren neben den Reporterfluoreszenzfarbstoffen FAM (6-Carboxyfluoreszin, Emission bei 518 nm [grün]) und VIC (geschützter Markenfarbstoff von Applied Biosystems für *Gapdh*, Emission bei 550 nm [grün]) auch mit einem Quencher, TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, Emission bei 582 nm [gelb]), markiert. Als passiver Referenzfarbstoff diente ROX (6-Carboxy-X-rhodamin, Emission bei 602 nm [orange]) zum Herausmitteln eventueller Pipettierfehler. Nach Anregung bei 488 nm (blau) erfolgte am Ende jedes Zyklus die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe der Applied Biosystems Sequence Detection Software. Für Referenz- und Zielgen wurden pro Probe *Crossing point* (Ct)-Werte ermittelt. Sie geben denjenigen PCR-Zyklus an, bei dem eine definierte Fluoreszenzschwelle in der exponentiellen Phase der cDNA-Synthese überschritten wird. Datenquantifizierung und Auswertung erfolgten mit Hilfe von Applied Biosystems Sequence Detection Software und Microsoft Excel unter Verwendung der komparativen $\Delta\Delta_{Ct}$ -Methode ($2^{-\Delta\Delta_{Ct}}$).

3.9. Transkriptomanalyse mittels DNA MicroArray

Das Ziel einer DNA Microarray Analyse ist die Ermittlung von Genen, die in einem betrachteten Tiermodell verändert sind. Dazu werden viele tausend Oligonukleotid-Proben (Gen-Datenbank) mit der zu testenden RNA der Versuchstiere hybridisiert, um über Fluoreszenz-Quantifizierung und statistische Analyseverfahren Rückschlüsse auf deren Transkriptionsraten zu schließen. Dazu wurde in unserem Fall das Nierenmark von jeweils vier Tieren einer Versuchsgruppe (n=4), also jeweils der

PAN, der Thy1 und der Kontrolltiere gepooled, so dass drei RNA-Transkriptome hybridisiert wurden. Dafür erfolgte zunächst eine Gesamt-RNA-Extraktion mit anschließender Quantifizierung durch UV-Spektroskopie und einer abschließenden Qualitätskontrolle über Analyse auf einem LabChip (Agilent Technologies, Böblingen). Danach wurden 3 mg RNA in cDNA umgeschrieben und zur Herstellung Biotin-markierter cRNA benutzt. 15 µg fragmentierter cRNA wurden mit dem Rattengenom-Oligonukleotid-Microarray Rat-Genome 230 2.0 Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für 16 h bei 45°C hybridisiert. Die Hybridisierung und photometrische Auswertung sowie Datenverarbeitung wurde von Frau Dr. Ute Ungethüm, Multiuser Facility Labor für funktionelle Genomforschung der Charité, durchgeführt.

Bearbeitung der Rohdaten der Genexpression erfolgte mit der Software Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) nach Empfehlung des Herstellers. Für die Intensitätsinformation jedes zu untersuchenden Oligonukleotids wurden Textdateien exportiert und in der NCBI-Datenbank der Genexpressionsdaten (GEO, Zugangsnummer GSE 7103) hinterlegt. Die Normierung der Daten berücksichtigte die Variabilität der Hybridisierung der Probenpaare und andere Hybridisierungsartefakte. Sie bestand aus drei Schritten: zuerst erfolgte die Datentransformation (Messungen der Sets weniger als 300 bis 300), dann die Normierung pro Chip (jeder Chip wurde auf die 50. Perzentile normiert) und zuletzt die Normierung pro Gen (jedes Gen wurde auf den Median der Messungen dieses Gens normiert).

3.9.1. *Polymerase-Kettenreaktion*

Zur Feststellung der cDNA Güte wurde eine Kontroll-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Primern für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase durchgeführt unter der Annahme, dass es sich hierbei um ein unverändertes Referenzgen handelt. Der jeweilige Reaktionsansatz bestand aus:

2,5µl 10x Reaction-Buffer coloured for Mango-Taq® Polymerase
0,5µl 20pM Primer-forward (5'-tat ccg ttg tgg atc tga c-3', TIB MOLBIOL, Berlin)
0,5µl 20pM Primer-reverse (5'-tgg tcc agg ggt ttc tta c-3', TIB MOLBIOL, Berlin)
3µl 10mM dNTP-Mix
1µl 10mM Magnesiumchlorid
2,5µl cDNA
0,5µl Mango-Taq® Polymerase (5 U/µl)
14,5µl Aqua bidest.

Die PCR wurde mit einem Thermocycler (Primus 96 plus, MWG-Biotech, Ebersberg) nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema durchgeführt.

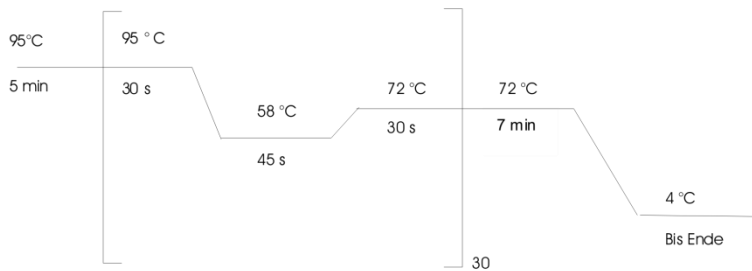


Abb. 2. Graphische Darstellung des Temperaturverlaufes eines PCR Zyklus. Nach Aufschmelzen der DNA Stränge und Zufuhr der DNA Polymerase wurde das eigentliche Amplifizierungsprogramm gestartet. Dafür wurde der Reaktionsansatz auf 58°C abgekühlt, um eine Anlagerung des Enzymes zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz auf 72°C erwärmt und für 30s inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Amplifikation der DNA. Nach den 30s wurden die entstandenen DNA Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C getrennt und ein neuer Zyklus wurde begonnen. Nach 30 Zyklen schloss sich eine 7-minütige Phase bei 72°C an in welcher eine Polyadenylierung stattfand. Die Proben wurden auf 4°C gekühlt.

Die PCR-Produkte wurden in 5x Agarosegelelektrophorese-Ladepuffer auf ein 1,5% Agarosegel mit 0,008% (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen. Als Referenz diente eine DNA-Leiter (Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix, Fermentas, St. Leon-Rot) mit Produkten bekannter Basenpaarlängen. Die Elektrophorese lief 60 min bei 90 V in 1X TAE-Puffer bis zur ausreichenden Probenauftrennung. Abschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert (Alphalmager, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

3.10. Morphologische Analyse

3.10.1. Immunhistochemische Analyse

Gefrierschnitte von 5 µm Dicke wurden auf Chromgelatine-beschichtete (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haën) Objektträger aufgebracht, für eine Stunde luftgetrocknet, 30 min in PBS/ Triton (0,5%) behandelt, mit Blocking-Medium (5% Magermilchpulver/PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer belassen und anschließend mit den unten angegebenen Primärantikörpern für 1 Stunde unter konstanter Bewegung auf einem 3D-Schüttler bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Den Waschsritten in PBS zur Entfernung ungebundener Primärantikörper folgte für eine weitere Stunde die Inkubation mit Sekundärantikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland; Cy-2 oder Cy-3), die direkt

fluoreszenzmarkiert waren. Nach letztmaligem Waschen erfolgte die Eindeckelung unter Verwendung von PBS/Glycerin. Die qualitative Auswertung erfolgte nach Signalintensität bzw. Signalabwesenheit. Kernfärbungen erfolgten mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI); Zellkerne wurden blau angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Konfokalmikroskop der Firma Leica (TCS SP-2, Leica Microsystems).

3.11. Verwendete Antikörper

Tab. 2. Verwendete Primärantikörper für Western Blot sowie Immunhistochemie.

Antikörper	Host	Mono/Polyklonal	Hersteller
anti- rat Corin - H11	Maus	Monoklonal	Polzin et al., Berlin
anti- rat Corin - 3	Meerschweinchen	Polyklonal	Pineda AG, Berlin
anti- His-Tag	Ratte	Polyklonal	MoBiTec, Göttingen
anti- rat Pro-ANP	Kaninchen	Polyklonal	Abcam, USA
anti- human/rat ANP	Kaninchen	Polyklonal	Phoenix Pharma., USA
anti- rat b-Actin AC15	Maus	Monoklonal	Sigma Aldrich, USA
anti- rat a-ENaC	Kaninchen	Polyklonal	Pineda AG, Berlin
anti- rat b-ENaC	Kaninchen	Polyklonal	Pineda AG, Berlin
anti- rat g-ENaC	Kaninchen	Polyklonal	Pineda AG, Berlin
anti- Na/K ATPase	Maus	Monoklonal	Upstate Biotechn., USA
anti- mouse PDE5	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Techn., USA
anti- rat NKCC2 2.1	Meerschweinchen	Polyklonal	Pineda AG, Berlin
anti- rat AQP2	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz Biotechn., USA
anti- human Akt	Maus	Monoklonal	Cell Signaling Techn., USA
anti- human WNK1	Kaninchen	Polyklonal	Biomol GmbH, Hamburg
anti- human WNK4	Kaninchen	Polyklonal	Biomol GmbH, Hamburg
anti- phospho SGK1	Kaninchen	Monoklonal	Epitomics Inc., USA
anti- Nedd4-2	Kaninchen	Polyklonal	Millipore Inc., USA
anti- PKGII	Kaninchen	Polyklonal	Prof. Gambarian,
anti- phospho PDE5	Kaninchen	Polyklonal	Prof. Kössling, Bachmann

Die Antikörper waren mit Ausnahme der beiden selbst hergestellten anti-Corin-Antikörper bereits im Einsatz und gut validiert. Einzig die individuellen Versuchsverdünnungen galt es zu bestimmen.

3.12. ANP-ELISA zur Gewebemessung in PAN und anti-Thy1 GN Ratten

Ein ELISA (enzyme linked immunosorbent Assay) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Substanzen, wie z.B. Proteinen und Hormonen, mittels

enzymatischer Farbreaktion. Zur Bestimmung der Gewebekonzentrationen an ANP in PAN, GN und gesunden Kontrollen wurde der käufliche ratANP ELISA von Assaypro verwendet. Das Testprinzip ist ein Sandwich-ELISA, bei dem der spezifische, polyklonale ratANP-Antikörper auf einer Mikroplatte beschichtet und damit immobilisiert wurde. Nach Zugabe von Standard und Gewebeproben wurde ein zweiter, diesmal biotinylierter polyklonaler anti-ratANP-Antikörper, hinzugegeben und nach Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase Konjugates dessen Substrat sichtbar gemacht. Ungebundene Antikörper sowie Gewebeproben wurden durch Waschschriffe entfernt. Nach Abstoppen der Farbreaktion wurde die photometrische Messung bei 543nm durchgeführt. Die ANP-Konzentrationen im Gewebe wurden anschließend stöchiometrisch anhand einer logarithmischen Eichkurve berechnet.

3.13. Herstellung des monoklonalen anti-Corin-Antikörpers

3.13.1. Expression des rekombinanten Antigens in *E. Coli*

Für die Expression des rekombinanten N-Terminus von Corin als Antigen zur Immunisierung der Mäuse wurde ein pGEX-4t-1 Klonierungssystem genutzt (Amersham Pharmacia, Freiburg, mit Glutathion-S-Transferase, GST). Dafür wurde der ausgewählte Ziel-Abschnitt der DNA mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wiesen außer der spezifischen cDNA Sequenz noch Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamH1 und Xho1 auf, die sich ebenfalls im pGEX Vektor befanden und nach Linearisierung der amplifizierten cDNA und des Vektors, nach Restriktionsverdau, eine erfolgreiche Ligation ermöglichten.

Tab. 3. Verwendete Primer zur Klonierung des rekombinanten Antigens.

Bezeichnung	Sequenz
Corin pGEX forward	5'-GAT GAA TTC ATG GGC AGG GTT TCT TTC AAC-3'
Corin pGEX revers	5'-GAT GCG GCC GCT AGC AAA TTT GCT GTC ACC AG-3'

Es schloss sich eine Transformation in kompetente *E. Coli* XLblue Zellen (Stratagene, La Jolla, CA, USA) an. Nach Anzucht auf LB-Agar-Platten über Nacht wurden mittels X-Gal Selektion positive Klone ermittelt und in 4 ml mit Ampicillin (2µg/ml) versetztem

Flüssigmedium angezchtet und die Plasmide anschließend mit Hilfe eines Kits (NucleoSpin®Plasmid Kit, Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Es schloss sich ein Testverdau mit den zur Ligation verwendeten Restriktionsendonukleasen und Auftrennung der cDNA durch Elektrophorese an. Bakterielle Klone, die das cDNA Fragment der korrekten Größe aufwiesen wurden einer abschließenden Prüfung durch Sequenzierung (Meixner GmbH, Berlin) unterzogen. Der ausgewählte fehlerfreie Klon wurde in, auf Proteinexpression spezialisierte, E.Coli Bakterien (BL21, Stratagen) transformiert und danach in Flüssigmedium auf eine optische Dichte von 0,4 bis 0,6 (gemessen bei 600nm) hochgezogen. Durch Induktion des im pGEX Vektor vorhandenen LacI-Operon mit 0,1 mM IPTG (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde die Proteinproduktion in den E.Coli Bakterien bei 30°C für 5-6 Stunden induziert. Die Isolation der Proteine erfolgte nach Zugabe von PBS, versetzt mit 2 mM EDTA (Serva, Heidelberg) und 1 mM PMSF (Carl Roth, Karlsruhe), zur Inhibition der in den Bakterien endogen vorhandenen Proteasen, durch Aufspaltung der Bakterien mittels Ultraschall und anschließender Inkubation für 30 Minuten in PBS/Triton (1%). Die Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch mit einer Glutathion-Agarose-Säule (Sigma-Aldrich, München) nach den Angaben des Herstellers, die Elution mit 10mM Glutathion. Vor Verwendung des so gewonnenen rekombinanten Proteins zur Immunisierung der Mäuse erfolgte sowohl eine Dialyse gegen PBS bei 4°C über Nacht, um das für die Tiere toxische Glutathion aus dem Eluat zu entfernen, als auch eine Elektroelution zur Isolation des rekombinaten N-Terminus Corins als Antigen zur Immunisierung und Vermeidung von Ko-Immunisierung mit endogenen E.coli Proteinen, die fälschlicherweise an die Glutathionsäule gebunden haben. Zur Elektroelution wurde das Dialysat auf eine SDS-Page geladen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die spezifische Bande wurde ausgeschnitten, zerkleinert und in Elektroelutionspuffer bei 100V über Nacht bei 4°C in einer Biotrap®-Kammer (Schleicher & Schuell, Dassel) zur Isolation belassen.

3.13.2. Immunisierung der Tiere

Die Immunisierung von vier Balb/C Mäusen erfolgte durch fünf subkutane Injektionen, innerhalb von 17 Tagen, einer Emulsion von entweder „Freund's Complete Adjuvans“ (1.Gabe), „Freund's Incomplete Adjuvans“ (2.Gabe) oder PBS (3.-5. Gabe), mit jeweils 15µg des Immunogens (N-Terminus von Corin) in den Fuß. Die Applikation des

Immunogens versetzt mit „Freund's Adjuvans“ stellt eine ausreichende Immunantwort sicher, da es sich hierbei um eine Öl-Wasser-Emulsion mit hitzeinaktivierten Tuberkelbakterien (*Mykobacteriae tuberculosis*) handelt. Außerdem enthält das Freund-Adjuvans nicht verstoffwechselbares Mineralöl, das eine Depotwirkung ermöglicht und Arlacel A als Emulgator, um die Öl-Wasser-Emulsion stabil zu halten. Die Aufbereitung des Adjuvans erfolgte sorgfältig nach den Angaben des Herstellers

3.13.3. Kultivierung von Myelomzellen

Die Zellfusion wurde mit den Sp2/0-Maus-Myelomzellen durchgeführt, die, mit Standardmedium bei 37°C in Kultur genommen, zur Proliferation angeregt wurden. Am Vortag der Hybridoma-Bildung wurden peritoneale Makrophagen mittels einer 0,34 Mol Sucrose-Ausspüllösung isoliert und in Hybridoma-Medium aufgenommen.

3.13.4. Zellfusion von Myelomzelle und B-Zelle (Maus) zur Hybridomzelle

Nach Tötung einer immunisierten Maus, mittels zervikaler Dislokation, wurde diese, zur Sterilisation, in Ethanol getaucht. Anschließend wurden unter der Sterilbank die poplitealen Lymphknoten entfernt und in RPMI-Medium überführt. Mit zwei sterilen Nadeln wurden vorsichtig die Zellen in den Lymphknoten herausgelöst und die so gewonnene Zellsuspension, überführt in ein Zentrifugenröhrchen, für fünf Minuten stehen gelassen, bis sich die größeren Partikel abgesetzt hatten, so dass 40ml Überstand wiederum in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert und schließlich in RPMI Medium resuspendiert werden konnten.

Parallel dazu wurden die Sp2/0-Maus-Myelomzellen geerntet, um sie anschließend mit den Lymphknoten-Zellen im ungefähren Verhältnis von 1:3 in einem Zentrifugenröhrchen zu vereinigen und abzuzentrifugieren (225 x g, 10 min). Der Überstand wurde komplett abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig in 400µl RPMI gelöst. Nun erfolgte die Fusionierung durch Zugabe von 600µl PEG (Polyethylenglykol) und anschließende erneute Zentrifugation (1200xg, 5 min). Nach Abnahme von 500µl Überstand wurde vorsichtig im Wechsel 5ml RPMI und 10ml HAT-Medium hinzugegeben, um die Fusionsreaktion zu beenden. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen (1200xg, 10 min.) wurden die Zellen im Sediment in 200ml HAT-Medium resuspendiert und in 10 sterile 96-Flachlochplatten ausplattiert.

3.13.5. Kultivierung der Hybridomzellen

Nur fusionierte Zellen überlebten und vermehrten sich im HAT-Medium, so dass nach 10 bis 14 Tagen Klone dieser Zellen sichtbar wurden. Um die Zelltrümmer unfusionierter B-Zellen bzw. Myelomazellen abzuräumen, wurden den Zellkulturen aus Mäusen gewonnene Peritonealmakrophagen zugesetzt. Nach 14 Tagen konnte auf ein HT-Medium, nach weiteren 7 Tagen auf ein Standard-Medium umgestellt werden.

3.13.6. Spezifitätskontrolle der einzelnen Klone

Um die Antigenität der Klone auf Corin zu testen wurden ELISA Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde zum einen die Antigenität gegenüber Corin, zum anderen gegenüber GST, als Kontrollprotein, ermittelt. Diejenigen Klone, die eine möglichst hohe Spezifität aufwiesen, wurden anschließend methodisch durch Immunhistochemie und Western Blot getestet. Vor Durchführung des ELISA wurden 96-Lochplatten über Nacht mit dem zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Corin in einer Konzentration von 1µg/ml beschichtet. Nach dreistündiger Inkubation mit Zellkulturüberstand wurde drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend eine Inkubation mit HRP gekoppeltem Sekundärantikörper anti-Maus IgG für eine Stunde durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper geschah chromatogen. Nach durchschnittlich 30 Minuten unter Rotation war die Farbreaktion abgeschlossen. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 582nm mit anschließender stöchiometrischer Auswertung. Positive Klone wurden weiter in Kultur gehalten.

3.14. *In situ* Hybridisierung

3.14.1. cDNA Generierung

Die verwendete cDNA zur Generierung der Riboproben für die *In situ* Hybridisierung wurde mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning Kits (Invitrogen) in den TOPO pcDNA II Vektor kloniert. Dazu wurde zunächst eine PCR, wie unter 4.9.1 beschrieben, mit den unter Tab. 4 aufgeführten Primern durchgeführt.

Tab. 4. Verwendete Primersequenzen zur cDNA Generierung.

Bezeichnung	Sequenz
ANP-forward	5'-TAC GAA TTC CAT GGG CTC CTT CTC CAT C-3'
ANP-revers	5'-TAC GGA TTC TTA TCT TCG GTA CCG GAA GC-3'

Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels Elektrophorese aufgetrennt, das Amplifikat der korrekten Basengröße ausgeschnitten, aus dem Gel mit Hilfe eines Kits (Qiagen Gel Extraktion Kit, Qiagen, Hilden), eluiert und anschließend nach Angaben des Herstellers mit dem TOPO pcDNAII Vektor kloniert und auf einer 50mg/ml LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Ligation wurden ca. 50ng Insert-DNA verwendet. Die gewachsenen Klone wurden unter Selektionsdruck von 50mg/ml Ampicillin in 5ml LB-Flüssigmedium angezüchtet, aufgereinigt (Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) und anschließend mittels der Restriktionsendonukleasen BamH1 und Not1 nacheinander verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen und anhand der korrekten Größe der Schnittprodukte die erfolgreiche Ligation nachgewiesen. Abschließend erfolgte eine DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode bei M.Meixner, CyanoBiotech, Berlin. Die Plasmid-DNA lag nun flankiert durch die Promoterstellen T7 und Sp6 vor, wurde mit der Restriktionsendonuklease Xho1 linearisiert und anti-Sense-Riboproben durch anti-Sense-Sp6 RNA-Polymerase und Sense-Riboproben durch Sense-T7 RNA-Polymerase generiert.

3.14.2. Transformation

Die generierte Plasmid-DNA zur Herstellung der Riboproben für Pro-ANP wurde durch Hitzeschock (42°C für 45 Sek.) in BL21-kompetente E.coli Zellen transformiert. Ansätze von 500 µl wurden 50 min bei 37°C in SOC-Medium inkubiert, auf 37°C erwärmtes LB-Agar gegeben und 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen. Ampicillinresistenz diente zur Selektion transformierter Zellen. Ein gewachsener Klon wurde in 200ml LB-Medium für weitere 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank zur Vermehrung angeregt und die folgende Plasmidisolierung erfolgte mit einem Kit (Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

3.14.3. In-vitro-Transkription

Für alle Versuche wurden Antisense- und Senseproben generiert, Antisense-Proben dienten dem Nachweis zellulärer mRNA durch Hybridisierung, Sense-Proben als Kontrollsonden. Jeder Transkriptionsansatz, bestehend aus 1 µg Restriktionsfragment bzw. 0,2 µg PCR-Produkt der entsprechenden DNA in 14 µl Diethyl-Pyrocyanat

(DEPC, Sigma) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix, Roche Diagnostics, Mannheim), 1 µl RNase Inhibitor (Fermentas) und 2 µl RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim), wurde 2¼ Stunden bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde zweifach mit Natrium-Acetat (pH 6,0) und Ethanol (100%) bei - 20°C gefällt, mit Ethanol (80%) gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Qualitätsbestimmungen der Transkriptionsprodukte erfolgten durch Agarosegel-Elektrophorese, der RNA-Quantifizierung dienten photometrische Messungen.

3.14.4. Hybridisierung

Paraffinschnitte von 5 µm Dicke wurden in einer absteigenden Xylol-Ethanolreihe (Xylol 100% 2x 10min, Ethanol 2x 100%, 2x 96%, 1x 80%, 1x 70% je 5 min) entparaffiniert, in eisgekühltem Paraformaldehyd (4% in PBS, pH 7,4, 20 min) nachfixiert, in PBS gewaschen, in 0,2 M HCl 20 min denaturiert, wieder in PBS gewaschen und mit Proteinase K [Roche Diagnostics, Mannheim] in PBS 30 min bei 37°C angedaut. Es folgten Nachfixierung in Paraformaldehyd (4% in PBS, pH 7,4, 5 min), Waschschrte in PBS und Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96% Ethanol, jeweils 5 min). Die Schnitte wurden 20 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, 2 Stunden mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [Sigma], 40% DEPC-H₂O mit 2,5x Denhardt's Lösung (50x = 0,5 g Ficoll 400, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g BSA [alles Sigma] ad 50 ml DEPC-H₂O), 40 mM Tris-HCl [pH 7,4], 25 mM EDTA [pH 8,0], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ml t-RNA [Roche Diagnostics] bei 40°C in einer feuchten Inkubationskammer überschichtet und mit Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 40% DEPC-H₂O mit 10% Denhardt's Lösung, 1 mM EDTA [pH 8,0], 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 5 mg/ ml t-RNA, 330 mM NaCl, 1 mg/ml Heringssperma-DNA, 200 mM Dithiothreitol, 10% Dextransulfat, 6-12 pg Digoxigenin-markierter Riboprobe) für 18 Stunden bei 40°C inkubiert.

3.14.5. Entfernen nicht hybridisierter Riboproben

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte für 30 min bei 40°C in Formamid (50%) in 2x Standard Sodium Citrat (2x SSC=18% NaCl, 15% Na-Citrat) überführt und anschließend in SSC gewaschen (1x 30 min 2x SSC [40°C], 2x 15min 2x SSC, 2x 15

min 1x SSC, Raumtemperatur).

3.14.6. Detektion der hybridisierten Riboproben

Die Schnitte wurden 10 Minuten in Puffer 1 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5), 30 Minuten in Blockier-Medium (1% Blocking Reagenz [Roche Diagnostics], 0,5% bovines Serumalbumin, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur und schließlich mit einem AP-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper [Dako, 1:50] in Blocking-Medium als Lösungsmittel überschichtet. Es fand eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und über Nacht, bei 4°C gelagert, statt. Waschschritten mit Puffer 1 und Puffer 3 (100 mM Tris-HCL [pH 9,5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) folgte die enzymatische Farbentwicklung mit Entwicklungspuffer (Nitroblau Tetrazolium [Roche], 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat [BCIP, Roche] als Substrat der AP, sowie zur Hemmung endogener Phosphatasen Levamisol [Sigma] gelöst in Puffer 3, pH 9,5) unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und 4°C. Nach 2 Stunden erfolgte die Signalgeneration durch Spülen der Schnitte in Puffer 4 (100 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0) und PBS. Die Prozessierungsschritte erfolgten für alle Schnitte zeitgleich unter standardisierten Temperaturen sowie Expositions- und Entwicklungszeiten. Die Schnitte wurden mit 50% Glycerin [Merck, Darmstadt]/PBS eingedeckelt und unter Interferenzkontrast mit einem Leica DMRB Mikroskop ausgewertet.

3.15. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit SPSS Version 12.0 ausgewertet. Als Lagemaß ist der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) angegeben; als nicht-parametrisches Testmittel der Mann-Whitney-Test. Als signifikant angegeben sind $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (†).

4. Ergebnisse

4.1. Klinische und laborchemische Analysen

Männliche Wistar-Ratten (n=30) wurden in drei Gruppen randomisiert. In der ersten Gruppe (n=10) wurde durch Injektion von anti-Thy1-Antikörpern eine akute anti-Thy1 GN induziert, Tiere der zweiten Gruppe entwickelten nach Injektion des Aminoglykosids Puromycin ein PAN-assoziiertes nephrotisches Syndrom und Tiere der dritten Gruppe dienten als gesunde Kontrollen. Die Messungen aller Parameter fanden vor und nach Induktion der anti-Thy1 GN bzw. des PAN-assoziierten nephrotischen Syndroms statt (Messzeitpunkt I bzw. II). Es werden nur die Werte nach Induktion (Messzeitpunkt II) angegeben, da keine Unterschiede zwischen den gesunden Gruppen festgestellt wurden.

4.1.1. Klinische Parameter

Für jedes Tier wurde die Trinkmenge sowie das ausgeschiedene 24-Stunden-Urinvolumen in metabolischen Käfigen bestimmt. Für beide Parameter wurden keine Unterschiede festgestellt. Auf das Körpergewicht zeigte die Induktion der anti-Thy1 GN keinen Einfluss, im Gegensatz dazu stieg das Körpergewicht der PAN Ratten in Folge starker Aszitesbildung signifikant an, dargestellt in Tab. 5.

4.1.2. Plasmaparameter

Im Blutplasma der Tiere mit anti-Thy1 GN und PAN wurden keine Veränderungen der Elektrolyte Natrium und Kalium festgestellt. Dagegen waren die Parameter Kreatinin und Harnstoff signifikant erhöht (Tab. 5).

4.1.3. Renale Funktionsparameter

Die Kreatinin-Clearance war bei den Tieren mit PAN und anti-Thy1 GN signifikant reduziert. Die fraktionelle Natriumausscheidung war nur bei den PAN Tieren signifikant reduziert. Tiere mit anti-Thy1 GN wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

4.1.4. Urinparameter

In 24-Stunden-Sammelurin wurden die Konzentrationen von Natrium und Kalium bestimmt und auf absolute Werte berechnet. Nach Induktion schieden die behandelten Tiere im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant kleinere Mengen aus. Die glomeruläre Schädigung widerspiegelnd entwickelten sowohl die PAN als auch die anti-Thy1 GN Tiere eine signifikante Proteinurie (Tab. 5).

Tab. 5. Klinische und laborchemische Parameter von gesunden Kontrollratten und Ratten mit anti-Thy1 GN/PAN [MW ± SD, p<0,05 *; p< 0,01 #; p<0,001 †].

	Kontrollen	anti-Thy1 GN	PAN
<u>Klinische Parameter</u>			
Körpergewicht (Messzeitpunkt I) (g)	121.85 ± 2.30	121.57 ± 3.03	121.64 ± 2.40
Körpergewicht (Messzeitpunkt II) (g)	264.88 ± 10.77	258.68 ± 17.10	288.91 ± 12.89
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122.33 ± 3.10	122.32 ± 3.96	-
Trinkmenge (ml)	34.60 ± 10.69	36.90 ± 14.08	36.47 ± 13.02
Urinvolumen (ml)	17.19 ± 4.17	20.01 ± 13.25	21.63 ± 6.82
<u>Plasmaparameter</u>			
Kreatinin (mg/dl)	0.17 ± 0.03	0.36 ± 0.13 †	0.53 ± 0.2 †
Harnstoff (mg/dl)	38.34 ± 6.14	79.42 ± 16.32 *	196.84 ± 88.65 *
<u>Funktionelle Parameter</u>			
Kreatinin-Clearance (ml/min*g KG)	3.91 ± 2.89	2.31 ± 0.43 *	1.14 ± 0.06
Fraktionelle Natriumexkretion	0.22 ± 0.03%	0.18 ± 0.02%	0.07 ± 0.02% #
<u>Urinparameter</u>			
Protein (mg/24h)	15.07 ± 5.86	156.13 ± 64.11 †	539.3 ± 99.0 †

4.2. Verifikation des anti-Corin-Antikörpers

Es wurde ein monoklonaler anti-Corin-Antikörper aus der Maus produziert und mit vier unterschiedlichen Methoden verifiziert. Zunächst wurden Hek-293 Zellen mit einem Corinkonstrukt oder einem Mock-Konstrukt (Negativ-Kontrolle) transfiziert und so die Spezifität des Antikörpers im Western-Blot überprüft. Der Antikörper generierte eine

Signalantwort bei ca. 160 Kilodalton (kDa) (theoretisches Molekulargewicht 158,32 kDa) - die Negativkontrolle zeigte keine Signalantwort. Im Gegensatz dazu zeigte die mit einem validierten anti-His-Tag-Antikörper durchgeführte Positiv-Kontrolle eine Signalantwort bei ca. 160 kDa.

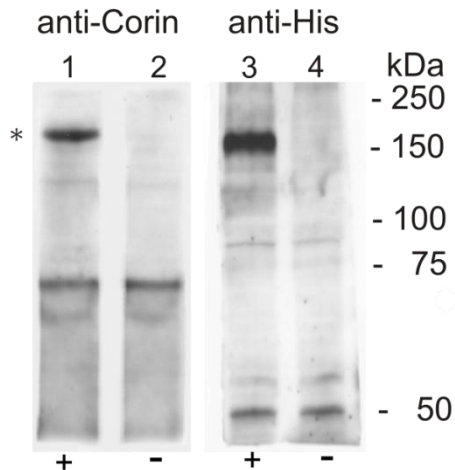


Abb. 3. Verifikation des monoklonalen anti-Corin-Antikörpers mittels Western-Blot. Auf Bahn 1 und 3 aufgetragenes Corin-transfiziertes Zellhomogenat und auf Bahn 2 und 4 aufgetragenes Mock-transfiziertes (Neg.-Kontrolle) Zellhomogenat jeweils inkubiert mit anti-Corin-Antikörper (1 und 2) und anti-His-Antikörper (3 und 4). Beide zeigen eine starke Bande bei ca. 160kDa. Keine detektierten Banden bei der Negativkontrolle.

Der anti-Corin-Antikörper wurde zudem immunhistochemisch verifiziert. Hierzu wurden die transfizierten Hek-293 Zellen (s.o) mit dem anti-Corin-Antikörper und als Positivkontrolle mit dem anti-HisTag-Antikörper inkubiert.

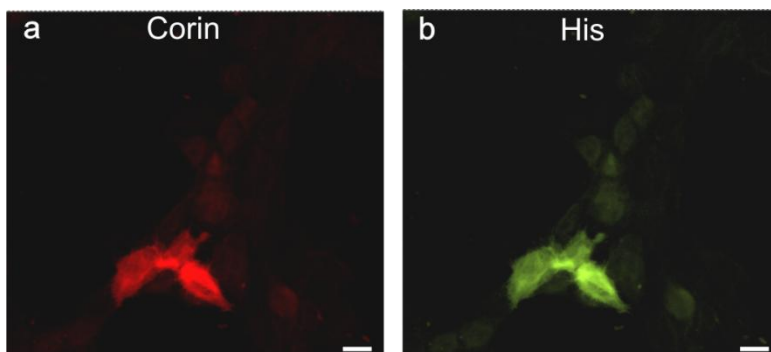


Abb. 4. Verifikation des monoklonalen anti-Corin-Antikörpers mittels Immunfluoreszenz. Doppelmarkierung von anti-Corin-Antikörper (rot, a) und anti-His-Antikörper (grün, b) auf fixierten Hek 293 Zellen, transient transfiziert mit einem full-length-Corin/His-Tag Konstrukt. Alle nicht transfizierten Zellen, also jene, die kein Plasmid aufgenommen haben, zeigen weder Signalantworten in (a) noch in (b) und dienen damit als Negativ-Kontrolle. [Kalibrationsbalken \cong 10 μ m].

Zur in vivo Verifikation des Antikörpers wurde Herzvorhof-Gewebe mit dem

anti-Corin-Antikörper inkubiert; es zeigten sich vesikuläre Signalantworten sowohl subapikal als auch an der Plasmamembran der Kardiomyozyten, wo die Prozession von ANP beschrieben worden ist (Wu, Yan, Pan, Morser and Wu 2002).

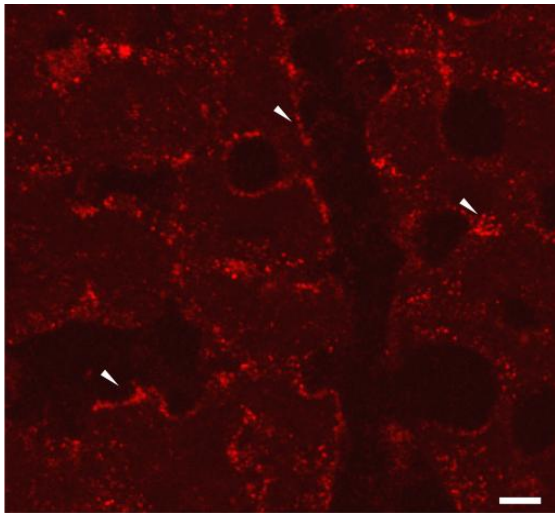


Abb. 5. Verifikation des monoklonalen anti-Corin-Antikörpers mittels indirekter Immunhistochemie an Herzvorhofgewebe von Ratten. Mit weißen Pfeilen gekennzeichnete Signalantworten vor allem an der Plasmamembran der Kardiomyozyten. Außerdem Signalantworten in intrazellulären Vesikeln nahe der Plasmamembran [Kalibrationsbalken $\cong 10 \mu\text{m}$].

4.2.1. Lokalisation von Corin in der Niere

Zur Lokalisation von Corin in der Niere wurden immunhistochemische Doppelfärbungen an Nieren-Gewebe der Ratte mit den segmentspezifischen Markerproteinen Phalloidin (Bürstensaummembran des proximalen Tubulus), NKCC2 (TAL) und AQP2 (Verbindungstubulus und Sammelrohr) durchgeführt. Positive Signalantworten wurden in Epithelzellen des proximalen Tubulus, der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife, dem Verbindungstubulus und dem Sammelrohr gefunden. Stärkste Antwort zeigte sich in der renalen Medulla. Im proximalen Tubulus zeigten sich Signalantworten überwiegend im apikalen endozytotischen Kompartiment. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife stellte sich Corin in Vesikeln um den Zellkern herum gruppiert und diffus im Zytoplasma verteilt dar. Im Sammelrohr konnte Corin, gleichmäßig in zytoplasmatischen Vesikeln angeordnet, nachgewiesen werden; hier waren ebenfalls interstitielle Zellen positiv.

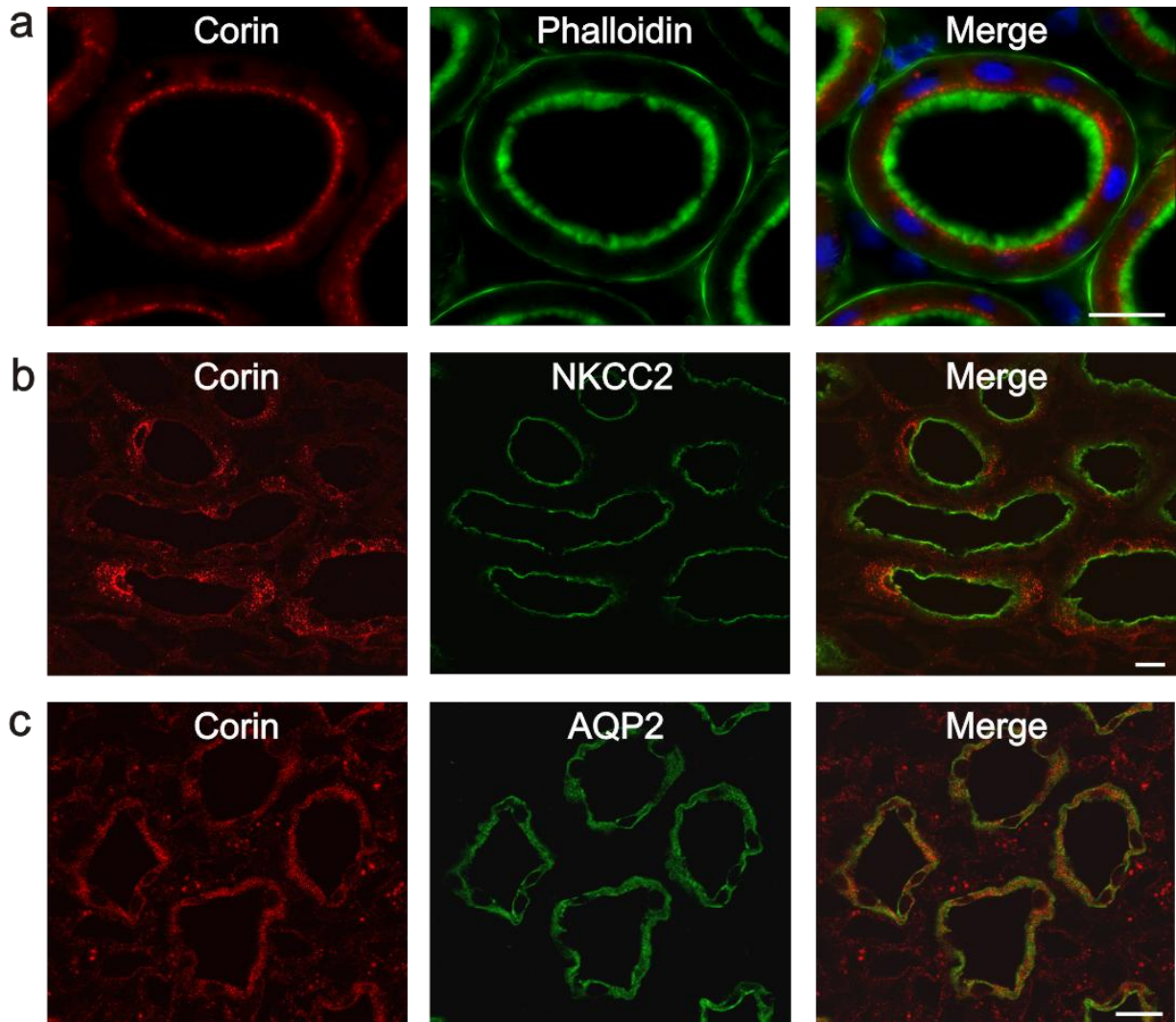


Abb. 6. Immunhistochemische Lokalisation von Corin in der Rattenniere. Doppelmarkierung von Corin (rot) und Nephronsegment-Marker (grün), wie fluoreszierendes Phalloidin, anti-NKCC2-Antikörper und anti-Aquaporin2. Im proximalen Tubulus (a) zeigen sich subapikal gelegene vesikuläre Signalantworten in allen drei Segmenten des proximalen Tubulus, S1, S2 und S3 mit zusätzlicher Zellkernmarkierung (blau) durch DAPI. In (b) gelingt die Darstellung von Corin im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife in um den Zellkern gruppierten zytoplasmatischen Vesikeln und in (c) zeigt sich Corin im Zytosol der Sammelrohrzellen der Nierenmedulla. [Kalibrationsbalken $\cong 10\mu\text{m}$].

4.3. Lokalisationsstudien von ANP in der Niere

Es wurden Lokalisationsstudien zu ANP auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob Corin und ANP in denselben Nephronsegmenten exprimiert werden. Zur Darstellung der ANP-mRNA wurden *in situ* Hybridisierungen, zur Detektion von ANP-Protein immunhistochemische Färbungen als Methode angewandt. Zur

Verifikation des käuflich erworbenen anti-ANP-Antikörpers wurde eine immunhistochemische Darstellung in Herzvorhofgewebe von Ratten gewählt.

4.3.1. mRNA Darstellung von ANP in der Niere

An Rattennierengewebe wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, um die Orte der ANP mRNA Synthese zu identifizieren. Es zeigten sich starke Signalantworten in den Podozyten des Glomerulum, schwächere im proximalen Tubulus, vor allem im S3 Segment, welcher durch die Bürstensaummembran identifiziert wurde. Im Verlauf des Nephrons zeigten sich die stärksten Signalantworten in dem dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife, dem Verbindungstubulus und dem Sammelrohrsystem bis zur Papillenspitze. In interstitiellen Zellen der renalen Medulla konnten teilweise ebenfalls Signalantworten beobachtet werden. Als Kontrolle dienten ANP cRNA sense Proben, die keinerlei Signale generierten.

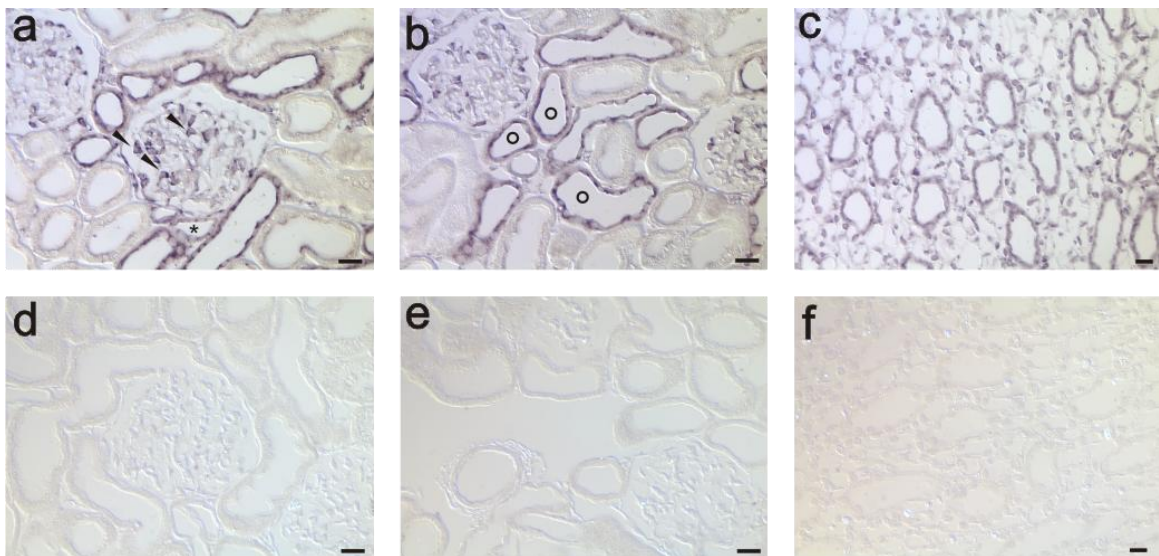


Abb. 7. *In Situ* Hybridisierung von ANP in der Niere. Signalantworten in Podozyten (markiert durch Pfeilspitzen) und distalem Tubulus (a). Des Weiteren Antworten im kortikalen Verbindungstubulus (b), gezeigt in typischer periarterieller Lokalisation durch Kreise markiert und schließlich (c) in medullären Sammelrohren sowie interstitiellen Zellen. Als Negativ-Kontrolle dienen (d-f) Sense-Proben Hybridisierungen in analogen Nephronabschnitten, die keine Signalantworten zeigen [Kalibrationsbalken $\cong 10\mu\text{m}$].

4.3.2. Immunhistochemische Darstellung von ANP in der Niere

Zunächst wurde der anti-ANP-Antikörper verifiziert. Hierfür wurde Herzvorhofgewebe verwendet, da die Erstbeschreibung von ANP im Herzvorhof gelang. Die Kardiomyozyten zeigten, insbesondere perinukleär, vesikuläre Signalantworten was in

guter Übereinstimmung mit der Erstbeschreibung ist (Rinne, Vuolteenaho, Jarvinen, Dorn and Arjamaa 1986).

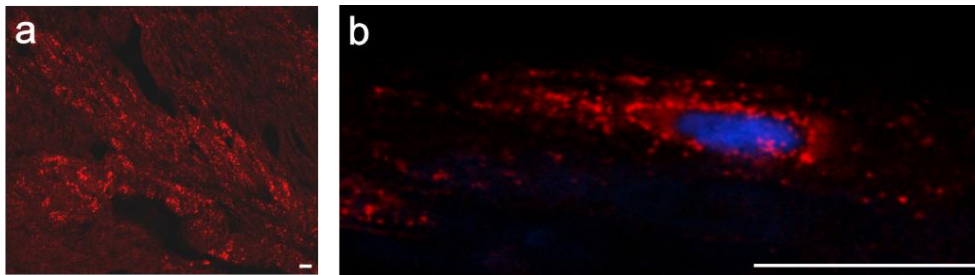


Abb. 8. Immunhistochemische Verifikation des anti-ANP-Antikörpers an Herzvorhofgewebe von Ratten. ANP-Färbung (rot) zeigt starke zytoplasmatisch vesikuläre, perinukleär betonte Signalantworten (a) mit Färbung des Kerns (blau) zur Veranschaulichung in höherer Vergrößerung (b). [Kalibrationsbalken $\cong 10\mu\text{m}$].

In der Niere zeigte der anti-ANP-Antikörper ausschließlich Signalantworten in den medullären Sammelrohren der Papillenspitze. Hierbei erwies sich das Expressionsmuster als heterogen – es konnten sowohl Signalantworten in zytoplasmatischen als auch subapikalen Vesikeln nahe der Plasmamembran gezeigt werden.

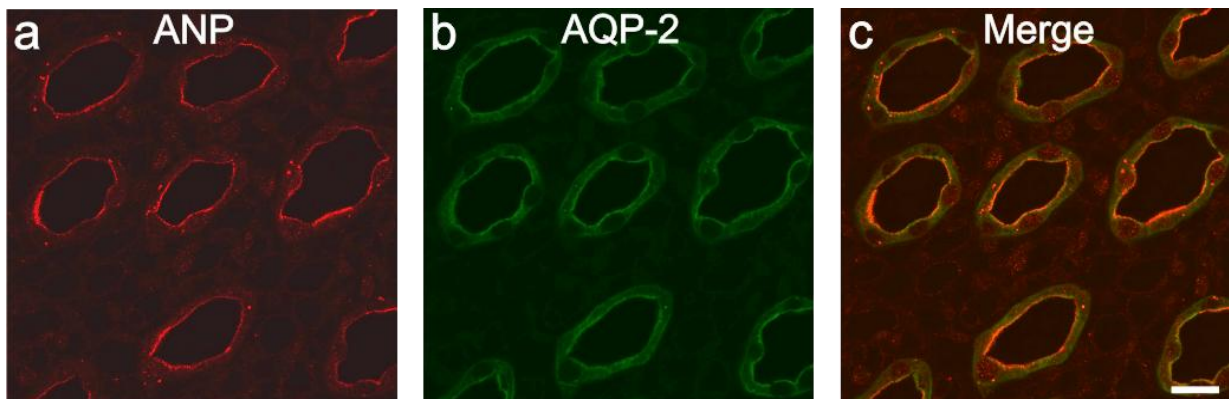


Abb. 9. Immunhistochemische Darstellung von ANP in Nierengewebe der Ratte. Es zeigt sich eine Färbung von ANP (rot) ausschließlich in medullären Sammelrohrzellen der Papillenspitze, identifiziert durch AQP-2-Färbung (grün) in (b). Im Mischbild zeigen sich z.T. Ko-Lokalisationen (c). [Kalibrationsbalken $\cong 20\mu\text{m}$].

4.4. Veränderungen von Corin und ANP in PAN- und anti-Thy1 GN

4.4.1. mRNA Transkriptionsraten in Microarray und Taq[®]-Man Real-Time-PCR

Um Kenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge der Volumenretention bei

Proteinurie zu erlangen, wurde eine Microarray-Analyse zur Identifizierung veränderter mRNA Transkriptionsraten in PAN und anti-Thy1 GN Ratten durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus dem Innenstreifen und der Medulla von PAN-/anti-Thy1 GN- und Kontrollratten isoliert und hybridisiert. Die isolierte Corin-mRNA erwies sich, verglichen mit den Kontrolltieren, als deutlich reduziert (siehe Tabelle 6). Es folgte zur Bestätigung der Ergebnisse die Durchführung einer Taq-Man® Real-Time-PCR, in der zusätzlich auch die mRNA-Transkriptionsraten des kortikalen Nierengewebes untersucht wurden. Die mRNA-Transkriptionsraten von Corin in kortikalem Gewebe waren ebenfalls erniedrigt, jedoch weniger stark als im medullären Gewebe – und hier nicht signifikant. Im medullären Gewebe bestätigten sich die Ergebnisse des MicroArray und zeigten eine deutliche, signifikante Verminderung der mRNA-Transkriptionsraten von Corin mit konsekutivem Anstieg der mRNA-Transkriptionsraten von ANP.

Tab. 6. mRNA Transkriptionsraten für Corin und ANP in renalem Kortex und Medulla von PAN und anti-Thy1 GN Ratten. Medulläre Corin mRNA Transkriptionsraten bestimmt durch Affymetrix Microarray Analyse. Alle Werte auf GAPDH normalisiert, $p > 0,001^{\#}$. Taq-Man® Analyse zur Bestimmung von kortikalen und medullären mRNA Transkriptionsraten von Corin und ANP. Die in Kontrolltieren detektierten mRNA Raten sind gleich 1 gesetzt (100%) $MW \pm SD$, $n = 6$ pro Gruppe. $p < 0,05^*$.

		Berechnungen der mRNA Menge \pm SD		
		Kontrolle	PAN	GN
Microarray				
Medulla				
	Corin	6419 [#]	2531 [#]	3625 [#]
Real-Time-PCR				
Kortex				
	Corin	1.00 \pm 0.20	0.66 \pm 0.15	0.76 \pm 0.20
	ANP	1.00 \pm 0.72	6.64 \pm 1.75*	6.51 \pm 3.26*
Medulla				
	Corin	1.00 \pm 0.06	0.33 \pm 0.12*	0.37 \pm 0.12*
	ANP	1.00 \pm 0.23	37.74 \pm 12*	20.75 \pm 6.91*

4.4.2. *Veränderte Gewebekonzentrationen von Corin, ANP und Pro-ANP*

Um die Folgen der veränderten mRNA Transkriptionsraten zu bestimmen wurde die Proteinexpression von Corin und Pro-ANP im renalen Kortex und der Medulla von PAN und anti-Thy1 GN Ratten durchgeführt. Im renalen Kortex unterschieden sich die Corin und Pro-ANP Gewebekonzentrationen der PAN und anti-Thy1 GN Ratten nicht von denen der gesunden Kontrolltiere: Corin (Kontrolle: $100 \pm 16\%$; PAN $78 \pm 6\%$;

anti-Thy1 GN 92±9%) und Pro-ANP (Kontrolle: 100±10%; PAN 139±24%; anti-Thy1 GN 99±12%). In der renalen Medulla zeigten sich jedoch signifikant erniedrigte Werte für Corin, illustriert durch Abb. 10.

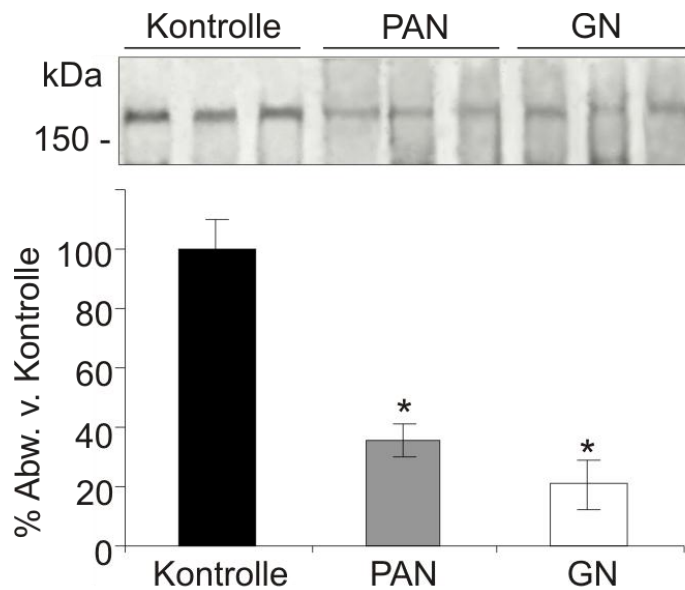


Abb. 10. Mengenveränderungen von Corin in medullärem Nierengewebe von PAN/anti-Thy1 GN im Western-Blot. Signifikant erniedrigte Expressionsrate von Corin sowohl in PAN ($35.4 \pm 5.3\%$) als auch in anti-Thy1 GN ($20.9 \pm 8.5\%$) im Vergleich zur Kontrolle ($100.0 \pm 9.9\%$). MW±SEM. n=6 pro Gruppe; $p < 0.05^*$).

Die erniedrigte Proteinexpressionsrate von Corin in der renalen Medulla der PAN und anti-Thy1 GN Ratten wird von deutlich erhöhten Werten für Pro-ANP kontrastiert, illustriert durch Abb. 11.

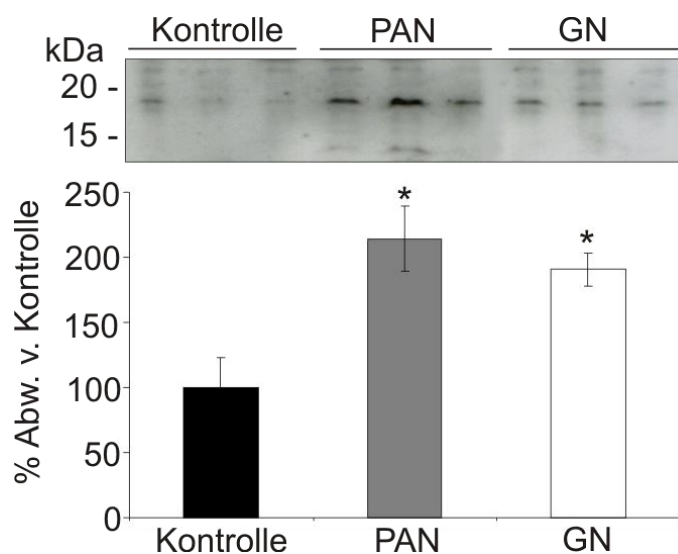


Abb. 11. Mengenveränderungen von Pro-ANP in medullärem Nierengewebe von PAN und anti-Thy1 GN im Western-Blot. Es stellen sich signifikante Erhöhungen der Expressionsraten von Pro-ANP in PAN ($214,1 \pm 25,1\%^*$) und anti-Thy1 GN ($190,9 \pm 12,7\%^*$), verglichen mit Kontrollgruppe

(100±23,1%), dar. n=5 pro Gruppe, p<0,05*.

In PAN und anti-Thy1 GN Tieren konnten veränderte Proteinexpressionen von Corin und Pro-ANP beobachtet werden, was in der Folge eine erniedrigte ANP Freisetzung vermuten lässt. Hierzu wurde ein ANP-ELISA durchgeführt, der zeigte, dass PAN und anti-Thy1 GN Ratten eine signifikant erniedrigte ANP Gewebekonzentration im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren aufwiesen - illustriert durch Abb.12.

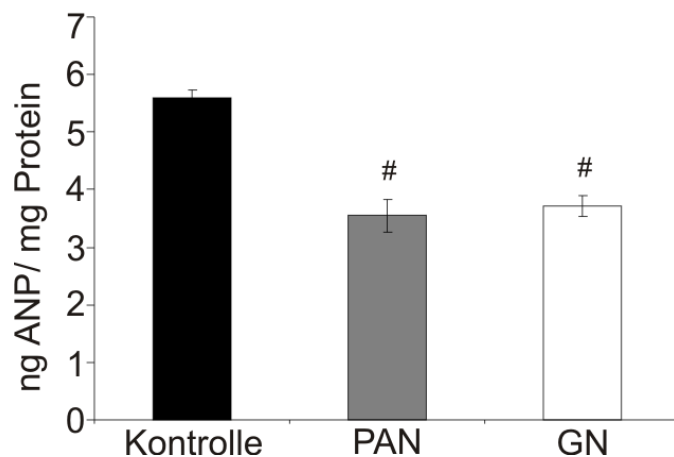


Abb. 12. Gewebekonzentrationen von ANP in PAN und anti-Thy1 GN. Im ELISA zeigen sich signifikant erniedrigte Gewebekonzentrationen von ANP pro 1mg Gesamtprotein für PAN (3,5±0,3ng) und anti-Thy1 GN (3,7±0,2ng) im Vergleich zu den Kontrollen (5,6±0,1ng). n=6 pro Gruppe. #p<0,001.

4.5. Untersuchungen am Corin^{-/-} Modell

Die beiden hier analysierten Tiermodelle anti-Thy1 GN und PAN repräsentieren multifaktoriell bedingte Erkrankungsbilder, denen die dysregulierte Volumenretention mit konsekutiver Ödembildung gemein ist. Die Beobachtung einer verminderten Corin-Expression mit hieraus resultierenden erniedrigten ANP-Konzentrationen in den Tubuluszellen der renalen Medulla führt zu der Fragestellung, welche Bedeutung diese Beobachtungen für die Dysregulation der proteinurischen Tiermodelle haben bzw. wie sie sich in den multifaktoriellen Kontext der Erkrankungen einfügen. In einer Kooperation mit Herrn Dr. Qingyu Wu aus den USA wurde uns Nierengewebe von Corin-Knock-Out (Corin^{-/-}) und gesunden Kontrollmäusen (WT) zur Verfügung gestellt. Die folgenden Versuche hatten die Zielsetzung, den für die Volumenretention verantwortlichen Transporter zu identifizieren und hierfür evtl. verantwortliche Veränderungen der ANP-Signalkaskade zu untersuchen.

4.5.1. Auswirkungen von *Corin*^{-/-} auf Transportprozesse und ANP-Signalkaskade

Es wurden Western-Blot Analysen von angereicherten Plasmamembranfraktionen medullärer *Corin*^{-/-} Nierenhomogenate durchgeführt, um Expressionsveränderungen von Transportern zu untersuchen, die im Sammelrohr oder distalen Tubulus exprimiert werden. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate von β -ENaC bei *Corin*^{-/-} Tieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (WT vs. *Cor*^{-/-}: β -ENaC 100 ± 27 vs. $296 \pm 43\%^*$; *P<0.001), wohingegen α - und γ -ENaC genauso wie Na,K-ATPase und AQP2 unverändert blieben - illustriert in Abb.13. Im Anschluss wurden Western-Blot Analysen von Komponenten der ANP-Signalkaskade, nämlich PDE5, seiner phosphorylierten Form phospho-PDE5 (p-PDE5) sowie PKGII, durchgeführt, um mögliche Mechanismen der im *Corin*^{-/-} beobachteten β -ENaC Expressionserhöhung zu identifizieren. Es zeigten sich Erhöhungen der Expressionsniveaus von PDE5, p-PDE5 und PKGII in medullärem Nierengewebe der *Corin*^{-/-} Tiere im Vergleich zu den gesunden Kontrollen - illustriert in Abb.13.

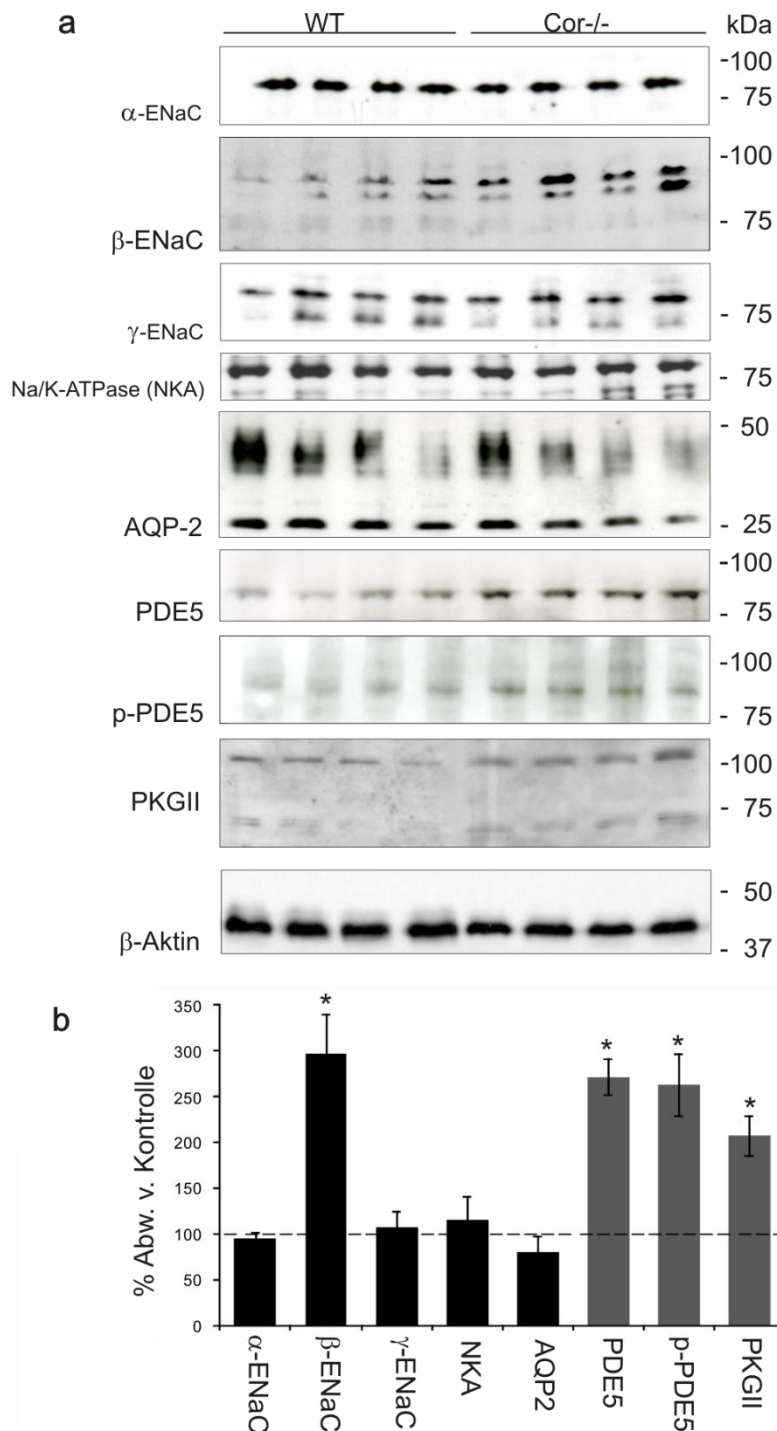


Abb. 13. Expressionsveränderungen von β -ENaC und den ANP-Signalmolekülen PDE5, p-PDE5 und PKGII in *Corin*^{-/-} Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind repräsentative Westernblots von β -ENaC, PDE5, pPDE5 und PKGII sowie β -Aktin als Ladekontrolle. Die densitometrische Auswertung ergab signifikante Expressionserhöhungen in *Corin*^{-/-} Tieren verglichen mit Wildtyp-Tieren (gestrichelte 100% Linie) für β -ENaC (+296 \pm 43%), PDE5 (+ 272 \pm 20%), p-PDE5 (+263 \pm 33%) und PKGII (+207 \pm 22%) wohingegen die α - und γ -ENaC Untereinheiten sowie Na/K-ATPase und AQP2 nicht verändert waren. [n=5 pro Gruppe, *p<0,05].

Um die wichtige Beobachtung der β -ENaC Expressionserhöhung und des ANP-Signalproteins PKGII zu verifizieren, wurden immunhistochemische Färbungen an $Corin^{-/-}$ und Wildtypgewebe durchgeführt. Dabei ergab sich eine verstärkte Signalantwort in medullären Sammelrohrzellen sowohl für β -ENaC als auch PKGII in $Corin^{-/-}$ Gewebe, verglichen mit Wildtypgewebe - illustriert in Abb.14.

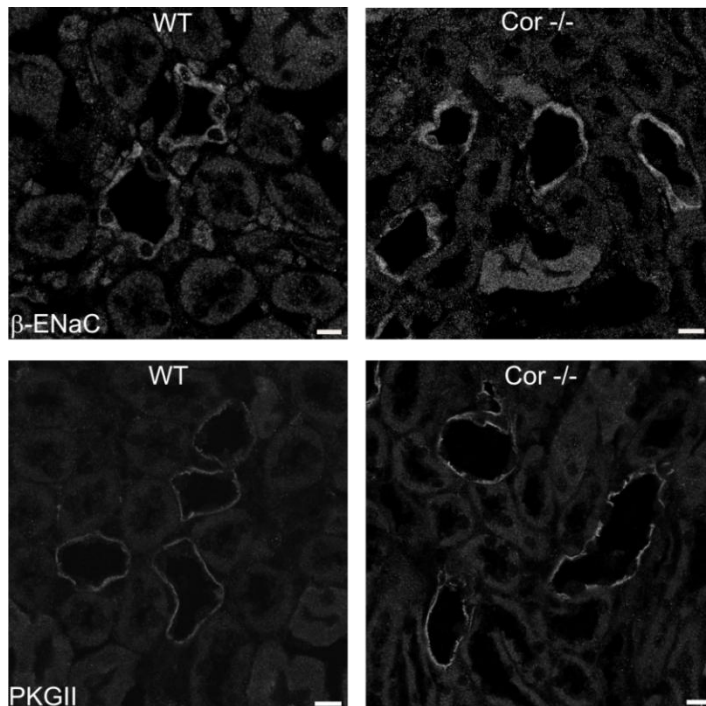


Abb. 14. Immunhistochemische Darstellung von β -ENaC und PKGII in Nierengewebe von Wildtyp- sowie $Corin^{-/-}$ Mäusen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen sich sowohl für β -ENaC als auch für PKGII erhöhte Signalintensitäten in den medullären Sammelrohrzellen bei $Corin^{-/-}$ Tieren [Kalibrationsbalken $\approx 20\mu\text{m}$].

4.5.2. Aldosteron Signalkaskade in $Corin^{-/-}$ Tieren

ANP hemmt die Aldosteron Synthese der Zona glomerulosa-Zellen in der Nebennierenrinde (Barrett et. al, 1988). In den $Corin^{-/-}$ Mäusen könnte die eingeschränkte ANP Synthese in einer vermehrten Aldosteron Synthese resultieren, die zu der beobachteten β -ENaC Erhöhung beigetragen haben könnte. Es wurde hierfür die Aktivierung der Aldosteron Signalkaskade durch Western-Blot Analysen von Proteinen der Signalkaskade auf Expressionsveränderungen in $Corin^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen untersucht. Es zeigten sich verminderte Expressionsraten für Akt, phospho-Akt(S), phospho-Akt(T), phospho-serum- and glucocorticoid-inducible

kinase 1 (p-SGK1) und With-No-Lysine proteinkinase (WNK)1 in *Corin*^{-/-} Tieren, wohingegen WNK4 und neuronal precursor cells expressed, developmentally down-regulated (Nedd) 4-2 unverändert blieben (Reduktion in% von *Cor*^{-/-} Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren; Akt: -74 ± 17%*; phospho-Akt(S) -47 ± 7%*; phospho-Akt(T) -48 ± 11%*; p-SGK1 -81 ± 7%*; WNK1 -68 ± 12%*; *p<0,05) - illustriert in Abb.15.

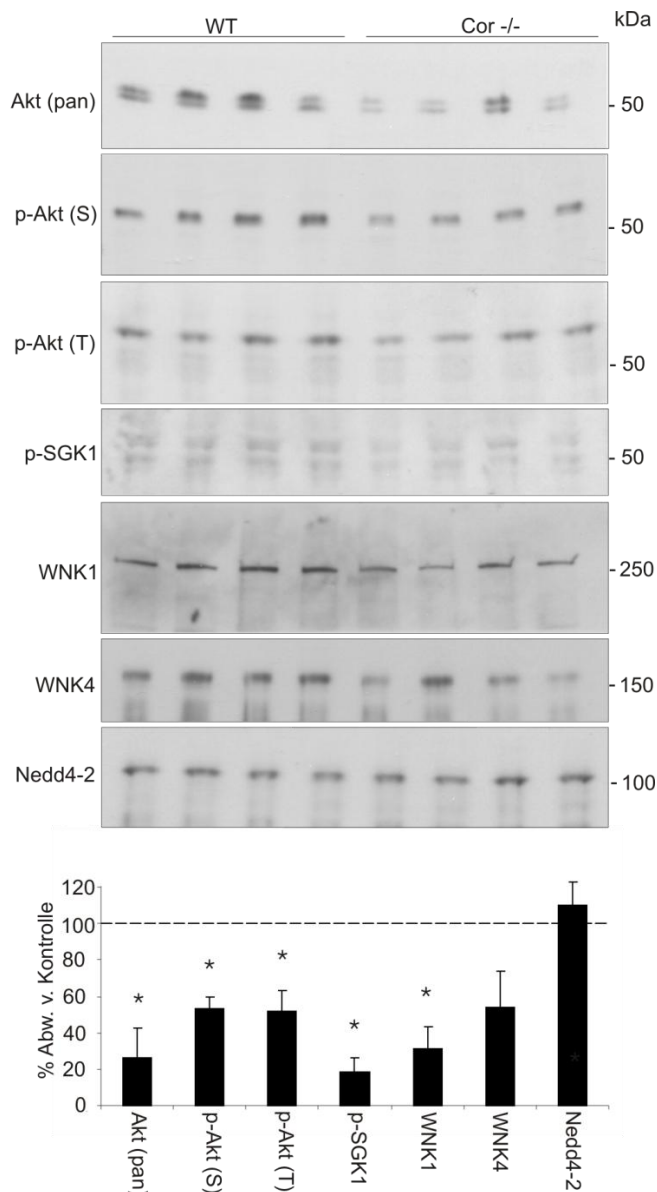


Abb. 15. Veränderte Proteinexpressionslevel der Aldosteron Signalkomponenten in *Corin*^{-/-} vs. Wildtyp. Western Blots von Akt, p-Akt(S), p-Akt(T), phospho-serum- und glucocorticoid-inducible kinase 1 (p-SGK 1) und With-No-Lysin protein kinase 1 (WNK1) zeigen verminderte Expressionslevel in *Corin*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen, wohingegen WNK4 und neuronal precursor cells expressed, developmentally down-regulated (Nedd) 4-2 unverändert bleiben. Densitometrische Auswertung unten. n=5 pro Gruppe; *p<0,05

4.6. Proteinexpressionslevel von β -ENaC und ANP-Signalkomponenten nach cGMP Reduktion sowie PDE5 und PKGII Überexpression

In den vorangegangenen Experimenten wurden am Corin^{-/-} Modell die Auswirkungen des unter PAN und anti-Thy1 GN beobachteten verminderten Proteinexpressionslevels von Corin hinsichtlich möglicher Änderungen der Proteinexpression von Natriumtransportern und Modulationen der ANP- sowie der Aldosteronsignalkaskade aufgezeigt. Um die Erhöhung der Proteinexpression von β -ENaC erklären zu können, wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch den Corin-Mangel fehlendes ANP, eine verminderte Aktivierung des membrangebundenen ANP-Rezeptors und den Abfall der intrazellulären cGMP-Konzentration zur Folge haben könnte. Die verminderte zelluläre cGMP-Konzentration könnte zu den beobachteten Effekten geführt haben. Um die Hypothese zu prüfen, wurden kultivierte Sammelrohrzellen der Maus (mpkCCD_{CL4} Zellen) mit 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) und 100 μ M 8-bromo-cGMP (8-br-cGMP) für 24 Stunden (h) inkubiert und anschließend in FCS-freiem Medium gehalten. Dies simulierte eine cGMP Verarmung (Zeitpunkt 0). Es folgte ein Beobachtungszeitraum von 24h, in dem zu drei Zeitpunkten die zellulären Expressionsveränderungen von β -ENaC, PDE5, p-PDE5 und PKGII bestimmt wurden. Es zeigte sich ein Expressionsanstieg von β -ENaC, PDE5, p-PDE5 und PKGII (Ausgedrückt als Anstieg in% vom Zeitpunkt 0: β -ENaC +111 \pm 48%* (4h), +135 \pm 62%* (8h), +108 \pm 38%* (24h); PDE5 +275 \pm 56%* (4h), +360 \pm 72%* (8h), +212 \pm 48%* (24h); phospho-PDE5 +363 \pm 48%* (4h), +307 \pm 42%* (8h), +287 \pm 38%* (24h); PKGII (105kDa) +138 \pm 21%*(4h), +38 \pm 8% (8h), +358 \pm 41%* (24h); PKGII (73kDa) +104 \pm 16%*(4h), +175 \pm 27%*(8h), +276 \pm 41%*; *p<0,05) - illustriert in Abb.16a. Im Anschluss wurde der Einfluss von PDE5 und PKGII auf die Expression von β -ENaC in mpkCCD_{CL4} Zellen bestimmt. Dafür wurden die mpkCCD_{CL4} Zellen mit Konstrukten von PDE5 und/oder PKGII transfiziert. Zellen, die nur mit PDE5 transfiziert wurden, zeigten erhöhte Expressionslevel für β -ENaC (ausgedrückt als Anstieg in% im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen: β -ENaC +134 \pm 30%*; *p<0,05). Alleinige Transfektion mit PKGII führte ebenfalls zu einem erhöhten Expressionslevel für β -ENaC (ausgedrückt als Anstieg in% im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen: β -ENaC +517 \pm 48%*; *p<0,05). Doppeltransfektion mit PDE5 und PKGII führte zu einem weiteren Anstieg von β -ENaC (ausgedrückt als Anstieg in%, verglichen mit Mock-transfizierten Zellen: β -ENaC +548 \pm 67%*; *p<0,05) - gemeinsam illustriert in Abb.16b.

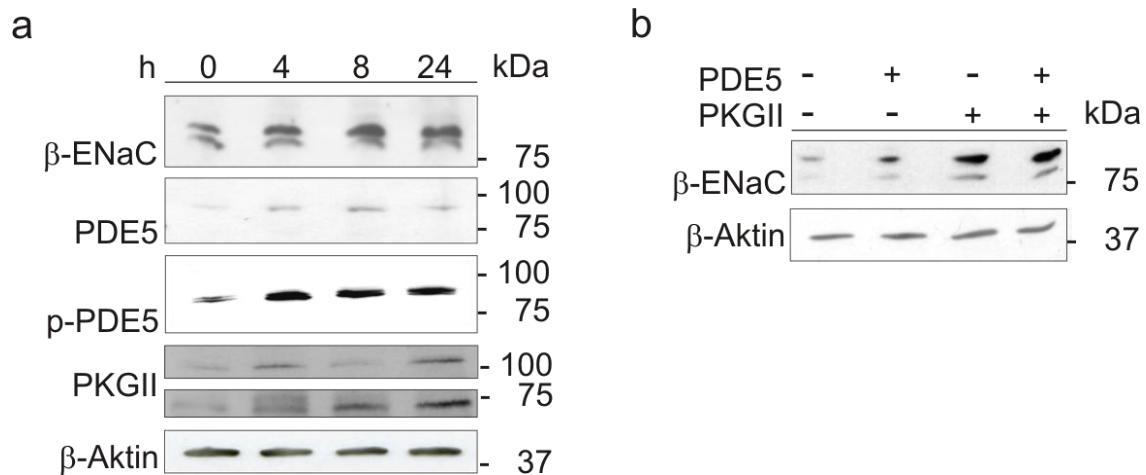


Abb. 16. Veränderte Expressionslevel von β-ENaC und ANP-Signalkomponenten nach cGMP Reduktion und PDE5 sowie PKGII Überexpression in mpkCCD_{CL4} Zellen. (a) Westernblots von β-ENaC, PDE5, p-PDE5, PKGII und β-Aktin (als Ladekontrolle) aus mpkCCD_{CL4} Zellen nach cGMP Reduktion für 0,4,8 und schließlich 24 h. Anstieg der Expressionslevel von β-ENaC, PDE5, p-PDE5 und PKGII zu sehen. (b) Westernblots von β-ENaC und β-Aktin (als Ladekontrolle) aus transient transfizierten mpkCCD_{CL4} Zellen mit pcDNA3.1 (mock), PDE5 und PKGII Konstrukten. Transiente Transfektion von PDE5 und PKGII resultiert in erhöhten β-ENaC Expressionslevel [n=8 pro Experiment].

4.7. Veränderung von β-ENaC und ANP-Signalkomponenten in PAN und anti-Thy1 GN

Um die in den Corin^{-/-} Tieren und in Zellkulturexperimenten gemachten Beobachtungen der erhöhten Expression von β-ENaC und ANP-Signalkomponenten auch auf die proteinurischen Krankheitsmodelle PAN und anti-Thy1 GN übertragen zu können, wurden Westernblot Analysen von angereicherten Plasmamembranfraktionen der Nierenmedulla von PAN und anti-Thy1 GN Ratten für β-ENaC, PDE5, phospho-PDE5 und PKGII angefertigt und mit gesunden Kontrolltieren verglichen. Es zeigten sich signifikante Anstiege der Expressionslevel für β-ENaC, PDE5 und phospho-PDE5 in PAN und anti-Thy1 GN (β-ENaC Kontrolle: 100 ± 14%; PAN: 256 ± 26%*; GN: 324 ± 7%*; p<0.05, PDE5 Kontrolle: 100 ± 19%; PAN: 354 ± 46%*; GN: 221 ± 10%*; *p<0.05 und phospho-PDE5 Kontrolle: 100 ± 20%; PAN: 185 ± 22%*; GN: 190 ± 5%*; *p< 0,05 - illustriert in Abb.17. Weiterhin ergaben sich bei weiteren laborinternen Untersuchungen erhöhte Expressionsraten für PKGII, deren Validität und Signifikanz zum derzeitigen Stand nicht sicher beurteilt werden können.

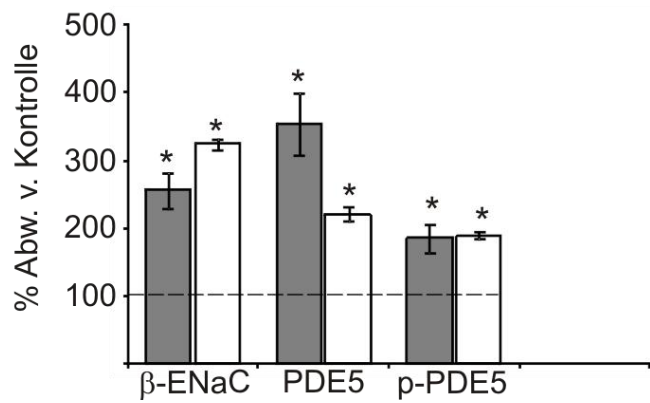
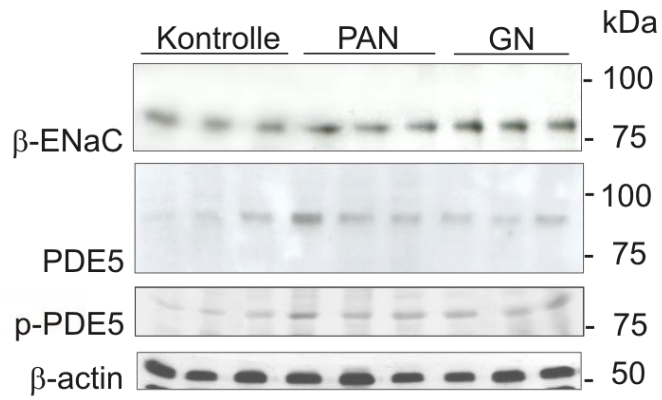


Abb. 17. Veränderte Expressionsraten von β -ENaC und ANP-Signalkomponenten in PAN und anti-Thy1 GN. Gezeigt sind Western-Blots (oben) und densitometrische Auswertung (unten) von β -ENaC, PDE-5 und p-PDE5 sowie β -Aktin als Ladekontrolle. Verglichen mit der Kontrolle (gestrichelte 100% Linie) starker Anstieg in PAN (grau) und anti-Thy1 GN (weiß) Ratten für alle Parameter [n=5 pro Gruppe; *p<0,05].

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen, die zur primären Volumenretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen beitragen. Hierzu wurde eine Microarray-Analyse zweier proteinurischer Tiermodelle, dem Puromycin-induzierten nephrotischen Syndrom (PAN) und der akuten anti-Thy1 Glomerulonephritis (GN) durchgeführt. Corin, eine transmembranäre Serinprotease, die für die Freisetzung von ANP aus seinem Vorläuferpeptid Pro-ANP verantwortlich ist, war in PAN und anti-Thy1 GN Tieren, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, reduziert. Wir untersuchten Corin mit dem Grundgedanken, dass eine verminderte Expression von Corin zu einer Beeinträchtigung der ANP Freisetzung und in der Folge verminderter oder fehlender natriuretischer Wirkung führen könnte. Proteinurische Nierenerkrankungen gehen mit einer primären Volumenretention einher, die auf Veränderungen tubuloepithelialer Transportprozesse von Natrium und Wasser beruhen. Die natriuretischen Peptide, zu denen ANP gehört, führen zu Natriurese und Diurese. Eine Dysregulation bei proteinurischen Nierenerkrankungen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beobachtet und in diesem Rahmen als ANP-Resistenz diskutiert (Valentin, Ying, Couser and Humphreys 1998) (Perico, Delaini et al. 1989). ANP kann bei erhöhter Volumenbelastung des Kreislaufs Natriurese, Diurese und die Relaxation von Widerstandsgefäßen bewirken. Das nephrotische Syndrom kann eine pathologische Volumenretention aufweisen, die durch keine oder nur inadäquate Kompensation in Form von Natriurese charakterisiert ist (Valentin, Qiu et al. 1992). Es konnten jedoch gesteigerte ANP-Konzentrationen im Plasma nephrotischer Patienten oder in entsprechenden Tiermodellen festgestellt werden (Tulassay, Rascher et al. 1987). Folglich wurde das nephrotische Syndrom als ein Zustand der ANP-Resistenz bezeichnet (Valentin, Qiu et al. 1992). Durch Versuche an unilateralen proteinurischen Tiermodellen (Injektion von Adriamycin in nur eine der beiden Aa. renales) konnte die Niere als primärer Ort der ANP-Resistenz aufgedeckt werden, da lediglich die nach Induktion proteinurische Niere eine verminderte Antwort auf systemische ANP-Infusion aufwies; die gesunde Niere reagierte normal (Perico, Delaini et al. 1989).

Es wurden unterschiedliche Mechanismen für die verminderte Ansprechbarkeit der Niere auf ANP diskutiert. So wurde eine verminderte ANP-Verfügbarkeit in der Niere

durch Hochregulation des ANP-Clearance-Rezeptor (NPR-C) postuliert; spezifische Blockade des Rezeptors führte allerdings weder zu veränderten renalen cGMP Konzentrationen noch zu einer gesteigerten Natriumausscheidung über den Urin und trägt daher vermutlich nicht zur ANP-Resistenz bei. Eine Herunterregulation des ANP-Rezeptors (NPR-A) ist als Ursache der Proteinurie-assoziierten Volumenretention umstritten (Bianchi, Thibault et al. 1989; Cachofeiro, Schiffrin, Cantin and Garcia 1990). In einem Tiermodell der Herzinsuffizienz, welche ebenfalls mit einer ANP-Resistenz der Niere einhergeht, wurden verminderte NPR-A Rezeptordichten in der Medulla (Yechieli, Kahana, Haramati, Hoffman and Winaver 1993) und dem Glomerulus (Tsunoda, Mendelsohn et al. 1988) gefunden. Neuere Untersuchungen fokussieren sich bei der Aufklärung der renalen ANP-Resistenz auf Veränderungen innerhalb der Signaltransduktion – so konnte eine vermehrte Inaktivierung der Guanylatzyklase durch die Veränderungen der intrazellulären Kinase-ähnlichen Domäne nachgewiesen werden (Joubert, Labrecque and De Lean 2001). Über potentielle Fehlregulationen der intrazellulären ANP-Signalkaskade ist bisher wenig bekannt; in Zellkulturexperimenten mit Nierenepithelzellen nephrotischer Ratten führte die Inkubation mit PDE-5 Inhibitoren zu einer Normalisierung der ANP-induzierten cGMP Konzentrationen (Ni, Safai, Rishi, Baylis and Humphreys 2004). In vivo Studien an nephrotischen Ratten zeigten, dass PDE-5 Hemmer die ANP-induzierte Natriuresis steigern, nicht aber normalisieren können (Lee and Humphreys 1996). Diese Arbeit sollte die Hypothese prüfen, ob die verminderte Expression von Corin bei proteinurischen Nierenerkrankungen eine Rolle bei der Ausbildung der beschriebenen ANP-Resistenz spielt.

Um die Bedeutung von Corin für die beschriebene ANP-Resistenz zu untersuchen, wurde ein monoklonaler anti-Corin-Antikörper produziert. Die Verifikation des Antikörpers erfolgte an Gewebe des Herzvorhofs, da Corin hier erstmals beschrieben wurde (Yan, Wu et al. 2000) – eine immunhistochemische Lokalisation gelang den Autoren zum damaligen Zeitpunkt nicht, weil die Produktion eines anti-Corin-Antikörpers nicht gelang. Vorgängerstudien konnten allerdings nachweisen, dass das Pro-ANP konvertierende Enzym eine in Kardiomyozyten exprimierte, membranassoziierte, hochmolekulare Serinprotease ist und die Konversion zu ANP an der Oberfläche der Kardiomyozyten stattfindet (Imada, Takayanagi and Inagami 1988; Sei, Hand, Murray and Glembotski 1992). Passend dazu konnten wir mit unserem selbst-generierten anti-Corin-Antikörper eine Corin-Expression an der Plasmamembran von

Kardiomyozyten nachweisen.

Wir konnten Corin weiterhin in der Niere lokalisieren. Es zeigten sich positive Signale in Vesikeln des proximalen Tubulus, der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife und des medullären Sammelrohrs sowie in interstitiellen Zellen der Medulla. Die ANP-Lokalisation ergab ein identisches intrarenales mRNA Expressionsmuster – ANP-Protein konnte hingegen lediglich in Sammelrohrzellen der renalen Medulla detektiert werden. Die Beobachtung, dass Nephronsegmente relevante ANP mRNA Mengen aber kein ANP-Protein aufweisen scheint paradox, lässt sich aber möglicherweise durch die These erklären, dass ANP in den Epithelzellen des proximalen Tubulus und der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife sofort nach proteolytischer Aktivierung in das Tubuluslumen sezerniert wird und dadurch unterhalb der Detektionsgrenze bleibt. Die höchste Expressionsmenge für ANP wurde im Sammelrohr lokalisiert - NPR-A wird ebenfalls überwiegend im Sammelrohr gebildet (Terada, Moriyama, Martin, Knepper and Garcia-Perez 1991). In NPR-A überexprimierenden Mäusen konnte das distale Nephron als das entscheidende Segment für die ANP-induzierte Natriurese identifiziert werden (Zhao, Pandey and Navar 2010). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die im Sammelrohr lokalisierte ANP-Synthese mit Natriurese und Diurese im Zusammenhang steht.

Die Synthese von ANP findet nicht nur in der Niere sondern auch im Herzen statt. Durch Sezernierung aus den Kardiomyozyten gelangt es in den systemischen Kreislauf, von wo aus es seine Wirkungen vermittelt; Singer et al. konnten jedoch den hohen Stellenwert des renalen ANP-Systems bezüglich der Natriumhomöostase unterstreichen, indem sie zeigten, dass die durch Volumeninfusion induzierte Natriurese nicht mit den im Serum gemessenen ANP-Konzentrationen korrelierte (Singer, Markandu et al. 1998). Außerdem führten mehrtägige ANP-Infusionen trotz deutlich angestiegener ANP Serumkonzentrationen zu einer unbedeutenden bis gänzlich unveränderten Steigerung der Natriumausscheidung im Urin (Drewett and Garbers 1994). Diese Beobachtungen sprechen für eine zentrale Rolle des renalen ANP-Systems (im Gegensatz zum systemischen ANP-System) bei Natrium- und Volumenregulation und unterstreichen die Bedeutsamkeit der in dieser Arbeit beschriebenen renalen Expressionsveränderungen von Corin und ANP bei

Proteinurie-assoziiierter Volumenretention.

Mäuse mit einem Puromycin-induzierten nephrotischen Syndrom und Ratten mit akuter anti-Thy1 Glomerulonephritis wiesen deutlich erniedrigte Corin-Expressionsraten in der Niere auf, was mit erhöhten Pro-ANP und erniedrigten ANP Konzentrationen einherging. Die Interaktion zwischen Corin und Pro-ANP konnte bisher nur im Herzen nachgewiesen werden, jedoch konnte in Zellkulturexperimenten mit Kardiomyozyten und Hek293 Zellen mittels Corin-siRNA die Pro-ANP Prozessierung vollständig unterbunden werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Corin das einzige Pro-ANP konvertierende Enzym ist. Bei Hek293 (Human embryonic kidney) Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass Corin in der Niere - ähnlich wie im Herzen (Yan, Sheng et al. 1999) - die Aktivierung von Pro-ANP zu ANP katalysiert. Die beobachteten Expressionsveränderungen von Corin und ANP in PAN und anti-Thy1 GN Tieren spiegeln diese Vermutung wider.

Freigesetztes ANP bindet an die membranständige Guanylatzyklase wodurch die Synthese von cGMP stimuliert wird. Die zellulären Wirkungen von cGMP werden durch cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) vermittelt, die ihrerseits wiederum durch Übertragung einer Phosphatgruppe auf einen Serin- oder Threoninrest zahlreiche zelluläre Enzyme aktivieren (Brenner, Ballermann, Gunning and Zeidel 1990; Levin, Gardner and Samson 1998). Daneben wurden cGMP-regulierte Ionenkanäle im Auge und die Regulation cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen (PDE) beschrieben. PDE-5 kommt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von cGMP zu, da erhöhte PDE-5 Konzentrationen zum Abbau und damit Inaktivierung von cGMP führen (Beltman, Becker et al. 1995).

Die in den proteinurischen Tiermodellen PAN und anti-Thy1 GN beobachtete Corin-Reduktion wurde anhand eines Corin Knock-Out ($^{-/-}$) Modells weiter untersucht. Corin $^{-/-}$ Mäuse wiesen erhöhte Pro-ANP bei erniedrigten ANP Gewebekonzentrationen auf und waren hypertensiv (Chan, Knudson et al. 2005). Die Tatsache, dass die Corin $^{-/-}$ Mäuse hypertensiv waren und Zeichen einer linksventrikulären Hypertrophie aufwiesen, spricht dafür, dass diese - wie die proteinurischen Tiere - einer erhöhten systemischen Volumenbelastung ausgesetzt waren. Die Beobachtung erniedrigter ANP Konzentrationen in der Niere, begleitet von einer erhöhten Volumenbelastung des

Kreislaufs, wurde ebenfalls bei PAN und anti-Thy1 GN Tieren gemacht. In Mikropunktionsstudien wurden das Sammelrohr und der distale Tubulus als Orte der pathologischen Volumenretention bei Proteinurie-assoziierten Erkrankungen ausfindig gemacht (Ichikawa, Rennke et al. 1983; Buerkert, Martin et al. 1991). Passend dazu wiesen *Corin*^{-/-} Mäuse signifikant erhöhte Plasmamembrankonzentrationen der β -ENaC Untereinheit im Sammelrohr auf. Patienten mit einem Liddle-Syndrom besitzen eine Mutation im PY-Motiv der β -ENaC Untereinheit und leiden, in Folge verminderter ENaC Internalisation von der Plasmamembran, an Bluthochdruck und/oder peripheren Gewebsödemen (Lu, Pribanic, Debonneville, Jiang and Rotin 2007). Es könnte daher der Schluss gezogen werden, dass die unter ANP-Defizienz erhöhten β -ENaC Konzentrationen an der Plasmamembran zu einer erhöhten ENaC Konzentration an der Zelloberfläche der Sammelrohr-Epithelzellen führen; erhöhte ENaC Konzentrationen an der luminalen Zelloberfläche von Sammelrohrzellen wurden in der Vergangenheit für die pathologische Volumenretention bei Proteinurie verantwortlich gemacht (Kim, Wang et al. 2004; Gadau, Peters et al. 2009). Im Folgenden wurde die ANP-Signalkaskade untersucht um die für die Dysregulation des epithelialen ENaC verantwortlichen Veränderungen in der Signaltransduktion zu untersuchen. Überraschenderweise fielen die *Corin*^{-/-} Mäuse durch erhöhte PDE5, phospho-PDE5 und Proteinkinase GII (PKGII) Spiegel auf.

Als Folge einer *Corin*-Defizienz kann eine reduzierte NPR-A (ANP-Rezeptor) Aktivierung durch verminderte ANP Konzentrationen angenommen werden. In der Folge hiervon fallen die cGMP Konzentrationen in Urin und Plasma ab, so wie dies auch bei Guanylatzyklase A-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte. Ähnlich den Guanylatzyklase A-defizienten Mäusen fielen auch PAN Ratten durch eine verminderte cGMP Ausscheidung über den Urin auf (Valentin, Ying et al. 1998). Vor diesem Hintergrund lautete die Hypothese dieser Arbeit, dass die Beeinträchtigung der proteolytischen ANP-Aktivierung zu reduzierten cGMP Konzentrationen führt und diese wiederum für die erhöhten β -ENaC Konzentrationen verantwortlich sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden *mpkCCD*_{CL4} Zellen benutzt und mit IBMX (cGMP Inhibitor) inkubiert, wodurch eine zelluläre cGMP Verarmung herbeigeführt wurde. Nun wurde jeweils die Expression von β -ENaC, PDE5, pPDE5 und PKGII untersucht – alle zeigten unter cGMP-Entzug eine gesteigerte Expression. Die

Hypothese einer erhöhten β -ENaC Expression unter cGMP Entzug bestätigte sich. Auch andere Autoren untersuchten bereits den Zusammenhang zwischen cGMP und ENaC Expression. Nie et al. konnten zeigen, dass es in ENaC-transfizierten Oozyten einen stimulierenden Effekt von 8-pCPT-cGMP auf die ENaC Aktivität (Nie, Zhang et al. 2010) gab. In früheren patch-clamp Untersuchungen konnte hingegen gezeigt werden, dass cGMP und vor allem das durch cGMP induzierte PKGII die Natriumabsorption durch die Inhibition eines bisher unbekanntes Amilorid-sensitiven Kationenkanal hemmte (Light, Corbin et al. 1990). Diese Studien zeigen, dass ANP auf unterschiedliche Natriumtransporter Einfluss nimmt und sich bei veränderten ANP-Konzentrationen, wie z.B. bei Proteinurie, eine pathologische Veränderung des Natriumtransports ergeben kann.

Die Veränderungen von PDE5, pPDE5 und PKGII mit der ENaC Erhöhung in kausalen Zusammenhang zu bringen, gelang durch die anschließende Transfektion der mpkCCD_{CL4} mit PDE5/PKGII im Überschuss. Beide Transfektionen führten zu einer erhöhten Expression von β -ENaC. PDE5 wird im proximalen Tubulus und im Sammelrohr exprimiert (Kotera, Fujishige et al. 1999) - Überexpressionen wurden bereits in anderen Arbeiten als Ursache der renalen ANP-Resistenz postuliert und gingen mit erhöhter Natrium- und Wasserretention einher (Ni, Safai, Gardner and Humphreys 2001), so dass erhöhte PDE5 Mengen in proteinurischen Nierenerkrankungen nicht überraschend sind. PDE5 ist cGMP abhängig, wird zu seiner aktiven Form über PKGII phosphoryliert und vermittelt ein negatives Feedback des ANP-Signalling durch die Degradation von cGMP. Erhöhtes PDE5 wirkt möglicherweise auch durch verstärkte Degradation von cGMP natriuretisch, da natriuretische Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) ihre Wirkungen ebenfalls über cGMP vermitteln. Die Nieren nephrotischer Ratten konnten durch PDE5 Inhibition geschützt werden – histologisch zeigte sich ein geringerer Grad epithelialer und interstitieller Schädigung (Rodriguez-Iturbe, Ferrebuz et al. 2005). Ebenso konnte eine Reduzierung systolischer Blutdruckwerte erzielt werden, was auf verminderte Natrium- und Wasserretention schließen lassen könnte. Es erscheint zunächst paradox, dass einem cGMP Entzug/Verminderung eine vermehrte Expression von PKGII und PDE5 folgt, da beide „cGMP-abhängig“ sind. Es gilt allerdings als gesichert, dass die cAMP und cGMP Signalkaskaden in spezifischen subzellulären Kompartimenten – durch spezifische in der Plasmamembran und am Zytoskelett befindlichen Ankerproteinen vermittelt (Beavo

and Brunton 2002; Nedvetsky, Tamma et al. 2009)– stattfinden. Es ist denkbar, dass die cGMP Signalkaskade in Teilbereichen einer Zelle unterschiedliche Aktivitätszustände aufweist und so eine lokal spezifische Regulation ermöglicht. Auch Castro et al. konnten in einer kürzlich erschienenen Arbeit Hinweise für diese Theorie liefern, indem sie zeigten, dass die membrangebundene und die lösliche Guanylatzyklase in voneinander getrennten Bereichen der Zelle aktiviert werden und hier ihre spezifischen Wirkungen unabhängig voneinander entfalten. Die Begrenzungen der Kompartimente werden durch die cGMP abbauenden PDEs gebildet, die nach der Vorstellung der Autoren eine Art Diffusionsbarriere der Guanylatzyklase bilden (Castro, Schittl and Fischmeister 2010). Die von uns verwendeten Plasmamembranhomogenate können diesem Umstand nicht gerecht werden, da sie lediglich die gesamten Reaktionen in einer Zelle abbilden und nicht zwischen intrazellulären Kompartimenten unterscheiden können. Die Bindung von ANP an den NPR-A Rezeptor aktiviert die membrangebundene Guanylatzyklase, in deren Folge PKGII als intrazelluläres Signalmolekül gebildet wird. In der Arbeit von Castro et. al konnte eine neue Funktion von PKGII beobachtet werden. Die Behandlung von Plasmamembranen mit PKGII hatte zwar keinen Effekt auf die basale NPR-A Aktivität, führte jedoch zu einer zweifach höheren stimulierenden Wirkung von ANP. Castro et. al diskutierten hierbei unterschiedliche Mechanismen. Neben einer möglichen Phosphorylierung des NPR-A durch PKGII wurde außerdem ein Protein postuliert, das die katalytische Aktivität der membrangebundenen Guanylatzyklase regulieren soll. Eine veränderte ANP Bindung oder Abweichungen in der Signaltransduktion hielten die Autoren ebenfalls für möglich. Castro et. al gelangen es in Hek293 Zellen zu zeigen, dass PKGII mit dem NPR-A Rezeptor interagiert – die Ko-Transfektion von PKGII und NPR-A führte zu einer ANP-abhängigen Steigerung der Guanylatzyklase-Aktivität, so dass PKGII demnach ein positives Feedback auf die ANP induzierte Guanylatzyklase-Aktivität ausübt (Castro, Schittl et al. 2010). Es wäre somit denkbar, dass die beobachtete Erhöhung von PKGII einen Mechanismus zur Kompensation der verminderten ANP Aktivierung darstellen könnte. Die Abb. 18 fasst die beobachteten Veränderungen auf Signaltransduktionsebene der ANP-Kaskade bei Proteinurie schematisch zusammen.

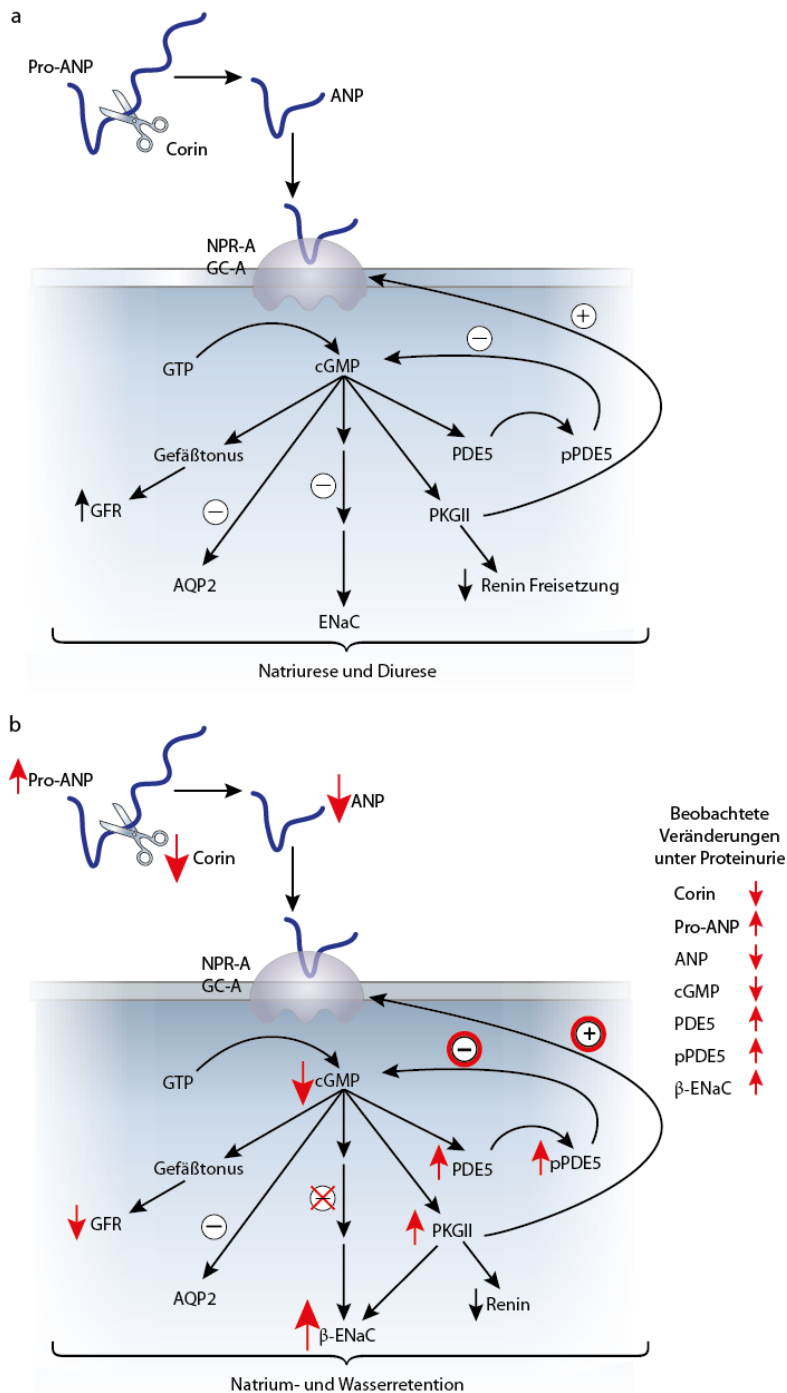


Abb. 18. Einfluss von Corin bei proteinurischen Nierenerkrankungen. (a) Effekte von Corin auf Signaltransduktion in der gesunden Niere. Corin, produziert in der Niere, aktiviert Pro-ANP zu ANP. ANP bindet an seinen Rezeptor, den natriuretischen Peptid Rezeptor (NPR)–A, aktiviert die Guanylatzyklase (GC-A), welche Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) hydrolysiert. cGMP fördert (1) eine Vasodilatation der afferenten und gleichzeitig eine Konstriktion der efferenten Arteriole und steigert so die glomeruläre Filtrationsrate (GFR); (2) die Translokation von Aquaporin (AQP)-2 aus der Plasmamembran ins Zytosol; (3) die Hemmung des epithelialen Natriumkanals (ENaC); (4) die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase II (PKGII), die (4.1) einer Renin-Freisetzung entgegenwirkt, (4.2) die NPR-A Rezeptoraktivität nach ANP-Bindung um ein Vielfaches erhöht und (4.3) die Aktivierung der Phosphodiesterase (PDE) 5, welche im Feedback die cGMP Produktion hemmt, steigert. Insgesamt resultieren Natriurese und Diurese. (b) Effekte von Corin auf die Signaltransduktion in der proteinurischen Niere. Corin ist erniedrigt mit dem Resultat erniedrigter ANP und verminderter cGMP Produktion. In der Folge ist die GFR vermindert; β-ENaC, PKGII und pPDE5 sind erhöht. Erhöhtes PKGII führt zu gesteigerter NPR-A Sensitivität für ANP und pPDE5 führt zu cGMP Abbau. Insgesamt resultiert eine Natrium- und Wasserretention.

Es ist denkbar, dass die Corin Defizienz über direkte, ANP unabhängige Effekte zu den Erhöhungen von β -ENaC, PDE5 und PKGII führt. Derartige Wirkungen von Corin wurden bisher allerdings nicht beschrieben. Der Mechanismus der PDE5 und PKGII Erhöhungen bleibt unklar – verminderte Corin-Expression scheint hierzu beizutragen. Es bedarf weiterer Forschungsansätze, um die cGMP-Signaltransduktion detaillierter aufzuklären und die mit ihr assoziierten Pathologien zu verstehen.

In der Vergangenheit wurden kontroverse Daten bezüglich der Wirkungen von ANP auf Natrium- und Wasserhaushalt beschrieben. Einige Studien konnten verminderten Natrium- und Vasopressin-stimulierten Wassertransport zeigen, wohingegen andere diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten (Silver 2006; Potter, Yoder, Flora, Antos and Dickey 2009). Die Synthese von Aldosteron in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde wird durch ANP inhibiert (Gambaryan, Butt et al. 2003), so dass ANP auf diesem Weg Einfluss auf die Natrium- und Wasserhomöostase nehmen könnte. Wir haben Komponenten der Aldosteron-Signalkaskade in Corin^{-/-} Mäusen untersucht, die durch fehlende ANP-Inhibition vermehrte Aktivitäten aufweisen könnten. Wir wiesen jedoch eine verminderte Aktivität der Aldosteron Signalkaskade in Corin^{-/-} Mäusen nach, so dass trotz verminderter ANP-Aktivität von einer reduzierten Aldosteronaktivität auszugehen ist. Diese Beobachtung hätte durch die zusätzliche Bestimmung von Aldosteron von uns gestärkt werden können. Proteinurische Tiere und auch Patienten mit nephrotischem Syndrom wiesen allerdings in einigen Untersuchungen erniedrigte Aldosteronkonzentrationen in der Niere auf (Rodriguez-Iturbe, Colic et al. 1990; Shapiro, Hasbargen et al. 1990), die Datenlage ist hier aber nicht eindeutig. Unter Umständen ist die Aldosteronsynthese in Corin^{-/-} Tieren durch kompensatorische Mechanismen nicht mit den Wildtyp Tieren vergleichbar. Allerdings spricht die Beobachtung der herunterregulierten Komponenten der Signalkaskade in Corin^{-/-} Mäusen für einen Einfluss von Corin auf Aldosteron, so dass die β -ENaC Erhöhung scheinbar nicht auf Aldosteronwirkungen zurückzuführen ist.

In der Zusammenschau betrachtet weisen proteinurische Nierenerkrankungen wie das nephrotische Syndrom und die akute Glomerulonephritis gemeinsame dysregulierte Mechanismen im Sammelrohr auf, die zu pathologischer Volumenretention führen. Einer dieser Mechanismen scheint eine reduzierte Expression von Corin, eine Serinprotease, die Pro-ANP zu ANP aktiviert, zu sein. Die Verminderung geht mit

erhöhter Expression von Komponenten der ANP-Signalkaskade wie PKGII und PDE5 einher, welche zu einer vermehrten β -ENaC Expression in Epithelzellen des Sammelrohrs führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die seit langer Zeit bestehende These der ANP-Resistenz bei proteinurischen Nierenerkrankungen und zeigen die Schlüsselfunktion von Corin bei der Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts bei proteinurischen Nierenerkrankungen auf.

6. Zusammenfassung

Proteinurische Nierenerkrankungen wie das nephrotische und nephritische Syndrom sind klinisch durch massive Natrium- und Volumenretention charakterisiert. Anhand zweier etablierter proteinurischer Tiermodelle, der Puromycin Aminonukleosid induzierten Nephrose (PAN) und der Anti-Thy1 Glomerulonephritis (GN) sollten gemeinsame dysregulierte Mechanismen der Proteinurie untersucht werden. Eine etablierte Hypothese geht davon aus, dass die Proteinurie nicht nur Ausdruck der glomerulären Schädigung sondern auch für die assoziierte Natrium- und Wasserretention verantwortlich ist. Die distalen Tubulusabschnitte, wie der Verbindungstubulus und das Sammelrohr, wurden für die unter Proteinurie auftretende primäre Volumenretention verantwortlich gemacht. Daher wurde eine Microarray Analyse von medullärem Gewebe von PAN und Anti-Thy1 GN Ratten durchgeführt. Corin, eine Serinprotease, die Pro-ANP zu ANP konvertiert, konnte hier signifikant vermindert nachgewiesen werden. Die Hypothese einer unter Proteinurie eintretenden ANP-Resistenz der Niere wurde in der Vergangenheit mehrfach beschrieben und für die primäre Natriumretention unter Proteinurie mitverantwortlich gemacht. In dieser Arbeit wurde die These aufgestellt, dass das verminderte Expressionsniveau von Corin für die ANP-Resistenz verantwortlich sein könnte und die mangelnde Aktivierung des natriuretischen ANP-Systems zu der pathologischen Natrium- und Wasserretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen beitragen könnte. Lokalisationsstudien wiesen Corin im proximalen Tubulus, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL) sowie im Verbindungstubulus und Sammelrohr nach. ANP konnte hingegen nur im Sammelrohr der Nierenmedulla detektiert werden. PAN und Anti-Thy1 GN Tiere wiesen erniedrigte Corin-Expressionslevel bei verminderten ANP und konsekutiv erhöhten Pro-ANP Spiegeln auf, was darauf hindeutete, dass Corin in der Niere genauso wie im Herzen Pro-ANP zu ANP konvertiert. Es wurden Corin-Knock-Out (Corin^{-/-}) Tiere verwendet, um die Bedeutung reduzierter Corin-Expressionslevel in der Niere zu untersuchen und die Ergebnisse auf die proteinurischen Tiermodelle übertragen zu können. Es zeigte sich ein gesteigertes Expressionsniveau von β -ENaC, einer Untereinheit des im Sammelrohr lokalisierten und in der Vergangenheit für die pathologische Volumenretention verantwortlich gemachten Aldosteron-sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC). Diese Beobachtung konnte ebenfalls in PAN und

Anti-Thy1 GN Tieren gemacht werden. Corin aktiviert Pro-ANP zu dem physiologisch aktiven ANP, das nach Freisetzung an den natriuretic peptide receptor (NPR)-A bindet und die Synthese des intrazellulären second-messengers cGMP stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die mangelnde Aktivierung von ANP durch verminderte Corin-Expressionslevel zur Beeinträchtigung der ANP-Signalkaskade führt. Komponenten der Signalkaskade, wie PDE-5, p-PDE5 und PKGII waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen im Corin^{-/-} Modell und in einer cGMP-verarmten Zellkultur, die verminderte ANP Bindung imitierte, deutlich erhöht. Durch die Transfektion von mpkCCD_{CL4} Zellen mit PDE-5 und PKGII konnte ein Zusammenhang zwischen der unter Proteinurie und im Corin^{-/-} Modell beobachteten β -ENaC Erhöhung hergestellt werden und schließlich gelang die Darstellung der veränderten Komponenten PDE5 und p-PDE der ANP-Signalkaskade auch in den proteinurischen PAN und Anti-Thy1 GN Tieren. In der Zusammenschau betrachtet weisen proteinurische Nierenerkrankungen wie das nephrotische Syndrom und die akute Glomerulonephritis gemeinsame dysregulierte Mechanismen im Sammelrohr auf, die zu pathologischer Volumenretention führen. Einer dieser Mechanismen scheint die reduzierte Expression von Corin zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die seit langer Zeit bestehende These der ANP-Resistenz bei proteinurischen Nierenerkrankungen und zeigen die Schlüsselfunktion von Corin bei der Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts bei proteinurischen Nierenerkrankungen auf.

7. Literaturverzeichnis

- Amsellem, S., J. Gburek, G. Hamard, et al. (2010). "Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule." J Am Soc Nephrol **21**(11): 1859-67.
- Apostol, E., C. A. Ecelbarger, J. Terris, et al. (1997). "Reduced renal medullary water channel expression in puromycin aminonucleoside--induced nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **8**(1): 15-24.
- Audige, A., Z. R. Yu, B. M. Frey, et al. (2003). "Epithelial sodium channel (ENaC) subunit mRNA and protein expression in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome." Clin Sci (Lond) **104**(4): 389-95.
- Bagchus, W. M., P. J. Hoedemaeker, J. Rozing and W. W. Bakker (1986). "Acute glomerulonephritis after intravenous injection of monoclonal anti-thymocyte antibodies in the rat." Immunol Lett **12**(2-3): 109-13.
- Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 710-8.
- Beltman, J., D. E. Becker, E. Butt, et al. (1995). "Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic GMP analogs: topology of the catalytic domains." Mol Pharmacol **47**(2): 330-9.
- Besse-Eschmann, V., J. Klisic, V. Nief, et al. (2002). "Regulation of the proximal tubular sodium/proton exchanger NHE3 in rats with puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **13**(9): 2199-206.
- Bianchi, C., G. Thibault, E. Wrobel-Konrad, et al. (1989). "Atrial natriuretic factor binding sites in experimental congestive heart failure." Am J Physiol **257**(4 Pt 2): F515-23.
- Border, W. A., S. Okuda, L. R. Languino, M. B. Sporn and E. Ruoslahti (1990). "Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1." Nature **346**(6282): 371-4.
- Brandt, J., J. Pippin, M. Schulze, et al. (1996). "Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis." Kidney Int **49**(2): 335-43.
- Brenner, B. M., B. J. Ballermann, M. E. Gunning and M. L. Zeidel (1990). "Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide." Physiol Rev **70**(3): 665-99.
- Brunkhorst, R., M. Schulze and J. Floege (2000). Klinische Verlaufsformen glomerulärer Erkrankungen. Klinische Nephrologie. Koch. München, Urban & Fischer: 168-175; 182-185.
- Buerkert, J., D. R. Martin, D. Trigg and E. E. Simon (1991). "Sodium handling by deep nephrons and the terminal collecting duct in glomerulonephritis." Kidney Int **39**(5): 850-7.
- Cachofeiro, V., E. L. Schiffrin, M. Cantin and R. Garcia (1990). "Glomerular and vascular atrial natriuretic factor receptors in cardiomyopathic hamsters: correlation with the peptide biological effects." Cardiovasc Res **24**(10): 843-50.
- Castro, L. R., J. Schittl and R. Fischmeister (2010). "Feedback Control Through cGMP-Dependent Protein Kinase Contributes to Differential Regulation and Compartmentation of cGMP in Rat Cardiac Myocytes." Circ Res **107**(10): 1232-40.
- Chalumeau, C., D. du Cheyron, N. Defontaine, et al. (2001). "NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule." Am J Physiol Renal Physiol **280**(2): F283-90.
- Chan, J. C., O. Knudson, F. Wu, et al. (2005). "Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 785-90.
- Cohen, D., G. Y. Koh, L. N. Nikonova, J. G. Porter and T. Maack (1996). "Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides." J Biol Chem **271**(16): 9863-9.

- Couser, W. G. (1999). "Glomerulonephritis." Lancet **353**(9163): 1509-15.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress and H. Sonnenberg (1981). "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats." Life Sci **28**(1): 89-94.
- de Bold, A. J., M. L. de Bold and I. R. Sarda (1986). "Functional-morphological studies on in vitro cardionatriin release." J Hypertens Suppl **4**(2): S3-7.
- Deschenes, G., S. Gonin, E. Zolty, et al. (2001). "Increased synthesis and avp unresponsiveness of Na,K-ATPase in collecting duct from nephrotic rats." J Am Soc Nephrol **12**(11): 2241-52.
- Dorhout, E. J., J. C. Roos, P. Boer, O. H. Yoe and T. A. Simatupang (1979). "Observations on edema formation in the nephrotic syndrome in adults with minimal lesions." Am J Med **67**(3): 378-84.
- Drewett, J. G. and D. L. Garbers (1994). "The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands." Endocr Rev **15**(2): 135-62.
- Duc, C., N. Farman, C. M. Canessa, J. P. Bonvalet and B. C. Rossier (1994). "Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1907-21.
- Edwards, B. S., R. S. Zimmerman, T. R. Schwab, D. M. Heublein and J. C. Burnett, Jr. (1988). "Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor." Circ Res **62**(2): 191-5.
- Fernandez-Llama, P., P. Andrews, C. A. Ecelbarger, S. Nielsen and M. Knepper (1998). "Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na⁺ transporters." Kidney Int **54**(1): 170-9.
- Frei, U. and H. Schober-Halstenberg (2006). Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006. QuaSi-Niere gGmbH Berlin. Berlin.
- Frenk, S., I. Antonowicz, J. M. Craig and J. Metcalf (1955). "Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside; renal lesions and body electrolyte composition." Proc Soc Exp Biol Med **89**(3): 424-7.
- Füllekrug, J. and K. Simons (2004). "Lipid rafts and apical membrane traffic." Ann N Y Acad Sci **1014**: 164-9.
- Fukuda, K., T. Yanagida, S. Okuda, et al. (1996). "Role of endothelin as a mitogen in experimental glomerulonephritis in rats." Kidney Int **49**(5): 1320-9.
- Gadau, J., H. Peters, C. Kastner, et al. (2009). "Mechanisms of tubular volume retention in immune-mediated glomerulonephritis." Kidney Int **75**(7): 699-710.
- Gambaryan, S., E. Butt, K. Marcus, et al. (2003). "cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene." J Biol Chem **278**(32): 29640-8.
- Gambaryan, S., C. Wagner, A. Smolenski, et al. (1998). "Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 9003-8.
- Gekle, M., S. Mildenberger, R. Freudinger, G. Schwerdt and S. Silbernagl (1997). "Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases." Am J Physiol **272**(5 Pt 2): F668-77.
- Goy, M. F., P. M. Oliver, K. E. Purdy, et al. (2001). "Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide." Biochem J **358**(Pt 2): 379-87.
- Grond, J., E. W. Muller, H. van Goor, J. J. Weening and J. D. Elema (1988). "Differences in puromycin aminonucleoside nephrosis in two rat strains." Kidney Int **33**(2): 524-9.

- Haller, H. and W. Gross (2003). "Glomerulonephritis." Der Internist **44**: 1073-4.
- Harris, P. J., D. Thomas and T. O. Morgan (1987). "Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption." Nature **326**(6114): 697-8.
- Haseley, L. A., C. Hugo, M. A. Reidy and R. J. Johnson (1999). "Dissociation of mesangial cell migration and proliferation in experimental glomerulonephritis." Kidney Int **56**(3): 964-72.
- Hierholzer, K. and M. Fromm, Eds. (2005). Funktionen der Nieren. Physiologie des Menschen, Springer Heidelberg.
- Hollister, A. S., I. Tanaka, T. Imada, et al. (1986). "Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels." Hypertension **8**(6 Pt 2): 1106-11.
- Hricik, D. E., M. Chung-Park and J. R. Sedor (1998). "Glomerulonephritis." N Engl J Med **339**(13): 888-99.
- Hughey, R. P., G. M. Mueller, J. B. Bruns, et al. (2003). "Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits." J Biol Chem **278**(39): 37073-82.
- Ibrahim, H., M. Rosenberg and T. Hostetter (2000). Proteinuria. Seldin (ed.). The Kidney, Raven Press New York. **3rd ed.** : 2269-94
- Ichikawa, I., H. G. Rennke, J. R. Hoyer, et al. (1983). "Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome." J Clin Invest **71**(1): 91-103.
- Imada, T., R. Takayanagi and T. Inagami (1988). "Atrioactivase, a specific peptidase in bovine atria for the processing of pro-atrial natriuretic factor. Purification and characterization." J Biol Chem **263**(19): 9515-9.
- Jefferson, J. A. and R. J. Johnson (1999). "Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy1.1 model)." J Nephrol **12**(5): 297-307.
- Jentsch, T. J., C. A. Hubner and J. C. Fuhrmann (2004). "Ion channels: function unravelled by dysfunction." Nat Cell Biol **6**(11): 1039-47.
- Johnson, R. J., R. L. Garcia, P. Pritzl and C. E. Alpers (1990). "Platelets mediate glomerular cell proliferation in immune complex nephritis induced by anti-mesangial cell antibodies in the rat." Am J Pathol **136**(2): 369-74.
- Johnson, R. J., H. Iida, C. E. Alpers, et al. (1991). "Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation." J Clin Invest **87**(3): 847-58.
- Johnson, R. J., E. W. Raines, J. Floege, et al. (1992). "Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor." J Exp Med **175**(5): 1413-6.
- Joubert, S., J. Labrecque and A. De Lean (2001). "Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor." Biochemistry **40**(37): 11096-105.
- Kastner, C., M. Pohl, M. Sendeski, et al. (2009). "Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental glomerulonephritis." Am J Physiol Renal Physiol **296**(4): F902-11.
- Kim, S. W., S. de Seigneux, M. C. Sassen, et al. (2006). "Increased apical targeting of renal ENaC subunits and decreased expression of 11betaHSD2 in HgCl₂-induced nephrotic syndrome in rats." Am J Physiol Renal Physiol **290**(3): F674-87.
- Kim, S. W., W. Wang, J. Nielsen, et al. (2004). "Increased expression and apical targeting of renal ENaC subunits in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats." Am J Physiol Renal Physiol **286**(5): F922-35.
- Kliscic, J., J. Zhang, V. Nief, et al. (2003). "Albumin regulates the Na⁺/H⁺ exchanger 3 in OKP cells." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3008-16.
- Knepper, M. A. and H. L. Brooks (2001). "Regulation of the sodium transporters NHE3,

- NKCC2 and NCC in the kidney." Curr Opin Nephrol Hypertens **10**(5): 655-9.
- Knotek, M., B. Rogachev, M. Ohara and R. W. Schrier (2000). "[Mechanisms of renal retention of sodium and water in heart failure, cirrhosis and pregnancy]." Lijec Vjesn **122**(1-2): 20-6.
- Koepke, J. P. and G. F. DiBona (1987). "Blunted natriuresis to atrial natriuretic peptide in chronic sodium-retaining disorders." Am J Physiol **252**(5 Pt 2): F865-71.
- Koller, K. J., D. G. Lowe, G. L. Bennett, et al. (1991). "Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP)." Science **252**(5002): 120-3.
- Kotera, J., K. Fujishige, Y. Imai, et al. (1999). "Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases." Eur J Biochem **262**(3): 866-73.
- Krishnamurti, U., B. Zhou, W. W. Fan, et al. (2001). "Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells." J Am Soc Nephrol **12**(4): 758-66.
- Kriz, W. (2003). "Progression of chronic renal failure in focal segmental glomerulosclerosis: consequence of podocyte damage or of tubulointerstitial fibrosis?" Pediatr Nephrol **18**(7): 617-22.
- Kriz, W. and M. LeHir (2005). "Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases- insights from animal models." Kidney Int **67**(2): 404-19.
- Kudo, T. and A. Baird (1984). "Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor." Nature **312**(5996): 756-7.
- Kuhlmann, U. and D. Walb (2008). Nephrologie: Pathophysiologie- Klinik- Nierenersatzverfahren, Thieme.
- Lachance, D., R. Garcia, J. Gutkowska, M. Cantin and G. Thibault (1986). "Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces." Biochem Biophys Res Commun **135**(3): 1090-8.
- Lee, E. Y. and M. H. Humphreys (1996). "Phosphodiesterase activity as a mediator of renal resistance to ANP in pathological salt retention." Am J Physiol **271**(1 Pt 2): F3-6.
- Levi, M., B. M. Baird and P. V. Wilson (1990). "Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport." J Clin Invest **85**(1): 231-7.
- Levin, E. R., D. G. Gardner and W. K. Samson (1998). "Natriuretic peptides." N Engl J Med **339**(5): 321-8.
- Light, D. B., J. D. Corbin and B. A. Stanton (1990). "Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase." Nature **344**(6264): 336-9.
- Liu, F. Y. and M. G. Cogan (1990). "Role of angiotensin II in glomerulotubular balance." Am J Physiol **259**(1 Pt 2): F72-9.
- Lotscher, M., Y. Scarpetta, M. Levi, et al. (1999). "Rapid downregulation of rat renal Na/P(i) cotransporter in response to parathyroid hormone involves microtubule rearrangement." J Clin Invest **104**(4): 483-94.
- Lowe, D. G., M. S. Chang, R. Hellmiss, et al. (1989). "Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction." EMBO J **8**(5): 1377-84.
- Lu, C., S. Pribanic, A. Debonneville, C. Jiang and D. Rotin (2007). "The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool." Traffic **8**(9): 1246-64.
- Marin-Grez, M., J. T. Fleming and M. Steinhausen (1986). "Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney." Nature **324**(6096): 473-6.
- Marsh, J. B. (2002). "Lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome." Front Biosci **7**: e326-38.
- Martin, J. L., D. Thomas and R. E. Colindres (2003). "Immunotactoid glomerulopathy in an

- HIV-positive African-American man." Am J Kidney Dis **42**(6): E6-10.
- Masilamani, S., M. Knepper and M. Burg (2000). "Urine concentration and dilution." Brenner (ed.). The kidney. Saunders Philadelphia **6th ed.**: 595-638.
- Meneton, P., J. Loffing and D. G. Warnock (2004). "Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule." Am J Physiol Renal Physiol **287**(4): F593-601.
- Messina, A., D. J. Davies, P. C. Dillane and G. B. Ryan (1987). "Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis." Am J Pathol **126**(2): 220-9.
- Muller, D., A. K. Mukhopadhyay, R. C. Speth, et al. (2004). "Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis." Endocrinology **145**(3): 1392-401.
- Nagase, M., T. Katafuchi, S. Hirose and T. Fujita (1997). "Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **15**(11): 1235-43.
- Nakayama, H., T. Oite, H. Kawachi, et al. (1998). "Comparative nephritogenicity of two monoclonal antibodies that recognize different epitopes of rat Thy1.1 molecule." Nephron **78**(4): 453-63.
- Nedvetsky, P. I., G. Tamma, S. Beulshausen, et al. (2009). "Regulation of aquaporin-2 trafficking." Handb Exp Pharmacol(190): 133-57.
- Ni, X. P., M. Safai, D. G. Gardner and M. H. Humphreys (2001). "Increased cGMP phosphodiesterase activity mediates renal resistance to ANP in rats with bile duct ligation." Kidney Int **59**(4): 1264-73.
- Ni, X. P., M. Safai, R. Rishi, C. Baylis and M. H. Humphreys (2004). "Increased activity of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) contributes to resistance to atrial natriuretic peptide natriuresis in the pregnant rat." J Am Soc Nephrol **15**(5): 1254-60.
- Nie, H. G., W. Zhang, D. Y. Han, et al. (2010). "8-pCPT-cGMP stimulates alphabeta-gamma-ENaC activity in oocytes as an external ligand requiring specific nucleotide moieties." Am J Physiol Renal Physiol **298**(2): F323-34.
- Nielsen, S., B. L. Smith, E. I. Christensen, M. A. Knepper and P. Agre (1993). "CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron." J Cell Biol **120**(2): 371-83.
- Ogihara, T., J. Shima, H. Hara, et al. (1986). "Significant increase in plasma immunoreactive atrial natriuretic polypeptide concentration during head-out water immersion." Life Sci **38**(26): 2413-8.
- Orce, G. G., G. A. Castillo and H. S. Margolius (1980). "Inhibition of short-circuit current in toad urinary bladder by inhibitors of glandular kallikrein." Am J Physiol **239**(5): F459-65.
- Orth, S. R. and E. Ritz (1998). "The nephrotic syndrome." N Engl J Med **338**(17): 1202-11.
- Passero, C. J., G. M. Mueller, H. Rondon-Berrios, et al. (2008). "Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit." J Biol Chem **283**(52): 36586-91.
- Paul, L. C., H. G. Rennke, E. L. Milford and C. B. Carpenter (1984). "Thy1.1 in glomeruli of rat kidneys." Kidney Int **25**(5): 771-7.
- Perico, N., F. Delaini, C. Lupini, et al. (1989). "Blunted excretory response to atrial natriuretic peptide in experimental nephrosis." Kidney Int **36**(1): 57-64.
- Perico, N., F. Delaini, C. Lupini and G. Remuzzi (1987). "Renal response to atrial peptides is reduced in experimental nephrosis." Am J Physiol **252**(4 Pt 2): F654-60.
- Perico, N. and G. Remuzzi (1993). "Edema of the nephrotic syndrome: the role of the atrial peptide system." Am J Kidney Dis **22**(3): 355-66.
- Peterson, C., B. Madsen, A. Perlman, A. Y. Chan and B. D. Myers (1988). "Atrial natriuretic peptide and the renal response to hypervolemia in nephrotic humans." Kidney Int **34**(6): 825-31.
- Pippin, J. W., Q. Qu, L. Meijer and S. J. Shankland (1997). "Direct in vivo inhibition of the

- nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist." J Clin Invest **100**(10): 2512-20.
- Pochynyuk, O., A. Staruschenko, V. Bugaj, L. Lagrange and J. D. Stockand (2007). "Quantifying RhoA facilitated trafficking of the epithelial Na⁺ channel toward the plasma membrane with total internal reflection fluorescence-fluorescence recovery after photobleaching." J Biol Chem **282**(19): 14576-85.
- Porth, C. (2007). Disorders of renal function. Essentials of Pathophysiology. Porth. Lipincott, Williams&Wilkins. 2nd ed: 459-79.
- Potter, L. R. (2005). "Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation." Front Biosci **10**: 1205-20.
- Potter, L. R., A. R. Yoder, D. R. Flora, L. K. Antos and D. M. Dickey (2009). "Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications." Handb Exp Pharmacol(191): 341-66.
- Rinne, A., O. Vuolteenaho, M. Jarvinen, A. Dorn and O. Arjamaa (1986). "Atrial natriuretic polypeptides in the specific atrial granules of the rat heart: immunohistochemical and immunoelectron microscopical localization and radioimmunological quantification." Acta Histochem **80**(1): 19-28.
- Rodriguez-Iturbe, B., D. Colic, G. Parra and J. Gutkowska (1990). "Atrial natriuretic factor in the acute nephritic and nephrotic syndromes." Kidney Int **38**(3): 512-7.
- Rodriguez-Iturbe, B., A. Ferrebuz, V. Vanegas, et al. (2005). "Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage." Kidney Int **68**(5): 2131-42.
- Rose, B. and S. Fletcher (2010). Evaluation of isolated proteinuria in adults UpToDate. M. Alice M Sheridan.
- Rose, B. D. (1994). "Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders/ Burton David Rose, Theodore W. Post." New York : McGraw-Hill, Medical Pub. Division, c2001. 5th ed.
- Rossier, B. C. (1997). "1996 Homer Smith Award Lecture. Cum grano salis: the epithelial sodium channel and the control of blood pressure." J Am Soc Nephrol **8**(6): 980-92.
- Ryan, G. B. and M. J. Karnovsky (1975). "An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis." Kidney Int **8**(4): 219-32.
- Saito, A., H. Sato, N. Iino and T. Takeda (2010). "Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium." J Biomed Biotechnol **2010**: 403272.
- Schuck, S. and K. Simons (2004). "Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5955-64.
- Schulz, S., S. Singh, R. A. Bellet, et al. (1989). "The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family." Cell **58**(6): 1155-62.
- Sei, C. A., G. L. Hand, S. F. Murray and C. C. Glembotski (1992). "The cosecretional maturation of atrial natriuretic factor by primary atrial myocytes." Mol Endocrinol **6**(3): 309-19.
- Shankland, S. J., C. Hugo, S. R. Coats, et al. (1996). "Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis." Kidney Int **50**(4): 1230-9.
- Shapiro, M. D., J. Hasbargen, J. Hensen and R. W. Schrier (1990). "Role of aldosterone in the sodium retention of patients with nephrotic syndrome." Am J Nephrol **10**(1): 44-8.
- Shimizu, A., H. Kitamura, Y. Masuda, et al. (1995). "Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis." Kidney Int **47**(1): 114-21.
- Silver, M. A. (2006). "The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(1): 14-21.

- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.
- Singer, D. R., N. D. Markandu, M. G. Buckley, et al. (1998). "Contrasting endocrine responses to acute oral compared with intravenous sodium loading in normal humans." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): F1111-9.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Soualmia, H., C. Barthelemy, F. Masson, et al. (1997). "Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue." J Cardiovasc Pharmacol **29**(5): 605-11.
- Stasch, J. P., C. Hirth-Dietrich, S. Kazda and D. Neuser (1989). "Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo." Life Sci **45**(10): 869-75.
- Suga, S., K. Nakao, K. Hosoda, et al. (1992). "Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide." Endocrinology **130**(1): 229-39.
- Svenningsen, P., C. Bistrup, U. G. Friis, et al. (2009). "Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel." J Am Soc Nephrol **20**(2): 299-310.
- Terada, Y., T. Moriyama, B. M. Martin, M. A. Knepper and A. Garcia-Perez (1991). "RT-PCR microlocalization of mRNA for guanylyl cyclase-coupled ANF receptor in rat kidney." Am J Physiol **261**(6 Pt 2): F1080-7.
- Tervonen, V., O. Arjamaa, K. Kokkonen, H. Ruskoaho and O. Vuolteenaho (1998). "A novel cardiac hormone related to A-, B- and C-type natriuretic peptides." Endocrinology **139**(9): 4021-5.
- Thews, O., F. Zywietz, B. Lecher and P. Vaupel (1999). "Quantitative changes of metabolic and bioenergetic parameters in experimental tumors during fractionated irradiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **45**(5): 1281-8.
- Tremblay, J., R. Gerzer, P. Vinay, et al. (1985). "The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase." FEBS Lett **181**(1): 17-22.
- Tsukada, T. and Y. Takei (2006). "Integrative approach to osmoregulatory action of atrial natriuretic peptide in seawater eels." Gen Comp Endocrinol **147**(1): 31-8.
- Tsunoda, K., F. A. Mendelsohn, P. M. Sexton, et al. (1988). "Decreased atrial natriuretic peptide binding in renal medulla in rats with chronic heart failure." Circ Res **62**(1): 155-61.
- Tulassay, T., W. Rascher, R. E. Lang, H. W. Seyberth and K. Scharer (1987). "Atrial natriuretic peptide and other vasoactive hormones in nephrotic syndrome." Kidney Int **31**(6): 1391-5.
- Valentin, J. P., C. Qiu, W. P. Muldowney, et al. (1992). "Cellular basis for blunted volume expansion natriuresis in experimental nephrotic syndrome." J Clin Invest **90**(4): 1302-12.
- Valentin, J. P., W. Z. Ying, W. G. Couser and M. H. Humphreys (1998). "Extrarenal resistance to atrial natriuretic peptide in rats with experimental nephrotic syndrome." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): F556-63.
- Wagner, J., C. Dechow, C. Morath, et al. (2000). "Retinoic acid reduces glomerular injury in a rat model of glomerular damage." J Am Soc Nephrol **11**(8): 1479-87.
- Wakasugi, M., H. Kawachi, S. Omori, et al. (1999). "Expression of the molecule detectable by anti-propolypeptide of von Willebrand factor antibody in rat mesangial cells in anti-Thy 1.1 mAb 1-22-3 induced glomerulonephritis: A marker of injured mesangial cells." Nephron **82**(4): 338-47.
- Welker, P., B. Geist, J. H. Fruhauf, et al. (2007). "Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(3): R1328-37.

- Wu, F., W. Yan, J. Pan, J. Morser and Q. Wu (2002). "Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes." J Biol Chem **277**(19): 16900-5.
- Yan, W., N. Sheng, M. Seto, J. Morser and Q. Wu (1999). "Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart." J Biol Chem **274**(21): 14926-35.
- Yan, W., F. Wu, J. Morser and Q. Wu (2000). "Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8525-9.
- Yang-Feng, T. L., G. Floyd-Smith, M. Nemer, J. Drouin and U. Francke (1985). "The pronatriodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4." Am J Hum Genet **37**(6): 1117-28.
- Yechieli, H., L. Kahana, A. Haramati, A. Hoffman and J. Winaver (1993). "Regulation of renal glomerular and papillary ANP receptors in rats with experimental heart failure." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): F119-25.
- Yoshizawa, N. (2000). "Acute glomerulonephritis." Intern Med **39**(9): 687-94.
- Yu, Z., M. Schumacher, B. M. Frey, F. J. Frey and B. Vogt (2005). "Regulation of epithelial sodium channel in puromycin aminonucleoside-induced unilateral experimental nephrotic syndrome in normal and analbuminemic Nagase rats." Nephron Physiol **101**(3): p51-62.
- Zhao, D., K. N. Pandey and L. G. Navar (2010). "ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor." Am J Physiol Renal Physiol **298**(1): F103-8.

Erklärung

„Ich, Danny Bernd Polzin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: `Verminderte renale Corin-Expression trägt zur Volumenretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen` bei selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Publikationsliste

Publikationen in Erstautorschaft:

1: Polzin D, Oppert M, Luft FC, Kettritz R. **Atrial fibrillation after a soccer match. Hypokalemic thyrotoxic periodic paralysis (TPP).**

Kidney Int. 2011 May;79(9):1033-4. PubMed PMID: 21490614.

2: Polzin D, Kaminski HJ, Kastner C, Wang W, Krämer S, Gambaryan S, Russwurm M, Peters H, Wu Q, Vandewalle A, Bachmann S, Theilig F. **Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases.**

Kidney Int. 2010 Oct;78(7):650-9. Epub 2010 Jul 7. PubMed PMID: 20613715.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.