

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

DISSERTATION

**Regulation und Wirkung von Annexin A1 in der
Macula densa**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Saskia Seidel

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. S. Bachmann
 2. Prof. Dr. W. H. Castrop
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. E. Klußmann

Datum der Promotion: 22.03.2013

Im Text verwendete Abkürzungen	5
1 Einleitung	7
1.1 Anatomie des JGA	7
1.2 Der TGF-Mechanismus	9
1.3 Die Adaptation des TGF	12
1.4 Regulation von PGE2	13
1.5 Annexin A1	14
1.5.1 Struktur von ANXA1.....	15
1.5.2 Einfluss von ANXA1 auf die Prostaglandinsynthese.....	16
1.5.3 ANXA1 in der Niere.....	19
2 Herleitung der Aufgabenstellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Versuchstiere und Behandlung	21
3.1.1 Versuchstiere für die Untersuchung von Furosemid in Sprague Dawley-Ratten.....	21
3.1.2 ANXA1-defiziente Mäuse.....	21
3.2 Perfusionsfixierung und Gewebepreparation	22
3.3 Zellkultur	23
3.4 Morphologische Analysetechniken	24
3.4.1 Diaphorasereaktion.....	24
3.4.2 Immunhistochemische Darstellungsverfahren.....	25
3.4.2.1 Primäre Antikörper.....	25
3.4.2.2 Sekundäre Antikörper.....	26
3.4.2.3 Antikörperinkubation und Quantifizierung der Signale.....	26
3.4.2.3.1 Vorbereitung der Nierenschnitte für die Immunhistochemie.....	26
3.4.2.3.2 Vorbereitung der MMDD1 für die Immunhistochemie.....	27
3.4.2.3.3 Immunfluoreszenz.....	27
3.4.2.3.4 Peroxidasefärbung.....	27
3.4.2.3.5 Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Auswertung.....	28
3.5.5 ANXA1-mRNA-In-Situ-Hybridisierung.....	28
3.5.5.1 Amplifikation ANXA1-cDNA.....	28
3.5.5.2 Transkription.....	29
3.5.5.3 Hybridisierung.....	30
3.5.5.4 Waschen der Gewebsschnitte zur Entfernung nicht-hybridisierter mRNA-Proben.....	31
3.5.5.5 Detektion der hybridisierten mRNA-Proben.....	31
3.5 Analyse der Genexpression in der Macula densa	32
3.5.1 RT-PCR.....	32
3.5.2 PCR.....	33
3.5.3 Taqman.....	34
3.6 Zellkulturexperimente	34
3.6.1 Substanzen zur Stimulation der MMDD1.....	35
3.6.2 Transfektion des ANXA1-Plasmids.....	36
3.6.3 Proteinfällung aus dem Medium.....	37
3.6.4 Western-Blot.....	38
3.7 Live-Cell-Imaging	40
3.8. Präsentation der Daten und statistische Bearbeitung	40

4	Resultate	41
4.1	ANXA1-, COX-2- und PLA2G4-Lokalisation	41
4.1.1	<i>ANXA1-Peroxidasefärbung</i>	41
4.1.2	<i>ANXA1-In-Situ-Hybridisierung</i>	44
4.1.3	<i>ANXA1-Immunfluoreszenz in Doppelmarkierung mit NOS1</i>	44
4.1.4	<i>ANXA1-, COX-2- und PLA2G4-Immunfluoreszenz</i>	44
4.2	Einfluss des Salztransports in der Macula densa auf die ANXA1- und COX-2-Expression	46
4.2.1	<i>ANXA1- und COX-2-Expression nach Furosemid-Behandlung im Tiermodell</i>	46
4.2.2	<i>Behandlung der MMDD1 mit Furosemid und Chlorid-freier Lösung</i>	49
4.3	Regulation von COX-2 und Renin durch ANXA1	51
4.3.1	<i>COX-2 in der ANXA1-/- Maus</i>	51
4.3.2	<i>Renin in der ANXA1-/- Maus</i>	53
4.3.3	<i>Überexpression von ANXA1 in MMDD1</i>	53
4.4	Einfluss von DXM auf ANXA1 und COX-2 in der Macula densa	56
4.4.1	<i>Einfluss von DXM auf MMDD1-ANXA1-Expression und -Sekretion</i>	56
4.4.2	<i>Einfluss von DXM auf die MMDD1-COX-2 Expression</i>	58
4.5	Sekretion und intrazelluläre Regulation von ANXA1	59
4.6	Wirkung des ANXA1-Rezeptors	60
4.7	Intrazelluläre Regulation von ANXA1	62
5	Diskussion	65
5.1	Lokalisation von ANXA1, COX-2 und PLA2G4 in der Niere	65
5.2	Regulation von ANXA1 und COX-2 in der Macula densa	67
5.3	Regulation von COX-2 durch ANXA1	70
5.4	Einfluss von DXM auf ANXA1-Sekretion in der Macula densa	72
5.5	Wirkung der ANXA1-Rezeptoren	74
5.6	Regulation von Renin durch ANXA1	75
6	Zusammenfassung	75
	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung	85
	Eidesstaatliche Erklärung	86
	Lebenslauf	87
	Anhang: Publikationsliste	88

Im Text verwendete Abkürzungen

AC2-26	N-terminales ANXA1-Peptid
ANXA1	Annexin A1
ANXA1-/- Maus	ANXA1-defiziente Maus
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ABCA1	ATP-Bindekassettentransporter Gruppe A, Nummer 1
BCA	2,2-Bichinolin-4,4-dicarbonsäure
bp	base pairs, Basenpaare
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNS
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	cAMP-responsive element binding-Protein
CyH	Cyclosporin H
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrachlorid-Dihydrat
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DNS
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DXM	Dexamethason
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum, fetales Kälber-Serum
Fpr	muriner Formyl-Peptid-Rezeptor
FPR	humaner Formyl-Peptid-Rezeptor
fMLF	Peptid N-Formyl-Met-Leu-Phe
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HCl	Salzsäure
HDL	High Density-Lipoproteinen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish-peroxidase, Meerrettichperoxidase
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KCl	Kaliumchlorid

MilliQ	RNAse freies, zweifach destilliertes Wasser
MMDD1	immortalisierte Macula densa-Zellen der Maus
mRNA	messenger RNA, Boten-RNS
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transporter
NO	Stickstoffmonoxid
NOS1	Stickstoffmonoxid-Synthase 1
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
PBS	Phosphat-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
PLA2G4	Phospholipase A2 Gruppe 4
PLCβ	β-Isoform der Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem
ROMK	renal outer medullary potassium channel, renaler Kaliumkanal der äußeren Medulla
RNA	RNS
SD-Ratten	Sprague Dawley-Ratten
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAL	thick ascending limb, dicker aufsteigender Teil der Henleschen Schleife
TEA	Triethanolamin
TGF	tubuloglomerulärer Feedback
VDACL	volume-dependent ATP-conductive large conductance anion channel, basolateraler Maxi-Anionen-Transporter
WRW4	Peptid Trp-Arg-Trp-Trp-Trp
WT	Wildtyp-Tiere

1 Einleitung

Zu den zentralen Aufgaben der Niere gehört neben der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen auch die Steuerung des Volumenstatus des extrazellulären Raumes. Die Voraussetzung für die effiziente Arbeit der Niere ist eine konstante glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Die wichtigste intrarenale Kontroll- und Steuereinrichtung für die GFR ist der juxtaglomeruläre Apparat (JGA).¹

1.1 Anatomie des JGA

Der JGA ist ein Komplex spezialisierter anatomischer Strukturen, die sich am Gefäßpol des Glomerulums formieren (Abbildung 1). Im JGA besitzt das Tubulussystem des Nephrons Anschluss an das Glomerulum, aus dem es ursprünglich hervorgegangen ist. Der JGA besteht aus den Zellen der Macula densa, dem extraglomerulärem Mesangium und einer Gefäßeinheit, welche die afferente und die efferente Arteriole enthält. Die im terminalen Ende der afferenten Arteriole angesiedelten granulären Zellen sind ebenfalls Bestandteil des JGA.¹⁻³ Im JGA wird die glomeruläre Filtrationsrate an die Reabsorptionskapazität des zugehörigen Nephrons angepasst. Eine weitere wichtige Aufgabe des JGA ist die Synthese und Freisetzung von Renin, welches als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) wirkt und damit eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation spielt. Im JGA werden dafür verschiedene lokale und systemische Signale integriert.^{3,4} Lokale Signale entstehen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit, welche durch die GFR und die Reabsorptionsvorgänge der vorgeschalteten Nephronabschnitte moduliert wird.

Die Urinproduktion beginnt im Glomerulum mit der Bildung eines Ultrafiltrates, welches in seiner Elektrolytzusammensetzung dem Plasma entspricht. Dieses tritt dann am Harnpol des Glomerulums in den proximalen Tubulus über, in dem der größte Teil der filtrierte Natrium- und Wassermenge wieder resorbiert wird. Der dicke aufsteigende Teil der Henleschen Schleife (thick ascending limb, TAL) ist durch seine besondere Oberflächenstruktur und spezialisierte Zell-Zell-Verbindungen wasserundurchlässig. Durch eine aktive Reabsorption von Natriumchlorid (NaCl) wird die Tubulusflüssigkeit im TAL effektiv verdünnt. Dadurch ist die Salzkonzentration des Filtrats im kortikalen TAL geringer als die

des Serums und erreicht im terminalen Abschnitt des TAL ein Minimum. Als Sensor für den Salzgehalt der Tubulusflüssigkeit im JGA dient die Macula densa, eine Ansammlung von 20-30 spezialisierten Epithelzellen, welche sich sowohl morphologisch, als auch funktionell von den umliegenden Zellen der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife unterscheiden.¹ Der basolaterale Teil der Macula densa-Zellen ist der extrazellulären Flüssigkeit ausgesetzt und hat Kontakt zu den Zellen des extraglomerulären Mesangiums, den glatten Gefäßmuskelzellen der Arteriolen und den Renin-produzierenden granulierten Zellen der afferenten Arteriole.^{2,3,5,6} Der apikale Anteil ist der tubulären Flüssigkeit ausgesetzt, welche an dieser Stelle durch die Reabsorptionsvorgänge in den vorgeschalteten Nephronabschnitten sehr niedrige und stark schwankende Salzkonzentrationen aufweist.^{1,7} Die Schwankungen der Salzkonzentration resultieren dabei aus unterschiedlichen Filtratmengen in Abhängigkeit von Blutdruckänderungen und der Resorptionsleistung der vorangehenden Nephronabschnitte. Eine zentrale Aufgabe des JGA ist die Anpassung der glomerulären Filtrationsrate an die Reabsorptionskapazität des zugehörigen Nephrons durch den sogenannten tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus (TGF). Durch diesen Regelkreis wird gewährleistet, dass die Flüssigkeits- und Salzmenge, welche in die anschließenden Nephronabschnitte eintritt, konstant bleibt. Damit wird eine effektive Funktion der weiter distal gelegenen Nephronabschnitte, in denen die Reabsorption von Salz hormonellen Einflüssen unterliegt, ermöglicht.

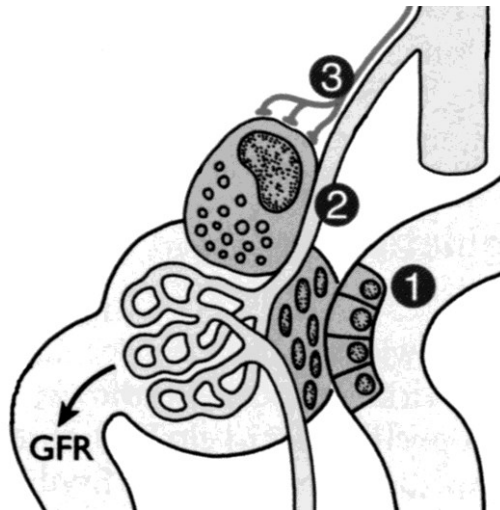


Abbildung 1: Juxtaglomerulärer Apparat

Der JGA setzt sich aus Macula densa (1), extraglomerulärem Mesangium (2) und den Renin-produzierenden granulierten Zellen (3) zusammen. Die Macula densa besteht aus 20-30 Zellen, die sich strukturell von den sie umgebenden TAL-Zellen unterscheiden. Die Macula densa-Zellen haben große Zellkerne, die sich im Schnittbild als dicht nebeneinanderliegend präsentieren. Mit der basolateralen Seite grenzen sie an das extraglomeruläre Mesangium des zugehörigen Nierenkörperchens. Das extraglomeruläre Mesangium befindet sich zwischen der Macula densa und den beiden Glomerulusarteriolen und besteht aus ca. 30 platten Zellen. Die granulierten Zellen sind durch auffällige zytoplasmatische, Renin-haltige Granula gekennzeichnet und befinden sich an der afferenten Arteriole, kurz vor deren Eintritt in das Glomerulum (Abbildung nach Kriz et al., 2002).

1.2 Der TGF-Mechanismus

Der TGF-Mechanismus kann funktionell in zwei Anteile gegliedert werden: die Messung der Chloridkonzentration in der Tubulusflüssigkeit und die Generation eines Signals durch die Zellen der Macula densa sowie eine Effektorkaskade, welche den Tonus der glomerulären Gefäße steuert.^{8,9} Die TGF-Wirkung kann in einem Arbeitsdiagramm beschrieben werden, welches in der Abbildung 2 dargestellt ist. In diesem Diagramm ist die GFR in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration an der Macula densa aufgetragen. Der Verlauf der TGF-Kurve hat eine sigmoidale Form, an deren steilster Stelle sich der Arbeitsbereich des TGF befindet. Dies bedeutet, dass kleine Änderungen der NaCl-Konzentration zu großen Veränderungen der GFR führen, wodurch eine hohe Effizienz des Systems gewährleistet wird. Ständige kleine Schwankungen der GFR und damit der Macula densa-NaCl-Konzentration bewirken dabei, dass das System ständig um den Arbeitspunkt oszilliert.

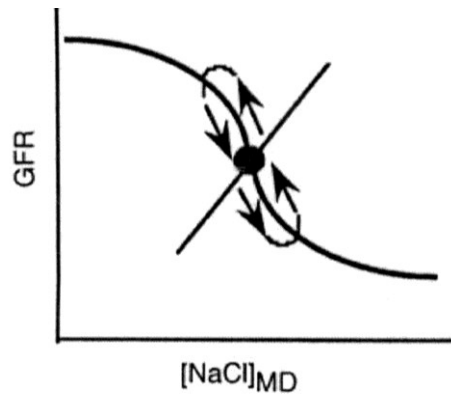


Abbildung 2: TGF-Wirkungskurve

Die GFR ist in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration dargestellt. Der Kurvenverlauf ist sigmoidal. Bei einer hohen Macula densa-NaCl-Konzentration ist die GFR gering. Bei einer niedrigen Macula densa-NaCl-Konzentration ist die GFR hoch. An der Stelle des steilsten Kurvenverlaufs befindet sich der Arbeitsbereich des TGF. Die GFR und die Macula densa-NaCl-Konzentration oszillieren um einen Sollwert. Kurzfristige Macula densa-NaCl-Veränderungen werden über den TGF ausgeglichen (Abbildung von Schnermann et al., 1998).

Die Frage, wie die Signaltransduktion im JGA erfolgt, war Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Studien von Navar und Schnermann haben gezeigt, dass Adenosintriphosphat (ATP) in Abhängigkeit von der Salzaufnahme von den Macula densa-Zellen freigesetzt wird.^{4,5} ATP wird im Extrazellulärraum durch verschiedene Enzyme zu Adenosin abgebaut und wirkt anschließend über Adenosin-1A-Rezeptoren vasokonstriktorisch auf die afferente Arteriole.^{1,5,10} Durch die resultierende Abnahme der GFR wird auch die filtrierte Salzmenge vermindert. Dadurch sinkt die Salzkonzentration an der Macula densa und erreicht wieder den Sollwert (Abbildung 3).

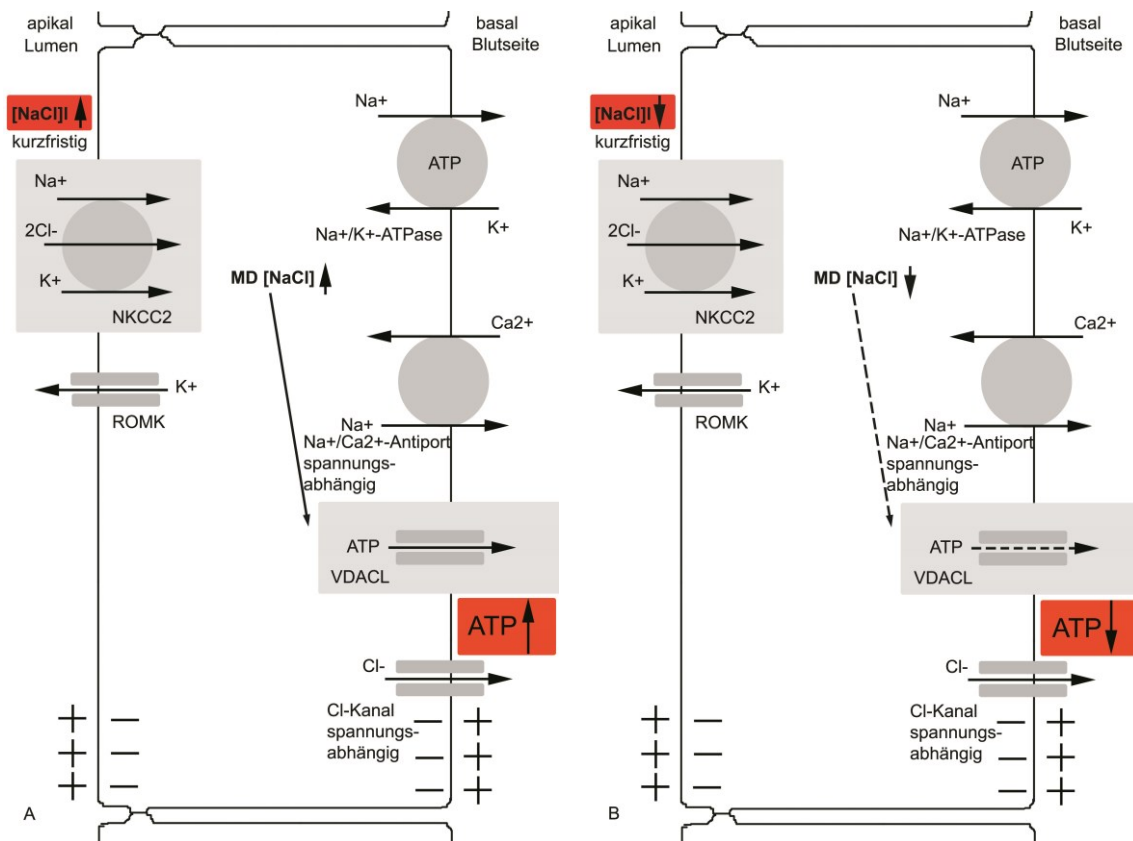


Abbildung 3: Der TGF-Mechanismus

In der Macula densa erfolgt die tubuläre Salzreabsorption über den apikalen Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transporter (NKCC2). Der NKCC2 transportiert 1 mol Natrium-, 1 mol Kalium- und 2 mol Chlorid-Ionen in die Zelle. Die treibende Kraft für den sekundär aktiven Transport ist der Konzentrationsgradient für Natrium, welcher durch die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase aufgebaut wird. Für eine effektive Transportleistung müssen alle drei Ionen in ausreichender Konzentration in der Tubulusflüssigkeit vorhanden sein. Da die Kalium-Konzentration dort sehr niedrig ist, müssen die Kalium-Ionen für die effiziente Arbeit des NKCC2 dem Konzentrationsgefälle folgend wieder zurück in die Tubulusflüssigkeit diffundieren. Die Diffusion wird durch den ROMK (renal outer medullary potassium channel) erleichtert. Durch diesen Diffusionsvorgang erfolgt ein effektiver Ladungstransport, wodurch ein Lumen-positives Membranpotenzial entsteht. Von dem NKCC2 transportierte Chlorid-Ionen gelangen auf der basolateralen Seite der Macula densa über einen Chlorid-Kanal in den extrazellulären Raum. Eine genetische Störung einer der genannten Kanäle oder Transporter zeigt sich klinisch im Bild des Bartter-Syndroms. **(A)** Die gesteigerte luminal NaCl-Konzentration geht mit einer gesteigerten NKCC2-Transportleistung und mit einer ATP-Freisetzung über den basolateralen Maxi-Anionen-Transporter VDACL (volume-dependent ATP-conductive large conductance anion channel) einher. **(B)** Bei kurzfristiger Verringerung der luminalen Salzkonzentration erfolgt eine konsekutive Senkung der ATP-Sekretion aus der Macula densa.

1.3 Die Adaptation des TGF

Eine chronische Veränderung der Nierenperfusion z. B. durch eine GFR-wirksame chronische Blutdruckänderung spiegelt sich in der Macula densa als langfristig veränderte Salzkonzentration wieder. Um eine optimale Effizienz des TGF zu ermöglichen, muss eine Adaptation der TGF-Antwort an verschiedene Sollwerte der Macula densa-NaCl-Konzentration möglich sein. Eine Anpassung erfolgt über die Änderung der Konzentration vasoaktiver Modulatoren, dazu gehören das vasokonstriktorisch-wirkende Angiotensin II und die vasodilatatorisch-wirkenden Substanzen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2).^{1,9,11,12} Die Folge ist eine Änderung des Tonus der afferenten und der efferenten Arteriole. Der Arbeitsbereich des TGF wird dadurch neu gesetzt, sodass wieder eine effektive Kontrolle der GFR möglich ist.⁸ Die Anpassung der TGF-Antwort kann in beide Richtungen erfolgen. So wird bei einer chronischen Erhöhung der Salzkonzentration an der Macula densa vermehrt NO gebildet, welches eine Dilatation der afferenten Arteriole verursacht. Dadurch kommt es zu einer Rechtsverschiebung der TGF-Kurve, die mit einer verminderten Sensitivität und Effizienz der TGF-Antwort einhergeht und die effektive Ausscheidung einer aufgenommenen Salzmenge ermöglicht.⁹ Eine langfristig erniedrigte Salzkonzentration an der Macula densa oder eine verminderte renale Durchblutung mit geringer GFR führt über Synthese von PGE2 und Angiotensin II zu einer Steigerung von Sensitivität und Amplitude des TGF. Dies äußert sich in einer Linksverschiebung und einer gesteigerten Auslenkung der TGF-Kurve. PGE2 wirkt dabei als potenter Vasodilatator der afferenten Arteriole und ist essenziell für die Erhaltung der glomerulären Filtration in Situationen mit verminderter renaler Perfusion.¹³⁻¹⁵ PGE2 fördert zudem die Sekretion von Renin aus den granulären Zellen des JGA, welche wiederum die Synthese von Angiotensin II steigert. Dieses bewirkt eine selektive Vasokonstriktion der efferenten Arteriole. PGE2 vermittelt daher eine Steigerung des Filtrationsdrucks im Glomerulum und damit einen Anstieg der GFR.^{11,16} Bei Volumenmangelzuständen wie z. B. bei Herzinsuffizienz als Form der intravasalen Volumendepletion kann über diesen Mechanismus auch bei einer geringen renalen Perfusion eine adäquate GFR erreicht werden. Die Adaptation des TGF ist in Abbildung 4 dargestellt.

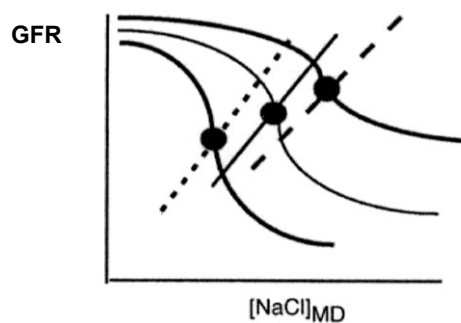


Abbildung 4: Adaption des TGF

Langfristige Veränderungen der Macula densa-NaCl-Konzentration, die den Arbeitsbereich des TGF überschreiten, führen zu Konzentrationsänderungen der vasoaktiven Proteine Angiotensin II, PGE2 und NO. Der Gefäßtonus der afferenten und der efferenten Arteriole wird verändert. Die TGF-Kurve wird verschoben mit einem neuen Sollwert der Macula densa-NaCl-Konzentration bei relativ konstanter GFR. Der TGF-Mechanismus gelangt wieder in einen effektiven Arbeitsbereich. Somit wird wieder eine schnelle Kontrolle der GFR ermöglicht. Im Grundzustand hat die gefäßdilatorische Wirkung von NO auf die afferente Arteriole die größte Bedeutung. Bei einer langfristigen Erhöhung der Macula densa-NaCl-Konzentration ist die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase-1 und damit die NO-Bildung erhöht. NO initiiert eine Rechtsverschiebung der TGF-Kurve bei Anpassung an hohe Salzkonzentrationen.¹⁷ Eine Linksverschiebung der TGF-Kurve ist bei Anpassung an eine niedrige Salzkonzentration notwendig und erfolgt über PGE2 und Angiotensin II⁸ (Abbildung von Schnermann et al., 1998).

1.4 Regulation von PGE2

Aus den eben genannten Punkten geht hervor, dass PGE2 maßgeblich zur Anpassung der TGF-Reaktion beiträgt. Die Regulationsmechanismen der Synthese von PGE2 in der Macula densa sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Synthese von PGE2 erfordert die koordinierte Arbeit mehrerer Enzymsysteme. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Phospholipase A2 Gruppe 4 (PLA2G4) Arachidonsäure aus Phospholipiden freisetzt. Die Arachidonsäure wird anschließend über COX-2 zu Prostaglandin H umgesetzt.¹⁸ In einem weiteren Schritt wird aus Prostaglandin H durch Prostaglandin E2-Synthase-1 PGE2 gebildet. Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte dieser Reaktionskaskade werden dabei von PLA2G4 und Cyclooxygenasen katalysiert (Abbildung 9).¹⁹ Die Aktivität beider Enzyme kann in unterschiedlichem Ausmaß sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. In der Macula densa wird COX-2 durch MAP-Kinasen vor allem auf der Ebene der Genexpression reguliert.²⁰ Im Falle eines effektiv intravasalen Volumenmangels wie z. B. bei der Herzinsuffizienz oder bei einer Salzdepletion des Körpers, ist die COX-2-Expression in der Macula

densa gesteigert. Weiterhin ist die COX-2-Expression gesteigert, wenn die Salzaufnahme in die Macula densa gestört ist, wie dies z. B. bei einer pharmakologischen Inhibition des Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transporters (NKCC2) durch Furosemid oder beim Bartter-Syndrom auftritt.^{20–24} Die Macula densa-COX-2-Konzentration ist dagegen erniedrigt bei hoher diätetischer Salzaufnahme, bei hohen systemischen Konzentrationen von Angiotensin II,^{25,26} bei erhöhtem renalen Perfusionsdruck und bei arterieller Hypertonie im Rahmen einer kontralateralen Nierenarterienstenose.^{24,27} Die Expression von COX-2 kann zudem durch Glukokortikoide und Mineralokortikoide inhibiert werden.^{21,28,29} Die posttranslationale Regulation von COX-2 kann durch S-Nitrosylierung über NO erfolgen, welches eine Aktivierung der COX-2 initiiert.³⁰ PLA2G4 wird wie COX-2 über MAP-Kinasen in ihrer Expression beeinflusst.³¹ Entscheidend für die Regulation der PLA2G4 ist jedoch die Interaktion mit Calcium-Ionen und regulierenden Proteinen.³² So konnte z. B. für das antiinflammatorisch-wirkende Protein Annexin A1 in pulmonalen Epithelzellen gezeigt werden, dass es Calcium-abhängig an PLA2G4 bindet und diese dadurch inhibiert.³³ Auch in inflammatorischen Zellen spielt Annexin A1 eine zentrale Rolle bei der Regulation von COX-2 und PLA2G4.³⁴ Die Steuerung der Expression von PLA2G4 in der Macula densa ist weitgehend unerforscht. Bisherige Daten deuten auf eine parallele Regulation mit der COX-2 hin.³⁵ Bereits in früheren Studien konnte von McKanna et al. gezeigt werden, dass Annexin A1 in der Macula densa exprimiert wird.³⁶ Die Funktion des Proteins an dieser Stelle ist jedoch unbekannt.

1.5 Annexin A1

Das antiinflammatorische Protein Annexin A1 (ANXA1, Macro cortin, Lipomodulin, Renocortin, Lipocortin) ist 37 kDa groß und wird durch Glukokortikoide induziert. Es besitzt Eigenschaften sowohl von Membran- als auch von löslichen zytosolischen Proteinen.³⁷ ANXA1 wird in seiner Synthese, in der Phosphorylierung und in seiner zellulären Verteilung in verschiedenen Geweben durch Glukokortikoide reguliert und gilt als Second-Messenger der Glukokortikoid-Wirkung.³⁸ Glukokortikoide induzieren die Expression von ANXA1 über eine p38/MAP-Kinase-abhängige Aktivierung von CREB (cAMP-responsive element binding-Protein) in der Promotorregion des ANXA1-Gens.^{39,40} Die ANXA1-Konzentration in verschiedenen Zellen und die Sekretion des Proteins sind nach

systemischer oder lokaler Administration von Glukokortikoiden im Menschen erhöht.⁴¹⁻⁴³ So korreliert z. B. die endogene ANXA1-Expression in Monozyten mit dem Serumkortisolspiegel in gesunden, Cushing-Syndrom- und Addison-Patienten.⁴⁴ Diese Korrelation konnte deutlicher in Frauen als in Männern nachgewiesen werden. Auf zellulärer Ebene ist ANXA1 von Bedeutung für die Kontrolle des Zellwachstums,⁴⁵ der Zelldifferenzierung,⁴⁶ der Signaltransduktion, des Traffickings von Vesikeln⁴⁷⁻⁴⁹ und für die Regulation der Eicosanoidsynthese über eine Inhibition von PLA2G4 und COX-2.^{38,50} In vivo spielt ANXA1 eine Rolle bei der Glukokortikoid-medierten Regulation der Migration von Leukozyten⁵¹ in akuten und chronischen Entzündungsprozessen.^{52,53} Eine entscheidende Bedeutung hat ANXA1 auch bei hypoxischen Zellschäden,⁵⁴⁻⁵⁶ bei der Entstehung von Schmerz⁵⁷ und Fieber⁵⁸ und in neuroendokrinen Prozessen wie der Regulation von Wachstumshormonen und von Prolaktin.^{59,60}

1.5.1 Struktur von ANXA1

Als typischer Vertreter der Annexine besitzt ANXA1 einen C-terminalen Anteil (core domain) aus vier repetitiven Annexin-Domänen mit ungefähr 70 Aminosäuren. Der C-terminale Anteil weist ein hohes Maß an Homologie mit anderen Annexinen auf und ist für die Bindung von Calcium-Ionen und negativ geladenen Phospholipiden verantwortlich.⁶¹ Der N-terminale Anteil ist spezifisch für Annexin A1 und notwendig für die selektive Bindung an Protein-Targets. ANXA1 wird durch Phosphorylierung an Serin-Gruppen des N-terminalen Anteils aktiviert, wodurch die Affinität zu Calcium-Ionen größer wird.⁶² Die dreidimensionale Struktur ist in Abbildung 5 dargestellt.

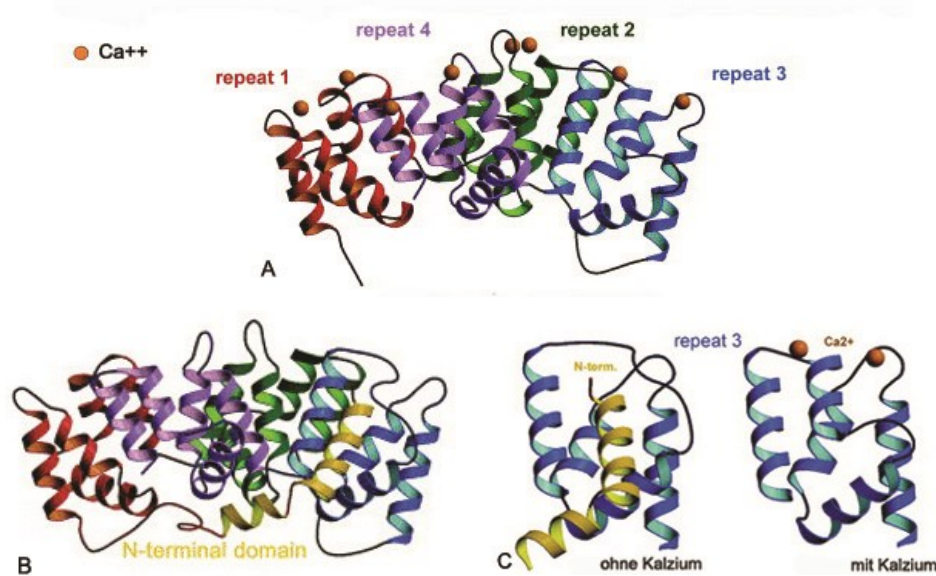


Abbildung 5: Die dreidimensionale Struktur von ANXA1

Die N-terminale Domäne ist gelb dargestellt, Abschnitt 1 (repeat 1) rot, Abschnitt 2 grün, Abschnitt 3 blau und Abschnitt 4 lila. Gebundenes Calcium ist durch orangene Kugeln dargestellt. **(A)** In dem vollständigen ANXA1-Protein ist bei Vorhandensein von Calcium die N-terminale Domäne nicht in der Tasche des Abschnitts 3 verborgen wie es in **(B)** ohne Calcium zu sehen ist. **(C)** Detailansicht von Abschnitt 3 bei Abwesenheit von Calcium (links) und Vorhandensein von Calcium (rechts). Die Bindung von Calcium-Ionen an ANXA1 führt zu einer Freisetzung der N-terminalen Domäne aus der Molekültasche des Abschnitts 3 und somit zu einer Calcium-abhängigen Aktivierung des Proteins. Mit der N-terminalen Domäne tritt ANXA1 in Protein-Protein-Wechselwirkungen mit PLA2G4 (Röntgenstruktur von kristallisiertem ANXA1 aus dem Schwein, Rosengarth et al., 2003).

1.5.2 Einfluss von ANXA1 auf die Prostaglandinsynthese

Die Wirkung von ANXA1 kann in Abhängigkeit von der Lokalisation in endogene und exogene Effekte unterteilt werden. ANXA1 ist intrazellulär an Proteintransportvorgängen, an der Organisation des Zytoskeletts und an der Regulation der Exozytose beteiligt.⁶³ Weiterhin verursacht ANXA1 durch direkte Bindung eine Inhibition von PLA2G4, wodurch die Synthese von PGE2 gehemmt wird.^{64,65} Neben dieser endogenen Inhibition der PGE2-Synthese kann ANXA1 auch exogen eine verminderte Bildung von PGE2 initiieren. Hierfür ist eine Sekretion von ANXA1 notwendig. Frühere Studien von Flower et al. zeigen, dass ANXA1 nach Glukokortikoid-Gabe aus neuroendokrinen Epithelzellen der Hypophyse externalisiert werden kann.⁶⁶ Die Externalisierung von ANXA1 konnte weiterhin in Makrophagen und Granulozyten der Rektummukosa von Ratten gezeigt werden.⁶⁷ Der Mechanismus der Sekretion ist dabei noch nicht vollständig geklärt. ANXA1 besitzt keine hydrophoben Gruppen oder andere Signalsequenzen

für sekretorische Proteine und kann daher nicht zum endoplasmatischen Retikulum transportiert werden. Eine exozytotische Ausscheidung in Vesikeln auf dem konventionellen Weg kann für ANXA1 demnach nicht erfolgen. Eine alternative Sekretion über den ABCA1 (ATP-Bindekassettentransporter Gruppe A, Nummer 1) wird diskutiert.⁶⁸ Bei den ATP-Bindekassettentransportern handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die für den Transport verschiedenster Substanzen wie Lipide, Medikamente, Toxine oder Proteine über zelluläre Membranen zuständig sind.⁶⁹ ABCA1 ist im Körper für den Transport von Phospholipiden und Cholesterin aus dem Zellinneren an die Membranoberfläche von Makrophagen zuständig. Dort bilden sich Lipid-Domänen, die Grundlage der Synthese von High Density-Lipoproteinen (HDL) sind. Ein genetischer Defekt des ABCA1-Gens zeigt sich in dem klinischen Bild der Tangier-Krankheit, die mit einem erblichen HDL-Mangel einhergeht. Frühere Arbeiten an Zellen der Adenohypophyse zeigen, dass die ANXA1-Sekretion durch Inhibition des ABCA1 mit Glibenclamid inhibiert werden kann.⁷⁰ Weiterhin ist die Externalisierung von ANXA1 auch über die Abspaltung von Membran-umhüllten Mikropartikeln aus der Zellmembran möglich.⁷¹

ANXA1 kann seine Wirkung über Bindung an einen Vertreter der G-Proteingekoppelten Formyl-Peptid-Rezeptor (Fpr)-Familie entfalten.⁷²⁻⁸⁰ Beim Menschen werden drei Rezeptoren unterschieden: FPR1 und FPR2, der auch als FPRL1 bekannt ist, und FPR3, der auch als FPRL2 bezeichnet wird. Die Fpr-Genfamilie der Maus wird hingegen in acht Rezeptoren unterteilt, namentlich in den Fpr1-3 und Fpr-rs3-7.⁸¹ Der Fpr1 der Maus ist homolog zum humanen FPR1. Die Genprodukte des murinen Fpr2 und Fpr3 zeigen eine Homologie zum humanen FPR2, wobei der murine Fpr3 eine überlappende Funktion mit dem humanen FPR3 aufweist.⁷³ Diese Rezeptoren gleichen sich nicht nur auf struktureller Ebene, sondern teilen auch gemeinsame pharmakologische Eigenschaften. Als unspezifischer Agonist für alle Vertreter der FPR-Familie werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Peptide N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) und AC2-26, ein N-terminales ANXA1-Peptid, verwendet. Als selektiver Antagonist werden für Fpr1 Cyclosporin H (CyH) und für Fpr2, sowie für Fpr3 Trp-Arg-Trp-Trp-Trp (WRW4) eingesetzt. Eine Übersicht über die verschiedenen FPR-Subtypen und deren spezifische Agonisten und Antagonisten ist in Abbildung 6 zu sehen.

Humane FPRs	Murine FPRs	Agonist	Antagonist
FPR1	Fpr1	fMLF AC2-26	CyH
FPRL1 = FPR2	Fpr2, Fpr3	fMLF ANXA1 AC2-26	WRW4
FPRL2 = FPR3	Fpr3	fMLF AC2-26	WRW4

Abbildung 6: Übersicht zu den humanen und murinen FPR-Subtypen und deren spezifischen Agonisten und Antagonisten

Der humane FPR1 ist homolog zu dem murinen Fpr1. Der humane FPRL1 kann auch als FPR2 bezeichnet werden und zeigt eine Homologie zu den murinen Rezeptoren Fpr2 und Fpr3. Der humane FPRL2 wird auch FPR3 genannt und ist homolog zu dem murinen Fpr3.

Durch die ANXA1-Bindung können drei verschiedene G-Protein gekoppelte Signalkaskaden ausgelöst werden, die in Abbildung 7 gezeigt sind.

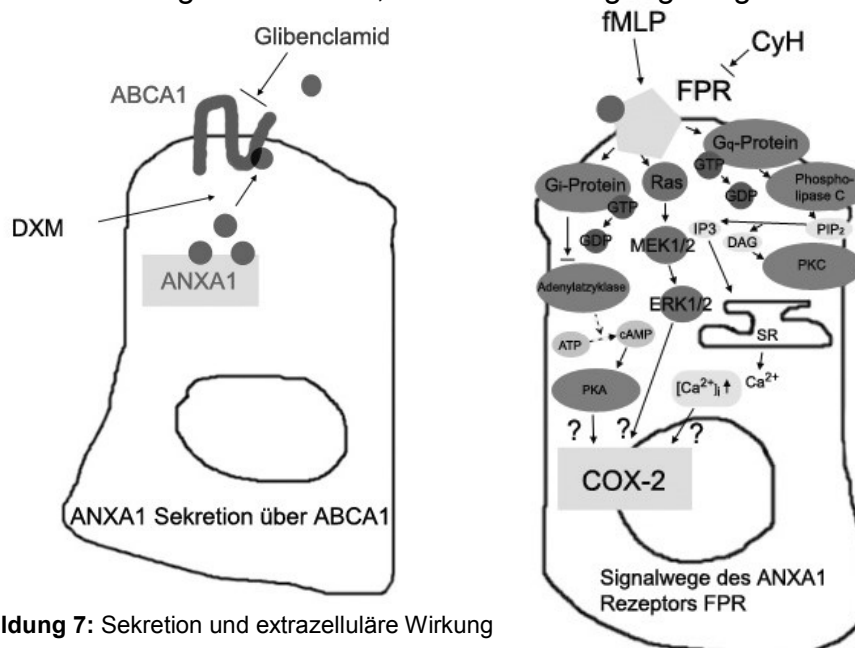


Abbildung 7: Sekretion und extrazelluläre Wirkung

Glukokortikoide induzieren die Expression von ANXA1 und fördern die ANXA1-Exozytose über Phosphorylierung an Serin und anschließender Translokation zur Membran. ANXA1 wird möglicherweise nach Bindung an die Zellmembran über einen ATP-Bindekassettentransporter, z. B. den ABCA1, sezerniert, der durch Glibenclamid inhibiert werden kann. Das sich extrazellulär befindende ANXA1 kann an einen Rezeptor der FPR-Familie binden. Durch die Bindung werden drei verschiedene G-Protein gekoppelte Signalkaskaden ausgelöst. Zum einen werden inhibitorische G-Proteine G_i aktiviert, die die Adenylatzyklase inhibieren und damit den zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel senken. Weiterhin kann das G-Proteine G_q aktiviert werden, das die β-Isoform der Phospholipase C (PLCβ) stimuliert. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wird dadurch erhöht. Über den FPR können zudem G-Proteine aktiviert werden, die mit verschiedenen MAP-Kinasen in Wechselwirkung treten. Ras aktiviert hierbei Raf/MEK1, dadurch wird MEK1/2 stimuliert und darüber ERK1/2.

Eine Übersicht zur Bildung von PGE₂ und dem Einfluss von ANXA1 findet sich in Abbildung 8. Sowohl im Zell- als auch im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Expression von ANXA1 eine verstärkte Aktivität und Expression von PLA₂G₄ und COX-2 vorliegt.^{34,82}

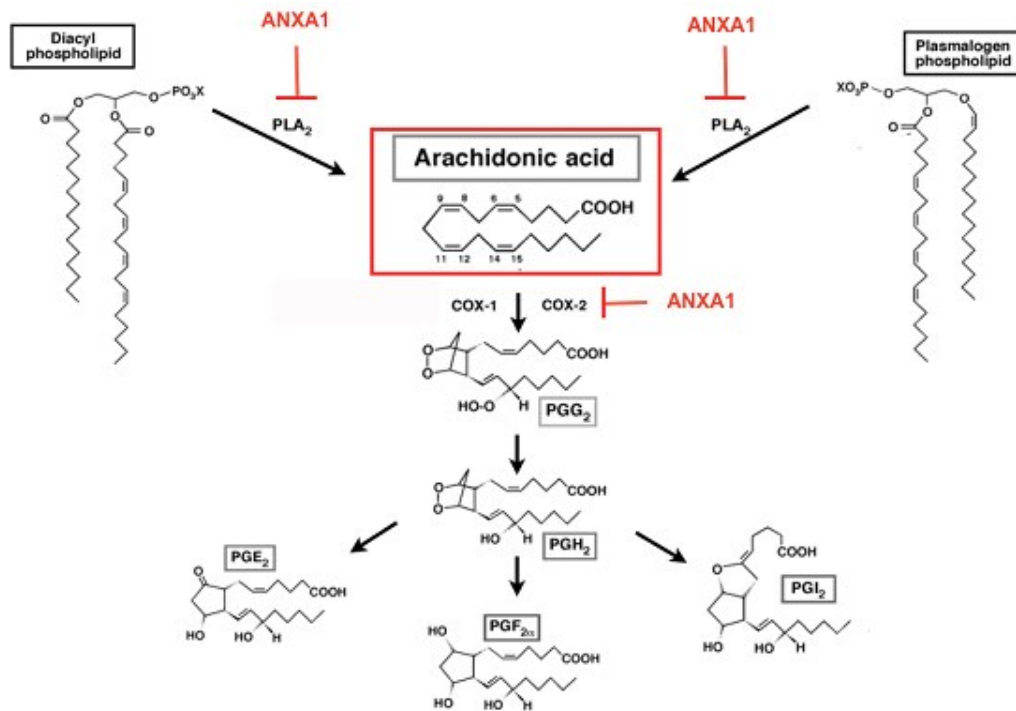


Abbildung 8: Bildung von PGE₂

Der initiale Schritt der PGE₂-Bildung ist die Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Phospholipiden durch PLA₂G₄. Anschließend erfolgt die Umsetzung der Arachidonsäure zu Prostaglandin H über COX-2, das durch die Prostaglandin E₂-Synthase-1 zu PGE₂ umgesetzt wird. ANXA1 inhibiert PLA₂G₄ und COX-2, die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂-Bildung.

1.5.3 ANXA1 in der Niere

Die renale Expression von ANXA1 wurde erstmalig 1992 von McKanna et al. immunhistochemisch untersucht. Bereits in dieser Arbeit konnten die Autoren eine kräftige Expression des Proteins in den Zellen der Macula densa nachweisen. Zusätzlich fand sich immunreaktives Protein in Podozyten, im Epithel der Bowman-Kapsel sowie in medullären Sammelrohren. Der TAL zeigte lediglich leichte Immunreaktivität. Alle anderen Nephronabschnitte waren negativ für ANXA1.³⁶ Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass nach einer Ischämie-Reperfusionsepisode in Rattennieren eine vermehrte ANXA1-Immunreaktivität in den Podozyten, im TAL und im Sammelrohr auftritt.³⁶ Zudem wurde eine

verminderte basale und eine zunehmende laterale und apikale Lokalisation von ANXA1 in den Macula densa-Zellen gefunden.³⁶ Dieses hochselektive Verteilungs- und Regulationsmuster lässt auf eine funktionelle Bedeutung von ANXA1 in den exprimierenden Strukturen schließen, die bisher jedoch noch nicht experimentell belegt ist.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Das in der Macula densa durch COX-2 gebildete PGE2 spielt eine zentrale Rolle für die tubulovaskuläre Signaltransduktion im JGA und damit für die Steuerung der Nierenfunktion. So stimuliert PGE2 u. a. die Expression und Aktivität von Renin, einem zentralen Modulator des Blutdrucks und des extrazellulären Volumenhaushaltes. Die genauen Mechanismen der Regulation der juxtaglomerulären COX-2-Synthese sind nicht vollständig untersucht. In Immunzellen hemmt ANXA1 die PGE2-Synthese durch Inhibition der Expression und der Enzymaktivität von COX-2.^{33,83,84}

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass ANXA1 eine inhibitorische Wirkung auf COX-2 ausübt und somit die Signaltransduktion im JGA entscheidend beeinflusst.

Die Expression von ANXA1 in der Macula densa wurde bereits von McKanna et al. beschrieben.³⁶ Die Mechanismen der Regulation von ANXA1 in der Macula densa und die lokale Wirkung auf die COX-2-Expression, sowie seine funktionelle Relevanz für die JGA-Funktion waren hingegen unbekannt. In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst die Lokalisation von ANXA1 in Bezug auf die für die PGE2-Synthese bedeutenden Enzyme COX-2 und PLA2G4, sowie die Regulation der ANXA1-Expression in Abhängigkeit vom Salztransport in der Macula densa am Zell- und Tiermodell untersucht werden. Weiterhin sollte mit Hilfe von ANXA1-defizienten Mäusen die ANXA1-Wirkung auf die COX-2- und die Renin-Expression analysiert werden, um eine Einordnung der funktionellen Relevanz für die JGA-Funktion zu ermöglichen.

Aus Studien an anderen Zellsystemen war bekannt, dass Glukokortikoide ANXA1 aktivieren und eine Sekretion über den ABCA1 oder durch Bildung von Membranmikropartikeln erfolgen kann.^{68,85,86} Von extrazellulär können ANXA1 oder seine N-terminalen Peptide an Vertreter der Fpr-Genfamilie binden.^{72,87,88} Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte in Zellkulturstudien überprüft werden,

ob Glukokortikoide eine Sekretion von ANXA1 aus der Macula densa fördern. Weiterhin sollte eine Untersuchung der renalen Expression von Fpr und des Einflusses von Glukokortikoiden und ANXA1-Peptiden auf die Expression von COX-2 in der Macula densa erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Behandlung

3.1.1 Versuchstiere für die Untersuchung von Furosemid in Sprague Dawley-Ratten

Alle tierexperimentellen Studien wurden entsprechender der NIH Richtlinien durchgeführt, die vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales/Abteilung Veterinärwesen genehmigt wurden (Tierversuchsantragsnummer G0062/05). 16 ausgewachsene Sprague Dawley-Ratten (SD-Ratten) wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und im Tierstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, Berlin gehalten. Die Ratten hatten freien Zugang zu Standardfutter und Leitungswasser. Nach einer Woche Akklimatisierungszeit wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen eingeteilt. Acht Tiere wurden für drei Tage mit einer Furosemid-Dauerinfusion (Furosemid 12 mg/d; Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland) behandelt. Dafür wurde eine osmotische Minipumpe (ALZET Model 2ML1, 10 µl/h; Charles River, Sulzfeld, Deutschland) unter Isofluran-Narkose subkutan implantiert.¹¹ Die finale Furosemid-Dosis betrug 150 mg/kg Körpergewicht. Zum Ausgleich des Furosemid-induzierten Elektrolytverlustes erhielten die Tiere eine Trinklösung mit 0,45% NaCl. Die acht Kontrolltiere wurden dem gleichen Operationsverfahren mit Implantation einer mit NaCl-gefüllten Minipumpe unterzogen und hatten ebenfalls eine 0,45% NaCl-Trinklösung. Zur Kontrolle des Behandlungserfolges wurden alle Versuchstiere am vierten Tag des Experiments zur Urinmengenmessung in metabolische Käfige gesetzt. Am Ende der Versuchsperiode wurden die Tiere perfusionsfixiert und für immunhistochemische Studien vorbereitet.

3.1.2 ANXA1-defiziente Mäuse

Die ANXA1-defizienten (ANXA1^{-/-}) Mäuse wurden auf Grundlage von weiblichen C57bl/6-Mäusen von Hannon et al. generiert.¹¹ Die Mutation wurde in die Population eingekreuzt und durch Paarung homozygoter Tiere weitergegeben.

Heterozygote Tiere dieses Stammes wurden im FEM in Berlin gehalten und weiter gepaart. Die Nachkommen wurden genotypisiert nach dem von Hannon beschriebenen Protokoll.⁸⁹ Männliche ANXA1^{-/-} Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere (n = 4 für jeden Genotyp) wurden perfusionsfixiert und wie oben beschrieben für histologische Studien vorbereitet.

3.2 Perfusionsfixierung und Gewebepräparation

Die Perfusionsfixierung der SD-Ratten erfolgte nach einer im Labor von Prof. Dr. S. Bachmann etablierten Methode.⁸⁹ Die Versuchstiere wurden mit Isofluran-Inhalation (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und einer Natriumpentobarbital-Injektion (0,06 mg/g Körpergewicht, intraperitoneal; FAGRON, Barsbüttel, Deutschland) narkotisiert. Das Abdomen wurde für die Präparation der Aorta abdominalis eröffnet. Die Aorta wurde mit einer Klemme auf Höhe der Aortenbifurkation verschlossen und distal der Abgänge der Aa. renales präpariert. Die Aorta wurde proximal der Klemme mit einem Faden locker umschlungen. Proximal des Fadens erfolgte die Unterbindung des Blutflusses der Aorta und der Vena cava mit einer zweiten Klemme. Es folgte die Kanalisierung der Aorta ca. 0,5 cm unterhalb der proximalen Klemme. Mit einer Mikroschere wurde eine ca. 1 mm lange transversale Öffnung geschaffen und mit einem mit Heparin-Natrium gefüllten dünnen Teflonschlauch (KRONLAB, Dinslaken, Deutschland) punktiert. Nach Fixierung des Katheters mit einem Doppelknoten des Fadens wurde die Vena cava zum Druckausgleich mit der Mikroschere eröffnet, die proximale Klemme gelöst und mit der retrograden Perfusion begonnen. Für 25 Sekunden wurden die Tiere mit einer 330 milliosmolaren Saccharose-Phosphatpufferlösung (260 mosmol PBS - Phosphat-buffered Saline - und 70 mosmol Saccharose [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland]; pH 7,4, 21 °C) mit konstantem Perfusionsdruck von 2,20 m Wassersäule vorgespült. Auf die Vorspülung folgte eine fünfminütige Perfusion mit der Fixierungslösung aus 3%igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS (pH 7,4, 21 °C, 330 mosmol). Nach der Fixierung wurden die Nieren entnommen und durch einen Horizontalschnitt geteilt. Zum Schutz vor Gefrierartefakten wurde ein Teil der Nieren zum Entziehen von Wasser über Nacht bei 4 °C in eine 800 mosmol Saccharose-PBS-Lösung (260 mosmol PBS und 540 mosmol Saccharose, pH 7,4) gelagert. Dann wurde das Gewebe auf Styroporplättchen in

stickstoffgekühltem 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Der restliche Teil des Gewebes wurde für die Paraffineinbettung in einer 3%igen Paraformaldehyd-Lösung in Saccharose/PBS (800 mosm/kg in PBS, pH 7,4) über Nacht in 3%iger Paraformaldehydlösung nachfixiert und am nächsten Tag in den Aufbewahrungspuffer (0,02% Natriumacid in 330 mosmol Saccharose-PBS-Lösung mit 70 mosmol Saccharose und 260 mosmol PBS, pH 7,4) überführt. Die Paraffineinbettung erfolgte in der Kinderpathologie der Charité, Campus Mitte, Berlin. Zusätzliche Tiere wurden nach Isofluran-Inhalationsanästhesie getötet. Die Nieren wurden entnommen und für cDNA (complementary DNA, komplementäre DNS)-Herstellung verwendet.

3.3 Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente wurden immortalisierte Macula densa-Zellen der Maus (MMDD1) aus dem Labor von Jürgen Schnermann benutzt.²⁰ Für die Generierung des Zellmodells wurden SV40-transgene Mäuse verwendet. Die Macula densa-Zellen wurden dabei auf Grundlage des differenziellen Lectinbindemusters von den anderen Nierenzellen herausgelesen. Zur Bestätigung des Selektionserfolgs konnte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die cDNA für COX-2, Stickstoffmonoxid-Synthase-1 (NOS1), NKCC2, ROMK und Oxytocin nachgewiesen werden. Die MMDD1-cDNA-Proben waren negativ für das TAL-spezifische Tamm-Horsfall-Protein und für die Glucose-6-Phosphatase, die spezifisch für den proximalen Tubulus ist. Die Zellen wurden in unserem Labor in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO₂-, 95% O₂-haltiger Luft ohne Stickstoffbeimischung herangezüchtet bis zu einer Konfluenz von 80-90%. Das verwendete Medium setzte sich aus DMEM/F12 1 : 1 Mixture (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10% fetalem Kälber-Serum (FCS; PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (10 000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml; PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) zusammen. Die MMDD1 wuchsen in Petrischalen, 6-Well- und 12-Wellplatten (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich).

3.4 Morphologische Analysetechniken

3.4.1 Diaphorasereaktion

Die Darstellung der Aktivität der NO-Synthase in der Macula densa erfolgte zunächst mittels Diaphorasereaktion. Grundlage dieser Methode ist ein Elektronentransfer von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zu Nitroblau-tetrazoliumchlorid, wodurch ein unlöslicher blauer Farbstoff gebildet wird. Als Katalysator dient die NO-Synthase.^{11,89} Für die Diaphorasereaktion wurden bei - 24 °C Kryostat-Schnitte von 6 µm Dicke angefertigt (CM3050S, Leica, Bensheim, Deutschland), auf Superfrost-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) übertragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die einzelnen Schnitte wurden mit PAP-Stift (The Binding Site, Birmingham, Großbritannien) voneinander getrennt. Die Objektträger wurden zur Äquilibration für 5 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,3 in 0,5%iger Tritonlösung inkubiert. Nach vorsichtigem Absaugen der Schnitte mit einer Vakuumpumpe wurden die Schnitte mit je 100 µl Entwicklungslösung bedeckt und in auf 37 °C vorgewärmten feuchten Kammern inkubiert. Die Entwicklungslösung bestand aus 5 mg Nitroblautetrazoliumchlorid, 5 mg NADPH, 15 µl Triton X-100 gelöst in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer. Das Fortschreiten der Farbentwicklung wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Die Reaktion wurde bei Vorliegen eines klar erkennbaren Macula densa-Signals und Fehlens einer unspezifischen Hintergrundfärbung gestoppt. Danach wurden die Schnitte für 3 x 5 min in Phosphatpuffer und einmal in PBS gewaschen und dann mit einer 1 : 1 PBS-Glycerin-Lösung eingedeckelt. Die Schnitte aller Versuchstiere wurden im gleichen Experiment prozessiert, und die Reaktionszeit wurde für alle Gewebe konstant gehalten. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Leica Mikroskops und die photographische Dokumentation mit einer SPOT3-Digitalkamera (Diagnostic Instruments, Michigan, USA). Die Verarbeitung erfolgte mit MetaView 4.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA). Zur Quantifizierung der Macula densa-assoziierten Diaphoraseaktivität wurden alle klar als Macula densa identifizierbaren Zellen mit deutlichem Diaphorasesignal gezählt und die Gesamtzahl der positiven Zellen zur Gesamtzahl der Glomeruli des entsprechenden Schnittes ins Verhältnis gesetzt.⁹⁰

3.4.2 Immunhistochemische Darstellungsverfahren

3.4.2.1 Primäre Antikörper

Die für Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse verwendeten primären Antikörper waren kommerziell erhältlich und sind in Tabelle 1 dargestellt. Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland) markiert. Für alle Antikörper wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen nur der Sekundärantikörper, nicht jedoch der Primärantikörper eingesetzt wurde. Die Spezifität des ANXA1-Antikörpers wurde weiterhin verifiziert durch den Nachweis fehlender Immunfluoreszenz in Nieren von ANXA1-defizienten Mäusen. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 angegeben.

Primärantikörper	Konzentration		Bande	Gerichtet gegen	Produkt aus	Firma/Arbeitsgemeinschaft
	Immuno	Western				
ANXA1 LS-C20640	1 : 500	1 : 1000	37 kDa	Vollständiges ANXA1-Protein, Mensch	Kaninchen	Lifespan Biosciences, Cupertino, USA
COX-2 (M-19) SC-1747	1 : 50	1 : 50	82 kDa	C-Terminus, Ratte	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
COX-2 160126	1 : 500	1 : 500	72 kDa	Aminosäuren 584-598, Maus	Kaninchen	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
PLA2G4 ab58375	1 : 500			Mensch	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
β-Aktin A5441		1 : 2000	42 kDa	N-terminales Ende der β-Isoform des Aktins, Mensch, Maus	Maus	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Primäre Antikörper

3.4.2.2 Sekundäre Antikörper

Die für Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse verwendeten sekundären Antikörper waren kommerziell erhältlich und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Verwendete Sekundärantikörper	Konzentration	Gerichtet gegen	Produkt aus	Firma
Cy2-konjugiert 711-225-152	1 : 80	IgG, Kaninchen	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Cy2-konjugiert 715-225-151	1 : 80	IgG, Maus	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Cy3-konjugiert 711-165-152	1 : 250	IgG, Kaninchen	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Cy3-konjugiert 715-165-151	1 : 250	IgG, Maus	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Cy3-konjugiert 705-225-147	1 : 250	IgG, Ziege	Kaninchen	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Peroxidase/ HRP-konjugiert 711-035-152	1 : 100	IgG, Kaninchen	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Peroxidase/ HRP-konjugiert 715-035-151	1 : 100	IgG, Maus	Esel	Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA
Peroxidase/ HRP-konjugiert	1 : 100	IgG, Ziege	Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

3.4.2.3 Antikörperinkubation und Quantifizierung der Signale

3.4.2.3.1 Vorbereitung der Nierenschnitte für die Immunhistochemie

Von den perfundierten Nieren wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Kryostaten angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger transferiert und für 30 min an der Luft getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert. Die 4 µm dicken Paraffinschnitte wurden am Rotationsmikrotom (Leica, Nussloch, Deutschland) geschnitten, über Nacht getrocknet und in einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert. Die Schnitte wurden für 3 x 10 Minuten in Xylol, 2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 80% und

1 x 70% Ethanol für jeweils 5 Minuten belassen. Zur Rekonstruktion immunreaktiver Antigene wurden die Schnitte in einem 0,1 M Citratpuffer (für 10x Ansatz: 7,65 g Zitronensäure, 48,2 g Na-Zitrat auf 2 l PBS, pH 6) für 6 Minuten in einem 6-Liter Schnellkochtopf (ELO, Pfungstadt, Deutschland) gekocht und anschließend in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden vorsichtig mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und mit PAP-Stift voneinander getrennt und für 5 min in PBS rehydriert.

3.4.2.3.2 Vorbereitung der MMDD1 für die Immunhistochemie

Für die Vorbereitung der MMDD1-Zellen zur Immunhistochemie wurden die Zellen, die auf kleinen Glasplättchen in 12-Wellplatten mit gleichmäßiger Verteilung bis zur Subkonfluenz gewachsen sind, mit 3%iger Paraformaldehydlösung bei 4 °C für 10 min fixiert. Die Zellen werden für 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

3.4.2.3.3 Immunfluoreszenz

Alle Nierenschnitte und Zellen wurden in Folge zur Steigerung der Permeabilität für die Antikörper mit 0,5%iger Triton/PBS-Lösung inkubiert. Es folgte ein PBS-Waschgang. Um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen wurden die Schnitte mit 100 µl 5%iger Milchlösung (Difco-Skim milk, Becton Dickenson, Frankreich) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernung der Milch wurden die Schnitte mit der Primärantikörpermilchlösung überschichtet und nach einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C gelagert. Die optimale Konzentration der Antikörper wurde in Vorexperimenten bestimmt. Nach Primärantikörperinkubation erfolgte das Spülen der Schnitte für 3 x 5 Minuten mit PBS und die Überschichtung mit der Sekundärantikörpermilchlösung. Für die Immunfluoreszenz wurden grün-fluoreszierende Cy2- oder rote-fluoreszierende Cy3-konjugierte Sekundärantikörper verwendet.

3.4.2.3.4 Peroxidasefärbung

Für die Peroxidasefärbung wurden sowohl die Kryostat-Schnitte als auch die entparaffinierten Schnitte für 12 min in Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid inkubiert. Es folgte ein PBS-Waschgang. Zur Peroxidasefärbung kamen

Meerrettichperoxidase (horseradish-peroxidase, HRP)-konjugierte Antikörper zum Einsatz. Nach einer Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit PBS für 3 x 5 Minuten entfernt. Als letzter Schritt der Peroxidasefärbung folgte die Entwicklung mit 0,1% Wasserstoffperoxid in 3,3-Diaminobenzidintetrachlorid-Dihydrat (DAB, Kem-En-Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark). DAB fungiert als Substrat für die Peroxidase, wird oxidiert und hinterlässt eine braune Ablagerung an den Stellen, an denen sich die Peroxidase befindet. Die Reaktion wird mit einem Oxidator wie Wasserstoffperoxid aktiviert. Der Fortschritt der Entwicklung wurde unter einem Lichtmikroskop (Leica) verfolgt und anschließend mit Waschen in PBS beendet. Die Objektträger wurden anschließend mit PBS/Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt.

3.4.2.3.5 Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Auswertung

Die Nierengewebsschnitte wurden fluoreszenz- und lichtmikroskopisch an einem Leica DMLB-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) und an dem Konfokalmikroskop (LSM5-Exiter, Zeiss, Jena, Deutschland mit einem 488 nm Heliumlaser, 543 nm und 633 nm Helium-Argonlaser und einem 405 nm Diodenlaser) analysiert. Die Schnitte wurden mithilfe einer angeschlossenen SPOT3 Digitalkamera (Diagnostic Instruments, USA) fotografiert und mit MetaView 4.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) verarbeitet. Die Expression von ANXA1 und COX-2 in der Macula densa wurde durch Immunfluoreszenzdoppelmarkierung dargestellt. Zur Quantifizierung der Macula densa-assoziierten Signale wurden alle farblich markierten Zellen gezählt, die in ihrer Signalintensität deutlich die der umgebenen TAL-Zellen übertrafen. Die erhobene Summe wurde durch die Gesamtzahl der Glomeruli pro Schnitt dividiert und auf 100 Glomeruli normalisiert.

3.5.5 *ANXA1-mRNA-In-Situ-Hybridisierung*

3.5.5.1 Amplifikation ANXA1-cDNA

Die in den beschriebenen Experimenten verwendete cDNA lag als vollständiger, kommerziell erhältlicher ANXA1-Klon aus der Ratte (IRBPp993H041D, ImaGenes Inc., Berlin), subkloniert in den pCMV-SPORT6-Vektor und flankiert durch Promotorstellen für Sp6- und T7-RNA-Polymerasen, vor. Für die Herstellung des Renin-Vektors wurde ein 300bp (base pairs, Basenpaare)-langes Renin-cDNA-

Fragment aus der Ratte zwischen die Restriktionsendonukleasestellen für PstI und KpnI des pGEM3-Vektors (Promega, Madison, WI, USA) subkloniert. Die Klonierungsstelle ist ebenfalls durch Promotorstellen für Sp6- und T7-RNA-Transkriptionspolymerase flankiert.

Die In-vitro-Vervielfältigung der DNS (DNA) erfolgte mit der PCR. Dafür wurden 1 ng Vektor mit Insert und je 2 µl forward- und reverse-Primer gegen die M13-Erkennungsstellen, die beidseits der Sp6- und der T7-Promotorstellen und des ANXA1-Klons gelegen sind, verwendet. Das Protokoll entsprach dem unter 3.5.3 aufgeführten Verfahren. Für die Kontrolle des Vektors wurde eine Sequenzierung (BigDye-Terminator, SMB Services in Molecular Biology, Dr. Meixner) durchgeführt.

3.5.5.2 Transkription

Je 300 ng des so hergestellten linearen PCR-Produktes wurden für die In-vitro-Transkription mit dem DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche, Penzberg, Deutschland) verwendet. Durch die Transkription werden DIG-markierte einzelsträngige RNA-Proben definierter Länge erstellt. DIG-11-UTP wird von der SP6- und T7-RNA-Polymerase an jede 20-25. Position des Transkripts eingebaut. Dafür wurde ein Ansatz aus 2 µl Transkriptionspuffer, 2 µl RNS (RNA) und 2 µl mit Digoxigenin markiertem Nukleotidmix hergestellt und mit MilliQ (RNase freies, zweifach destilliertes Wasser) auf 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann mit 2 µl RNA-Polymerase versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 135 min wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 30 µl MilliQ, 125 µl 100%igem - 20 °C kaltem Ethanol und 5 µl 3 M Natriumacetat in Aqua dest. bei einem pH von 6 gestoppt und die RNA für 16 Stunden bei - 20 °C gefällt. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation für 30 min vom Überstand getrennt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 37 °C getrocknet, in 33 µl Aqua dest. mit 1 µl RNase-Inhibitor aufgenommen und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur gevortext. Die Qualität der mRNA (messenger RNA, Boten-RNS)-Proben wurde wiederum durch Agarosegelelektrophorese sichergestellt und die Konzentration der enthaltenen RNA photometrisch in einer 1 : 80 Verdünnung bestimmt (GeneQuant2, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Die RNA-Sonden wurden in einem 1 : 1 Verhältnis mit Formamid aufgeköcht und bei - 80 °C eingefroren.

3.5.5.3 Hybridisierung

Für die In-Situ-Hybridisierung wurden 4 µm Paraffinschnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden für 20 min in eisgekühltem 4% PFA (pH 7,4) nachfixiert und für 3 x 5 min in PBS gewaschen. Alle Folgeschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur Denaturierung von Proteinen, welche die Hybridisierung der Sonden behindern könnten, wurden die Schnitte für 20 min in 0,2 M Salzsäure inkubiert und dann für 2 x 5 min in PBS gewaschen. Für die In-Situ-Hybridisierung mit Paraffinschnitten wurden die 4 µm dicken Schnitte zuerst für 30 min bei 37 °C in 100 mg Proteinase K/PBS-Lösung belassen. Die PFA-Nachfixierung erfolgte dann nur für 5 min. Nach erneuten Waschschritten in PBS wurden sowohl die Kryostat- als auch die Paraffin-Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96%) für jeweils 5 min dehydriert und dann bei Raumtemperatur auf einem autoklavierten und mit reinem Alkohol gesäuberten Ständer getrocknet. Die Hybridisierung wurde durch eine zweistündige Inkubation mit Prähybridmix in einer 40 °C feuchtwarmen Inkubationskammer vorbereitet. Für die Herstellung des Prähybrid- und des Hybridmixes wurde eine Grundmix angesetzt. Die Inhaltsstoffe sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Menge	Inhaltsstoff	Firma
8 ml	6 M 50% Dextransulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
16 ml	100% deionisiertes Formamid	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland
2,4 ml	5 M NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,8 ml	1 M Tris-HCl pH 7,4	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,4 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
0,8 ml	50x Denhardt's	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland
0,4 ml	100 M Blockade tRNA	Roche, Penzberg, Deutschland
3,2 ml	Milli-Q	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Tabelle 3: Grundmix

80 µl Prähybridmix aus 64 µl des Grundmixes und 16 µl H₂O wurde pro Schnitt verwendet. Nach Absaugen des Prähybridmix wurden die Schnitte mit 40 µl Hybridmix überschichtet. Der Hybridmix setzte sich für jeden Schnitt aus

32 µl Grundmix, x µl RNA-Sonde und 8 - x µl H₂O zusammen. Jeder Schnitt wurde mit 100 ng RNA-Sonde inkubiert. Die optimale Konzentration und Inkubationstemperatur für die Sonde wurden in Vorläuferexperimenten bestimmt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden RNase-freie Reagenzien und MilliQ verwendet. Die Inkubationsschritte erfolgten in einer autoklavierten und mit reinem Alkohol gereinigten feuchten Kammer. Die Promotorstelle für die Sp6-Polymerase im Vektor dient zur Bildung des Kontroll-mRNA-Produkts, die der T7-Polymerase zur Bildung des ANXA1- und des Renin-mRNA-Produkts.

3.5.5.4 Waschen der Gewebsschnitte zur Entfernung nicht-hybridisierter mRNA-Proben

Nach einer Hybridisierungszeit von 16 Stunden wurden die Objektträger in einer 40 °C warmen Lösung aus einer 50% Formamid-haltigen Natriumzitatrlösung (15% Natriumzitat und 18% NaCl in Wasser) geschwenkt. Danach wurden die Objektträger in Formamid-freie Natriumzitatrlösung für 2 x 15 min bei Raumtemperatur gesetzt.

3.5.5.5 Detektion der hybridisierten mRNA-Proben

Zur Detektion der hybridisierten mRNA-Proben wurde ein immunhistochemisches Verfahren verwendet, das auf einer durch alkalische Phosphatase katalysierten Farbreaktion basiert. Die folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in Puffer 1 inkubiert. Dieser bestand aus 100 mM Tris-Hydrochlorid (HCl) und 150 mM NaCl in destilliertem Wasser (Aqua dest.). Der pH wurde durch Titration mit Natriumhydroxid (NaOH) auf 7,5 eingestellt. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch eine 30 Minuten-Inkubation mit jeweils 100 µl modifiziertem Blockingmedium abgesättigt. Das Blockingmedium bestand aus 1% Blockingreagenz (Roche, Penzberg, Deutschland) und 0,5% bovinem Serumalbumin in Puffer 1. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit 50 µl einer Lösung des Sekundärantikörpers inkubiert (mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Antidigoxigenin-FAB-Fragment 1 : 500 in modifiziertem Blockingmedium). Die Objektträger wurden für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden überschüssige Antikörper durch 2 Waschschrte in Puffer 1 bei Raumtemperatur entfernt. Dann wurden die

Schnitte für mindestens 2 Minuten in Puffer 3 equilibriert (100 mM Tris-HCl, 100 mMol NaCl, 50 mMol Magnesiumchlorid [MgCl₂] in Aqua dest., pH 9,5). Zur Generierung eines Signals wurden die Schnitte mit 100 µl Entwicklungspuffer (Sigma Fast, Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland) überschichtet. Die Entwicklung des Farbsignals erfolgte zunächst für zwei Stunden bei Raumtemperatur und dann bei 4 °C in einer abgedunkelten, feuchten Kammer. Das Fortschreiten der Signalentwicklung wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert, und die Reaktion nach ca. zwölf Stunden beendet, bevor eine zu starke Hintergrundfärbung zu verzeichnen war. Beim Abstoppen der Farbreaktion wurde darauf geachtet, dass die Inkubationszeit für alle Schnitte konstant gehalten wurde. Alle Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Terminierung der Signalentwicklung wurden die Schnitte 2 x für 15 Minuten in Puffer 4 (100 mM Tris-HCl, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Aqua dest., pH 8,0) und anschließend für 2 x 15 Minuten in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden mit 50% Glycerin in PBS überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung der In-Situ-Experimente erfolgte mit einem Leica-DMLB-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung des Interferenzphasenkontrastes. Die Fotos wurden mit der angeschlossenen SPOT3-Digitalkamera (Diagnostic Instruments, USA) aufgenommen und mit MetaView 4.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) verarbeitet.

3.5 Analyse der Genexpression in der Macula densa

Die Expression der mRNA von ANXA1, COX-2, Fpr1, Fpr2, Fpr3 und ABCA1 in der Macula densa wurde durch konventionelle PCR nachgewiesen. Alle DNA-Primer wurden mit Hilfe der NCBP-Primer-Blast-Software (NCBI, Bethesda, USA) generiert. Für die Isolierung der gesamten mRNA aus MMDD1 wurde das Qiagen-RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.5.1 RT-PCR

Die cDNA wurde durch reverse Transkription mit Hilfe des Bioscript-cDNA-Synthese-Kits (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) generiert. Als Ansatz wird die Polymerase-reverse-Transkriptase genutzt, 2,5 µl RNA, 5 µl Oligonukleotide, 0,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und 2,5 µl Aqua

dest. Die Mischung wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Als Master-Mix wurden 2,5 µl des 5 x Puffers, 1 µl DTT und 0,5 µl RNase-Inhibitor zugesetzt. Von den 4 µl werden jeweils 3,5 µl auf jede Probe geladen. Für 2 min werden die Proben bei 42 °C inkubiert, für die Zugabe von 0,5 µl Bioscript-Polymerase auf jede Probe wurden die Eppendorfgefäße kurz entnommen. Dann folgt eine Inkubation bei 42 °C für 50 min und bei 70 °C für 15 min. Dadurch wurde cDNA erhalten, die auf Eis eingefroren wurde.

3.5.2 PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion amplifiziert eine thermostabile DNA-Polymerase DNA, die durch bekannte Sequenzen flankiert ist. Die bekannten Sequenzen korrespondieren mit denen der synthetischen Oligonukleotid-Primer. Für einen Ansatz wurden 14,4 µl Aqua dest., 5 µl 5 x konzentrierter PCR-Puffer, 2 µl dNTPs, 2 µl Magnesiumchlorid, 1,25 µl jeweils beider Primer und 0,1 µl der MangoTag-Polymerase verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt.

Produkt	Sense-Primer	Antisense-Primer
ANXA1	CCCTGGATGAAACCTTGAAA	CATTCACGTCTGTCCCCTTT
COX-2	ACACTCTATCACTGGCATCC	GAAGGGACACCCTTTTACAT
Fpr1	CCATGCTCACTGTCAGAGGA	GCACAGTGGAACCTCAAAGCA
Fpr2	TCAGGTGCAAGTCAAATGG	ACAAATACAGCGGTCCAAGG
Fpr3	GGCAACTCTGTTGAGGAAAG	GGCTCTCGGTAGACGAGA
ABCA1	GTGAGCGCTGGCCTGCTGGT GGTC	CCAGCCGGGCTTCAGACACGT GCTTCC

Tabelle 4: PCR-Primer

Die Negativkontrolle stellte die PCR-Reaktion ohne cDNA dar. Die PCR wurde mit dem FlexCycle-PCR-Gerät (Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Programm lief initial für 5 min bei 95 °C, es folgten 30 Zyklen mit je 30 s 95 °C, 1 min 60 °C und 1 min 72 °C. Größe und Integrität des PCR-Produktes wurden mit Agarosegelelektrophorese und anschließender Visualisierung mit Ethidiumbromid gesichert und die RNA-Konzentration mittels Photometrie bestimmt (GenQuant2, RNA/DNA Calculator Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Alle PCR-Produkte wurden unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning-Kits (Invitrogen,

Darmstadt, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers kloniert. Die Produkte wurden sequenziert (DLMBC, Sequenzierungsservice Berlin, Deutschland).

3.5.3 Taqman

Die Taqman-Analyse als quantitative RT-PCR wurde für ANXA1 und COX-2 in den MMDD1 durchgeführt. Als Ansatz wurden 7,5 µl des fertigen Mastermixes (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 0,75 µl Sonde, 0,75 µl Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und 1 µl Aqua dest. vermischt. Der entstandene 10 µl Ansatz wird jeweils mit 5 µl cDNA Probe versetzt. Die 15 µl werden auf die Wellplatte geladen. TaqMan-quantitative-RT-PCR für ANXA1 und COX-2 wurde mit dem 7500-Fast-Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) den Herstelleranweisungen folgend durchgeführt. Die mRNA-Konzentration wurden gemessen und mit den GAPDH-Konzentrationen (4352338E, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), die als Ladekontrollen dienten und zur gleichen Zeit bestimmt wurden, abgeglichen. Als ANXA1-Sonde wurde Rn 01454280 und als COX-2-Sonde wurde Mm 00478374 (beide Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Zur Auswertung wurde das Programm 7500-Fast-System-SDS-Software verwendet. Die Expressionslevel wurden berechnet mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode und dargestellt als % der Kontrolle.

3.6 Zellkulturexperimente

Alle Zellkulturstudien wurden in Triplets durchgeführt und in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt. Vor dem Beginn der Experimente wurden die Zellen über 24 h mit FCS-freiem Medium behandelt.

3.6.1 Substanzen zur Stimulation der MMDD1

Für die Veränderung des Salztransports in den MMDD1 wurden die Zellen entweder mit 0,1 mM Furosemid oder mit einer Chlorid-defizienten Lösung behandelt, die schon in anderen Studien an der Macula densa eingesetzt wurden.⁶ Die Lösung mit dem normalen Chlorid-Gehalt, die Kontrolllösung, bestand aus 135 mM NaCl, 4 mM Kaliumchlorid (KCl), 1 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 1 mM Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), 2 mM Natriumsulfat (Na₂SO₄) und 15 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES). Die Chlorid-arme

Lösung unterschied sich nur in der NaCl-Komponente von der Lösung mit dem normalen Chlorid-Gehalt. Sie enthielt 135 mM Natriumgluconat anstelle des NaCl. Die Salzlösungen wurden 1 : 1 mit FCS-freiem DMEM/F12 Medium vermischt und für 12 h bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Um die Effekte von Glukokortikoiden auf die ANXA-1- und COX-2-Expression zu analysieren wurden MMDD1 für acht Stunden mit 0,1 µmol Dexamethason (DXM; in Tabelle 5 aufgeführt) gelöst in 100% Ethanol inkubiert. Der Effekt von DXM auf die ANXA1-Ausschüttung aus den MMDD1 wurde nach vier Stunden studiert. Die Kontrollzellen wurden mit Ethanol als Vehikel behandelt. Um die toxischen Effekte des gelösten Ethanols zu minimieren, wurde die endgültige Ethanol-Konzentration in der Lösung unter 1 ‰ gehalten. Am Ende der Behandlungsperiode wurden die Zellen für die cDNA-Herstellung und die Western-Blot-Analyse vorbereitet. Der Zellkulturüberstand wurde parallel dazu gesammelt und einer Proteinpräzipitation (siehe 3.6.2) unterzogen. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Glibenclamid über eine Inhibition des ABCA1 die Sekretion von ANXA1 aus Zellen der Adenohypophyse hemmen kann.⁷⁰ Zur Analyse der Macula densa-spezifischen ANXA1-Sekretion wurde die Inhibition des ABCA1 durch Glibenclamid an MMDD1-Zellen wiederholt und der Zellkulturüberstand anschließend wie oben beschrieben untersucht. Extrazelluläres ANXA1 aktiviert Rezeptoren der Familie der Fpr.⁷³ Um den Effekt der Fpr auf die Macula densa-COX-2-Expression zu untersuchen, wurden die MMDD1-Zellen für acht Stunden mit dem nichtselektiven Fpr-Agonist fMLF gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Weiterhin wurden die MMDD1-Zellen dem N-terminalen ANXA1-Fragment AC2-26 (50 µM; AnaSpec, Fremont, USA) gelöst in 1M NaOH-Lösung ausgesetzt. Mit DMSO oder NaOH-Lösung behandelte MMDD1-Zellen fungierten als Kontrolle. Nach acht Stunden wurden die Zellen für die cDNA-Herstellung und die Western-Blot-Analyse vorbereitet. Zur weiteren Charakterisierung der Fpr-Wirkung in der Macula densa wurden selektive Antagonisten eingesetzt. Für Fpr1 wurde CyH, für Fpr2 und Fpr3 wurde WRW4 verwendet.⁹¹ Die Zellen wurden entweder mit DXM, CyH oder WRW4 allein oder in Kombination von DXM und einem der spezifischen Inhibitoren inkubiert. Mit Vehikel behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach acht Stunden wurden die Zellen für die cDNA-Herstellung vorbereitet.

Wirkstoff	Firma	Lösungskontrolle
Dexamethason (DXM) 0,1 µM	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland	Ethanol
N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) 1 µM	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland	Essigsäure
AC2-26 50 µM	AnaSpec, Fremont, USA	1M NaOH-Lösun
Cyclosporin H 0,1 µM	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz	Ethanol
Furosemid 0,1 mM	Intervet, Unterschleißheim, Deutschland	Aqua dest.
Glibenclamid 50 µM	Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland	DMSO
Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp (WRW4) 10 µM	Ana Spec, Kalifornien, USA	DMSO

Tabelle 5: Wirkstoffe zur Behandlung der MMDD1

Nach der Behandlung wurden die Zellen entweder in 3%iger Paraformaldehydlösung für Immunfluoreszenz fixiert oder für die cDNA-Präparation und folgender Taqman-real-time-RT-PCR bearbeitet.

3.6.2 Transfektion des ANXA1-Plasmids

Für Überexpressionsstudien wurden MMDD1 mit einem kommerziell erwerblichen vollständigen ANXA1-Klon aus der Ratte (pCMV-SPORT6-rANXA1; IRBPp993H041D; ImaGenes Inc., Berlin, Deutschland) transfiziert. Der pCMV-SPORT6-rANXA1 wurde in eine E. coli-Bakterienkultur (one shot competent cells XL blue, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) transfiziert. Das Bakterienvollmedium setzte sich aus 5 g Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich), 2,5 g Hefe-Extrakt (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich) und 5 g NaCl gelöst in 500 ml Aqua dest. zusammen. Über Nacht wuchsen die Bakterien bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde die DNA per Mini-Präp mit dem Plasmid-DNA-Purification-Kit (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend der Empfehlung des Herstellers

extrahiert. Die ANXA1-dsDNA-Konzentration erfolgt durch Lichtabsorptionsmessung (GeneQuant2, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei 260 nm nach 1 : 100 Verdünnung der Proben mit Aqua dest. Die Integrität der DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese sichergestellt. Die Absorption im UV-Spektrum bei 280 nm erfolgt durch Proteine und gilt als Maßstab für den Grad der Verunreinigung. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamin (FuGENE 6 Transfection Reagent, Roche, Mannheim, Deutschland). Bei dieser Transfektionsmethode wird genetisches Material durch Liposomen in die Zellmembranen eingeschleust.⁹² Für die Transfektion wurden 35 mm- oder 60 mm-Petrischalen mit einer MMDD1-Dichte von 30% genutzt. Für die 35 mm-Petrischalen wurden jeweils 2 µg ANXA1-DNA mit 6 µl FuGENE verwendet. Für die 60 mm-Petrischalen wurden je 4 µg ANXA1-DNA mit 12 µl FuGENE genutzt. Die DNA wurde in PBS gelöst und mit dem FuGENE versetzt. Bei Raumtemperatur bildeten sich Micellen aus der DNA und den Lipiden des FuGENEs. Der Kontrollansatz enthielt die gleiche Menge des FuGENEs, anstelle der DNA wurde Aqua dest. eingesetzt. Die Lösungsansätze wurden mit frischem FCS- und Antibiotika-freiem Medium auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde eine Protein-Präzipitation des Zellüberstandes und eine cDNA-Herstellung aus den Zellen vollzogen.

3.6.3 Proteinfällung aus dem Medium

Um den Effekt von DXM oder von ANXA1-Überexpression auf die ANXA1-Sekretion zu zeigen, erfolgte eine Protein-Präzipitation des Zellüberstandes der MMDD1. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn des Experiments FCS-freiem Medium behandelt. Nach einer vierstündigen Behandlung der MMDD1-Zellen mit 0,1 µM DXM-haltigem FCS-freiem Medium wurde das Medium gefällt und für die Western-Blot-Analyse vorbereitet. Die Fällung der Proteine im Medium erfolgte durch eine modifizierte Trichloressigsäure-Präzipitation.⁹³ Jeweils 1 ml Medium wurde entnommen. Die Zellreste wurden für zehn Minuten bei 4 °C und 800 x g abzentrifugiert (Mikrozentrifuge 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde mit 250 µl 100% Trichloressigsäure versetzt. Die Inkubationszeit betrug zehn Minuten bei 4 °C. Darauf folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 1 800 x g. Der Überstand wurde vorsichtig bei 4 °C vom Proteinpellet abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl kaltem

Aceton gewaschen und nochmals bei 18 000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und der Azetonwaschgang wurde wiederholt. Das Pellet wurde bei 95 °C für 5 min getrocknet. Das Auflösen des Pellets erfolgte in 30-50 µl Laemmlis Probenpuffer (vierfach-konzentrierter Probenpuffer: 50 ml Tris Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 6,8, 4 g SDS, 20 ml Glycerin, 10 ml Mercaptoethanol, 600 µl 1% Bromphenolblau). Vor dem Auftragen auf das SDS-Elektrophoresegel für die Western-Blot-Analyse wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert.

3.6.4 Western-Blot

Die Zellen wurden dreimal mit PBS (Dulbecco's PBS, H15-002, PAA Cell Culture Company, Pasching, Österreich) gewaschen, dann mit einem Spatel von den 60 mm-Petrischalen gekratzt und in jeweils 8 ml PBS aufgenommen und in 15 ml-Falcons überführt. Die Falcons wurden in bei 4 °C für 20 min mit 1 200 x g zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde in je 100 µl Homogenisierungspuffer (42,8 g 250 mM Saccharose, 665 µl 10 mM Triethanolamin (TEA) auf 500 ml Aqua dest., pH 7,55 und 10 Proteinase-Inhibitor-Complete-Protease-Tabletten (Roche, Penzberg, Deutschland). Alle Proben wurden dreimal für 72 ms mit 70% der Maximalintensität mit einem Ultraschallgerät (UW70) geschallt. Die Zellkerne wurden mit 800 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml-große Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die absolute Proteinkonzentration aller Proben wurde mit einem Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, USA) quantifiziert. Proteinkonzentrationen zwischen 2 und 40 µg/ml können mit dem Kit gemessen werden. Die Grundlage der Reaktion ist die 2,2-Bichinolin-4,4-dicarbonensäure (BCA), die mit einfach geladenen Kupfer-Ionen einen rötlichen wasserlöslichen Farbkomplex bildet. In alkalischem Milieu erfolgte die Bildung einfach geladener Kupfer-Ionen durch Reduktion zweifach geladener Kupfer-Ionen. Der Farbkomplex hatte eine starke Farbabsorbierung bei 562 nm, die sich linear mit steigenden Proteinkonzentrationen verhält. Die Standardreihe wurde mit einer 2 M Serumalbuminlösung zweimalig gebildet aus 1000-500-250-125-62,5-31,3-15,6-7,8-3,9 µg/ml. Jede Probe unbekannter Proteinkonzentration wurde dreimal in einer 1 : 100 Verdünnung hergestellt. In eine 96-Wellplatte wurde in jedes Well jeweils 100 µl Probe geladen. 100 µl Entwicklungslösung des Assay

Kits wurde in jedes Well pipettiert. Nach 1,5 h bei 37 °C wurde die Lichtabsorbtion bei 562 nm gemessen und die Probenkonzentration durch Vergleich mit der Standardreihe errechnet. Nach Zugabe von vierfach-konzentriertem Laemmlis Probenpuffer wurden die Proteine bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit 10%igen Polyacrylamid-Gelen (für 4 Gele: 7 ml Acrylamid [30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid in Aqua dest.], 7 ml Gelpuffer [3 M Tris-Base, 0,3% SDS in Aqua dest; pH 8,45, 2,5 ml Glycerol, 4 ml Aqua dest.], 200 µl APS (100 mg/ml Aqua dest.), 10 µl N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine [Temed, BioRad,Hercules, Kalifornien] durchgeführt. Gelelektrophorese erfolgte mit 2 µg jeder Probe bei einer Spannung von 100-120 V. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) bei 100 V für 1,5 Stunden geblottet. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinladung und des erfolgreichen Blottens erfolgte die Visualisierung der auf der Nitrozellulosemembranen vorhandenen Proteinmenge mit 0,1%iger Ponceau-Rot-Lösung (0,5% Ponceau, 1 ml Essigsäure mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt; Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Membranen für 30 min in 5%iger fettfreier Milch in PBS (Difco Skim milk, Becton Dickenson, Frankreich) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Für die Detektion von ANXA1 wurde der gegen das humane ANXA1 gerichtete Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 2000 verwendet. Die gebundenen Primärantikörper wurden durch mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Antikörper (Jackson Immuno Research, Pennsylvania, USA) detektiert. Die Membranen wurden mit einer Chemilumineszenz-Lösung (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien) benetzt. Anschließend wurden Röntgenfilme (Hyperfilm, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien) mit den Membranen belichtet. Die entwickelten Röntgenbilder wurden eingescannt (Epson, V350 Photo, Meerbusch, Deutschland) und für die densitometrische Auswertung der Resultate mit dem Programm Alpha-Imager (Cell Biosciences, Santa Clara, USA) analysiert. Die Proteinkonzentrationen wurden auf die Konzentration von β -Aktin normalisiert und als % der Kontrolle dargestellt.

3.7 Live-Cell-Imaging

Live-Cell-Imaging an isolierten JGA-Präparaten haben gezeigt, dass Calcium-Oszillationen im TAL und in der Macula densa vorhanden sind. Da bekannt war, dass ANXA1 Calcium-abhängig seine Bindungseigenschaften und seine intrazelluläre Verteilung verändert, wurde untersucht, welchen Einfluss eine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Lokalisation von ANXA1 in der Macula densa hat. Hierfür wurden MMDD1-Zellen mit einem ANXA1-YFP-Plasmid transfiziert, das ein Fusionsprotein aus humanem ANXA1 und einem gelb-fluoreszierenden Protein kodiert.⁷¹ Die transfizierten Zellen wurden mit einem LSM Exciter-Konfokalmikroskop und der ZEN-Software (Zeiss, Jena, Deutschland) visualisiert. Die Zellen wurden mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin permeabilisiert und Calciumchlorid wurde dem Medium zugeführt bis zu einer Konzentration von 2 mM. Die Lokalisationsänderung von ANXA1 wurde über eine Periode von 30 Minuten beobachtet. In Kontrolleexperimenten blieb die ANXA1-Lokalisation über eine Stunde unverändert. In einem parallelen Experiment wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration mit Hilfe von Fluo-8 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers überprüft.

3.8. Präsentation der Daten und statistische Bearbeitung

Alle gemessenen Werte sind mit der durchschnittlichen Standardabweichung als \pm SEM dargestellt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem unpaarigen Student's-t-Test nach Gosset. Die Nullhypothese wurde ausgeschlossen bei einem p von $< 0,05$.

4 Resultate

4.1 ANXA1-, COX-2- und PLA2G4-Lokalisation

Zur Charakterisierung der Funktion von ANXA1 in der Niere ist die detaillierte Kenntnis der ANXA1-exprimierenden Strukturen eine wichtige Grundlage. Weiterhin ist der örtliche Bezug zu den Schlüsselenzymen der PGE₂-Bildung, PLA₂G₄ und COX-2, bedeutend. Zunächst erfolgte daher die Lokalisation von ANXA1 mittels Peroxidasefärbung, Immunfluoreszenz und In-Situ-Hybridisierung in SD-Ratten- und Mäusenieren, sowie mittels Immunfluoreszenz auf MMDD1-Zellen. Die Korrelation der Lokalisation von ANXA1 zu COX-2 erfolgte mit Hilfe von Immunfluoreszenz. Weiterhin diente eine Doppelmarkierung mit NOS1 als Macula densa-Marker zur Bestätigung der Lage von ANXA1 in der Macula densa.

4.1.1 ANXA1-Peroxidasefärbung

In der Peroxidasefärbung zeigte sich immunreaktives ANXA1 sowohl auf Paraffin- als auch auf renalen Gefriergewebeschnitten von Mäusen und Ratten immer in einer vergleichbaren Lokalisation. Im Kortex konnte ANXA1 in den Podozyten und im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel in starker Intensität gezeigt werden. Ein abruptes Ende der ANXA1-Immunreaktivität trat am Übergang des Glomerulums zum proximalen Tubulus auf, der auch im weiteren Verlauf keine ANXA1-Färbung aufwies. Im Kortex zeigte zudem der aufsteigende Teil der Henleschen Schleife eine mittelstarke Färbung für ANXA1. Die Macula densa zeichnete sich dagegen stets durch eine ausgeprägte ANXA1-Immunreaktivität im Vergleich zu den umgebenden Zellen der aufsteigenden Schleife aus. Dabei wurde die Macula densa anhand ihrer charakteristischen morphologischen Eigenschaften, wie der typischen Zellform und Lokalisation, sowie durch das Vorkommen von NOS1 identifiziert. Unter Kontrollbedingungen war das immunreaktive ANXA1 in der Macula densa homogen im Zytosol verteilt. In der äußeren Medulla präsentierte sich der aufsteigende Teil der Henleschen Schleife als ANXA1-positiv. Das S₃-Segment des proximalen Tubuluses zeigte keine ANXA1-Immunreaktivität. In der inneren Medulla waren sowohl Haupt- als auch Nebenzellen des Sammelrohrs positiv für ANXA1. Die dünnen Schleifen wiesen eine schwache und unregelmäßige Färbung in den Zellkernen für ANXA1 auf. ANXA1 konnte auch in interstitiellen Zellen und in den Endothelzellen renaler Gefäße gezeigt werden. Die Verteilung von ANXA1 in der Niere ist in einer Übersichtsaufnahme und einem

Schema (Abbildung 9) sowie im Detail (Abbildung 10) dargestellt. Unsere Daten bestätigen damit frühere ANXA1-Lokalisationsstudien von McKanna et al.³⁶

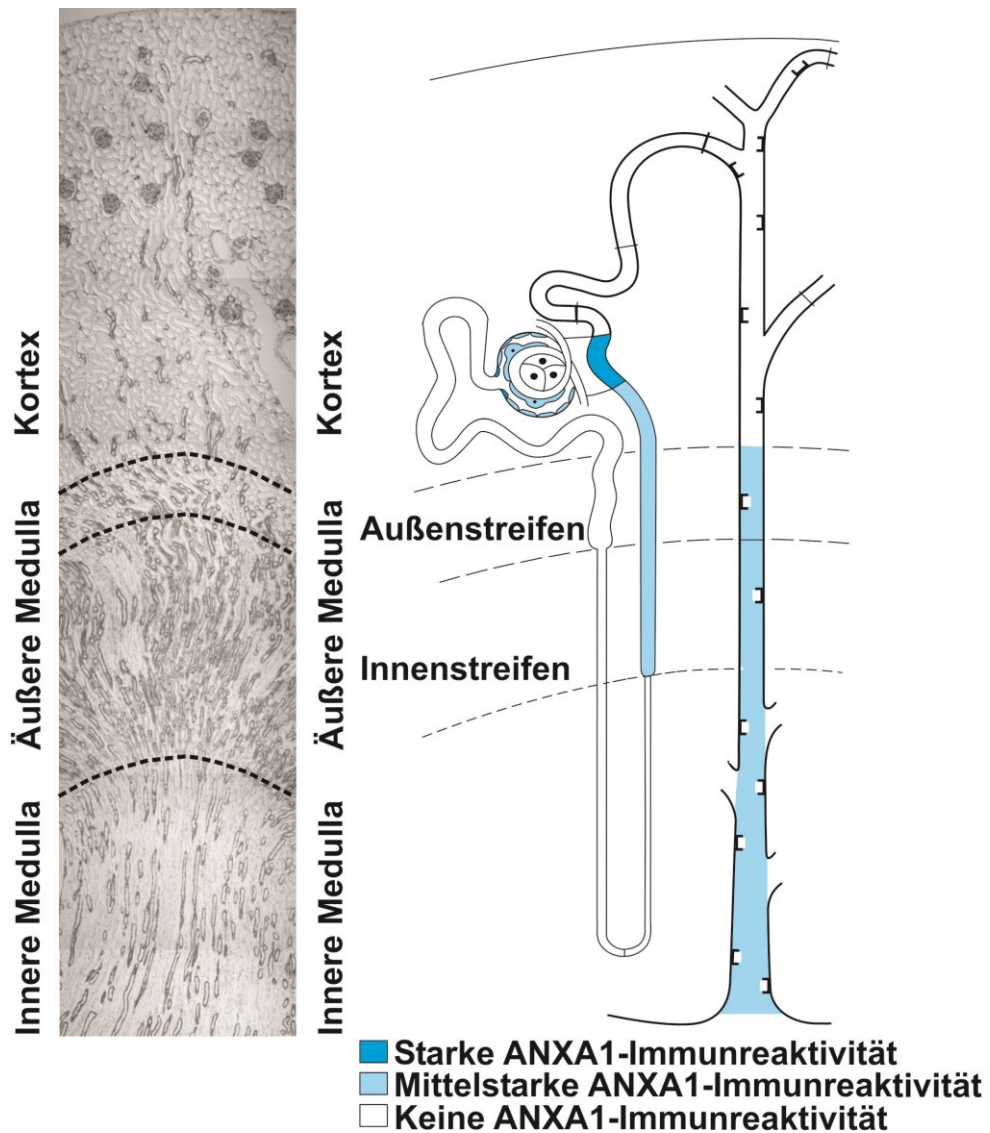


Abbildung 9: Übersichtsaufnahme und schematische Darstellung der ANXA1-Verteilung in der Niere. Die ANXA1-Immunreaktivität in der Macula densa, in den Podozyten und im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel ist sehr stark ausgeprägt und in der schematischen Abbildung in einem dunklen Blau dargestellt. In der Übersichtsaufnahme sind diese Zellen in den intensiv ANXA1-immunreaktiven Glomeruli im oberen Drittel des Bildes zu sehen. In der Medulla zeichnen sich der dicke aufsteigende Teil der Henleschen Schleife und die Sammelrohrzellen durch eine mittelstarke ANXA1-Immunreaktivität in der Übersichtsaufnahme aus. In der schematischen Darstellung sind diese Abschnitte durch eine hellblaue Markierung repräsentiert. Die Abschnitte ohne ANXA1-Immunreaktivität sind weiß abgebildet (Peroxidasefärbung; Originale Vergrößerung ist 400 x).

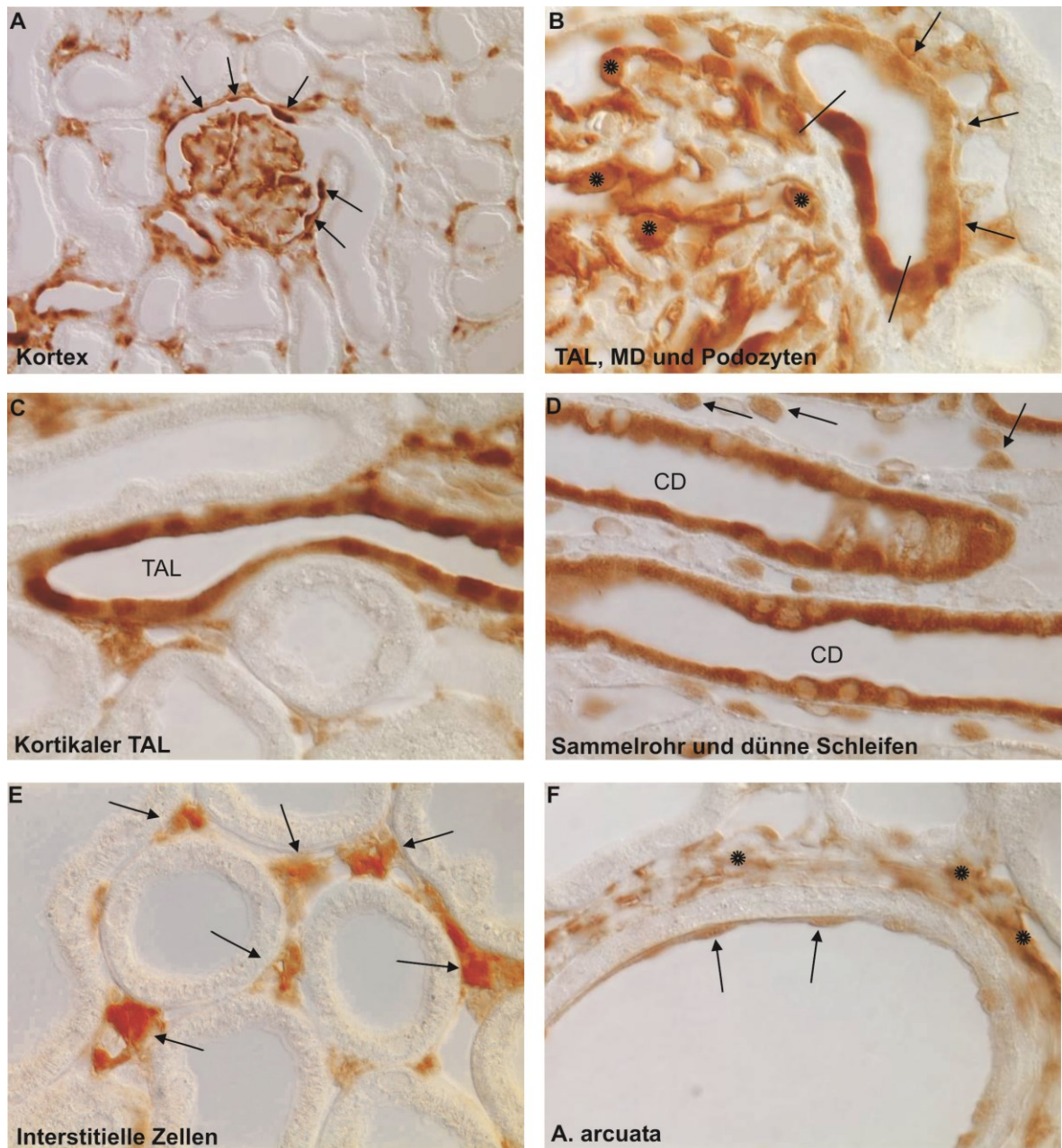


Abbildung 10: Detailaufnahmen der ANXA1-Peroxidasefärbung

Die Bilder der ANXA1-Peroxidasefärbung (**A-F**) zeigen die Verteilung von ANXA1 im Kortex (**A**), die detaillierte Verteilung von ANXA1 in der Macula densa (MD, flankiert von zwei Strichen in **B**), im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel (markiert mit Pfeilen in **A**), in dem dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife (thick ascending limb, TAL, markiert mit Pfeilen in **B**, beschriftet in **C**), in den Podozyten (markiert mit Sternen in **B**), im Sammelrohr (collecting duct, CD, beschriftet in **D**) und intranukleär in den dünnen Schleifen der Medulla (markiert mit Pfeilen in **D**), in den interstitiellen Zellen (markiert mit Pfeilen in **E**), in den Endothelzellen der Gefäße (markiert mit Pfeilen in **F**) und in dem perivaskulären Bindegewebe (markiert mit Sternen in **F**) der Rattenniere (Peroxidasefärbung: Originale Vergrößerung für A ist 400 x, für B-F 1000 x).

4.1.2 ANXA1-In-Situ-Hybridisierung

Weitere Untersuchungen für die genaue Expression von ANXA1 in der Niere erfolgten mittels In-Situ-Hybridisierung. Hierbei zeigte sich eine hohe Konzentration von ANXA1-mRNA in der Macula densa und in den Podozyten (Abbildung 11).

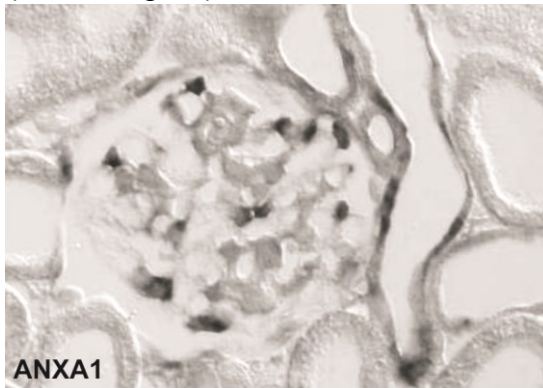


Abbildung 11: ANXA1-In-Situ-Hybridisierung
Representatives Lichtmikroskopiebild zeigt ANXA1-mRNA in der Macula densa und in den Podozyten der SD-Rattenniere (In-Situ-Hybridisierung: Originale Vergrößerung 400 x).

4.1.3 ANXA1-Immunfluoreszenz in Doppelmarkierung mit NOS1

Um die ANXA1-Lokalisation in der Macula densa in einem weiteren Experiment zu bestätigen, wurde eine Doppelmarkierung von ANXA1 mit dem Macula densa-Marker NOS1 in Nieren von SD-Ratten durchgeführt. Es zeigte sich eine hochgradige Kolo­kalisierung von stark-immunreaktivem ANXA1 mit NOS1 in den Macula densa-Zellen (Abbildung 12).

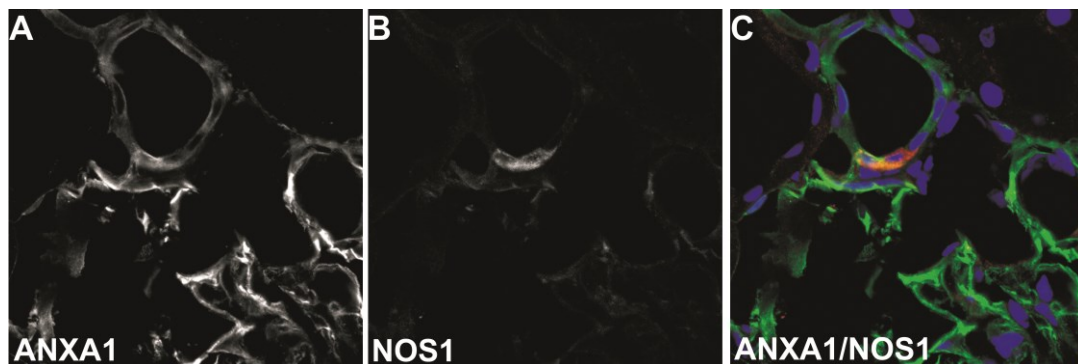


Abbildung 12: ANXA1- und NOS1-Kolokalisation in SD-Ratten

Immunreaktives ANXA1-Protein (A) und NOS1-Protein (B), das als Macula densa-Marker bekannt ist, sind in hohem Maße kolokalisiert (C; Immunfluoreszenz: Originale Vergrößerung 400 x).

4.1.4 ANXA1-, COX-2- und PLA2G4-Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz bestätigt sich die intensive Anreicherung von immunreaktivem ANXA1 in der Macula densa. ANXA1 war dabei im Ruhezustand homogen im Zytosol und in geringerer Konzentration im Zellkern verteilt. Auch für COX-2 stellte sich eine spezifische Lokalisation in der Macula densa dar, wobei COX-2 vor allem perinukleär verteilt war. PLA2G4 zeigte sich ebenfalls mit einer

besonderen Intensität in den Macula densa-Zellen und war dort wie ANXA1 homogen im Zytosol und im Zellkern verteilt, mit gering gesteigerter perinukleärer Akkumulation (Abbildung 13). Vor dem Einsatz der MMDD1 als Macula densa-Zellkulturmodell für die Experimente dieser Studie wurde anhand ihres mRNA-Expressionsmusters überprüft, ob die Zellen ANXA1, COX-2, ANXA1-Rezeptoren Fpr1-3 und dem potenziellen ANXA1-Transporter ABCA1 exprimieren (Abbildung 14). Die Identität der PCR-Produkte wurde mit TA-Klonierung und Sequenzierung bestätigt. Bereits in der Originalarbeit von Yang et al. konnte die mRNA der Macula densa-typischen Proteine COX-2, NOS1, NKCC2, ROMK und Oxytocin-Rezeptoren in den MMDD1 nachgewiesen werden.²⁰

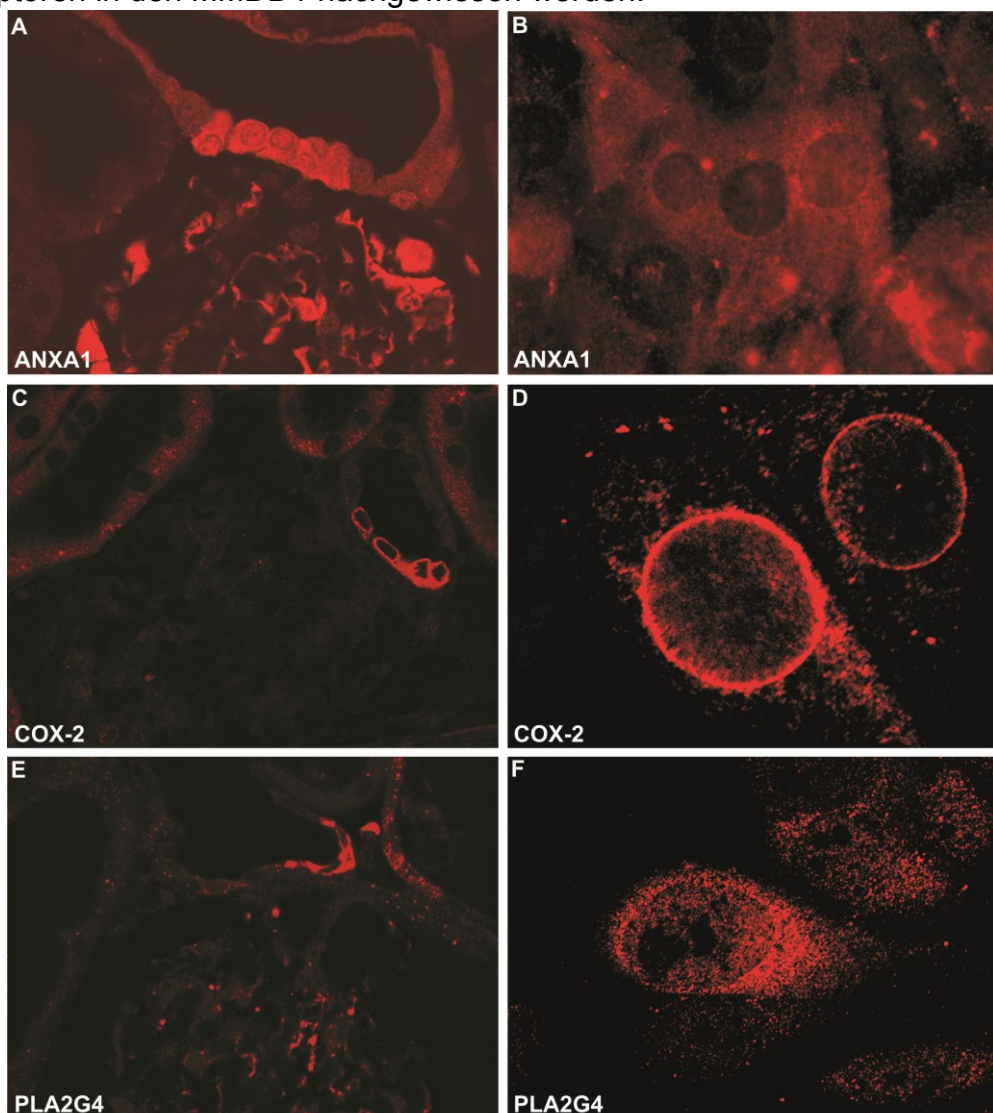


Abbildung 13: ANXA1-, COX-2- und PLA2G4-Immunfluoreszenz

Die Darstellung zeigt exemplarisch ANXA1 (A, B), COX-2 (C, D) und PLA2G4 (E, F) in roter Immunfluoreszenz in der Rattenniere (A, C, E) und in MMDD1-Zellen (B, D, F). ANXA1 und PLA2G4 sind vor allem zytosolisch und nukleär, COX-2 vor allem perinukleär, in geringem Maße auch zytosolisch verteilt. (Immunfluoreszenz: Originale Vergrößerung 400 x).

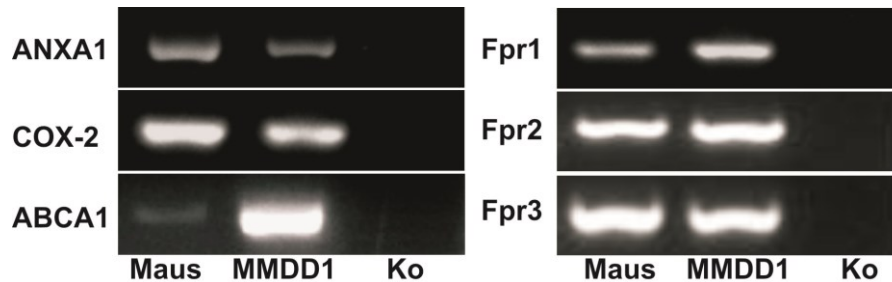


Abbildung 14: cDNA-Expressionsmuster der MMDD1

In den MMDD1-cDNA-Proben kann die Expression von ANXA1, COX-2, Fpr1-3 und ABCA1 nachgewiesen werden.

4.2 Einfluss des Salztransports in der Macula densa auf die ANXA1- und COX-2-Expression

Basierend auf der intensiven und spezifischen Lokalisation von ANXA1, COX-2 und PLA2G4 in der Macula densa, lässt sich eine funktionelle Relevanz vermuten. Ein bekannter Stimulus für die COX-2-Expression in der Macula densa ist Furosemid oder eine salzarme Diät. In den folgenden Teilstudien sollte untersucht werden, ob auch ANXA1 in Abhängigkeit vom Salztransport in der Macula densa reguliert wird.

4.2.1 ANXA1- und COX-2-Expression nach Furosemid-Behandlung im Tiermodell

In dieser Teilstudie sollte die Expression von ANXA1 in Abhängigkeit der Salzresorption untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Salzaufnahme in die Macula densa durch verschiedene Interventionen experimentell verändert. Die Versuchstiere erhielten eine chronische subkutane Therapie mit Furosemid via osmotischer Minipumpe. In der Immunfluoreszenz und Immunhistochemie wurden immunreaktives ANXA1 und COX-2 in den Nieren dargestellt (Abbildung 15) und ANXA1- und COX-2-exprimierende Macula densa-Zellen auf den Nierenschnitten ausgezählt. Für die Zellkulturexperimente wurden MMDD1 entweder mit Furosemid oder einer Chlorid-freien Lösung behandelt. Die Quantifizierung der mRNA- und Proteinmenge von ANXA1 und COX-2 erfolgte mittels Taqman-rtPCR und Western Blot-Analyse. Im Tierversuch verursachte die Furosemid-Behandlung eine signifikante 2,5fache Steigerung der Anzahl ANXA1-immunreaktiver Zellen in der Macula densa (51 ± 16 vs. 126 ± 19 Zellen/100 Glomeruli; $p < 0,05$), wobei die intrazelluläre Verteilung von ANXA1 in der Macula densa unverändert war. Die Zahl der COX-2-exprimierenden Macula densa-Zellen war ebenfalls erhöht

(54 ± 9 vs. 183 ± 24 Zellen/100 Glomeruli; $p < 0,05$; Abbildung 16). In der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass $59\% \pm 3\%$ aller ANXA1-immunreaktiven Macula densa-Zellen auch COX-2-immunreaktiv sind. Nahezu alle COX-2-positiven Macula densa-Zellen sind ebenfalls positiv für ANXA1 (Abbildung 17). Das Ausmaß der Kolo-kalisation wurde nicht durch Furosemid beeinflusst (95 ± 5 vs. $99 \pm 0,78$ Zellen/100Glomeruli; $p = 0,2$; Abbildung nicht gezeigt). Die Lokalisation von ANXA1 und anderen Enzymen, die für den TGF im JGA wichtig sind, ist in Abbildung 18 in einem Schema dargestellt.

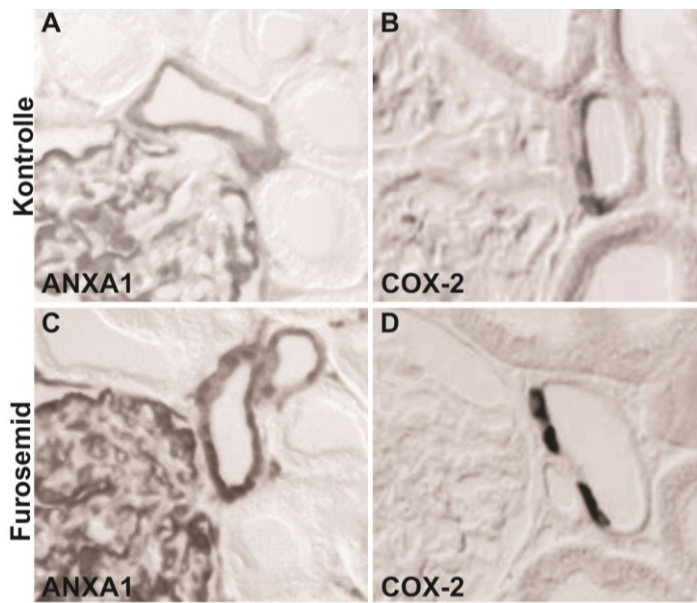


Abbildung 15: ANXA1- und COX-2-Immunreaktivität in mit Furosemid behandelte SD-Ratten. Die Immunreaktivität von ANXA1 ist in den mit Furosemid behandelten SD-Ratten (C) im Vergleich zu den Kontrolltieren (A) erhöht. Auch COX-2-immunreaktive Komplexe treten in höherer Intensität in den mit Furosemid behandelten Ratten (D) im Vergleich zu den Kontrolltieren (B) auf (Peroxidasefärbung: Originale Vergrößerung ist 400 x).

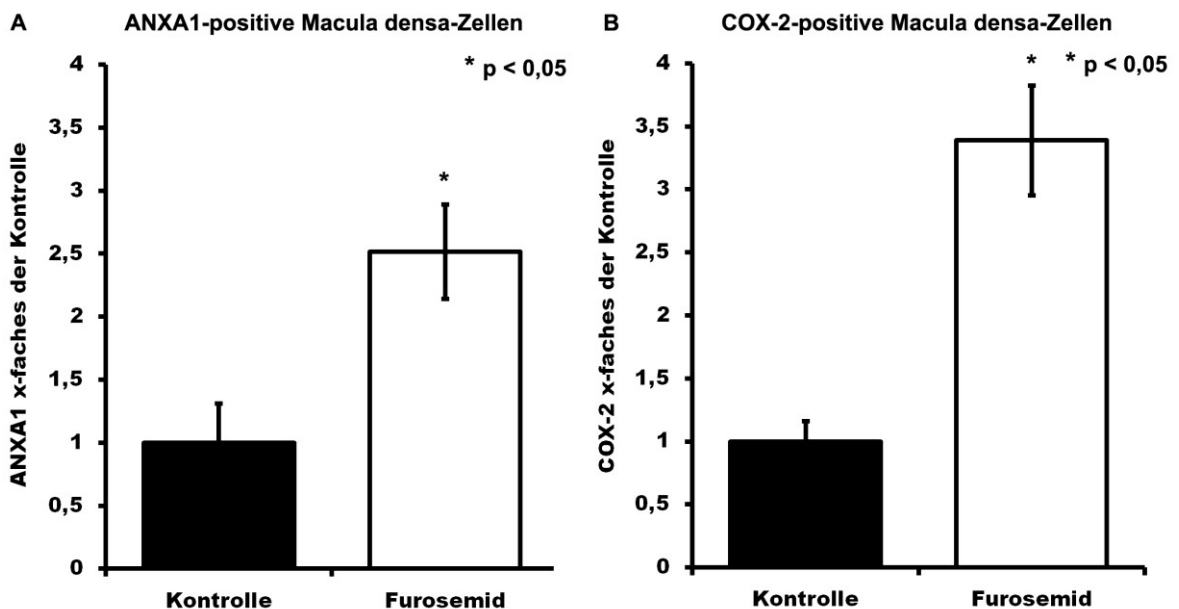


Abbildung 16: ANXA1- und COX-2-Expression in der Macula densa

Die Furosemid-Behandlung verursacht eine signifikante Steigerung der Anzahl der stark ANXA1-positiven Macula densa-Zellen (51 ± 16 vs. 126 ± 19 Zellen/100 Glomeruli; $p < 0,05$; A). Die Zahl der COX-2-exprimierenden Zellen ist gleichermaßen erhöht (54 ± 9 vs. 183 ± 24 Zellen/100 Glomeruli; $p < 0,05$; B).

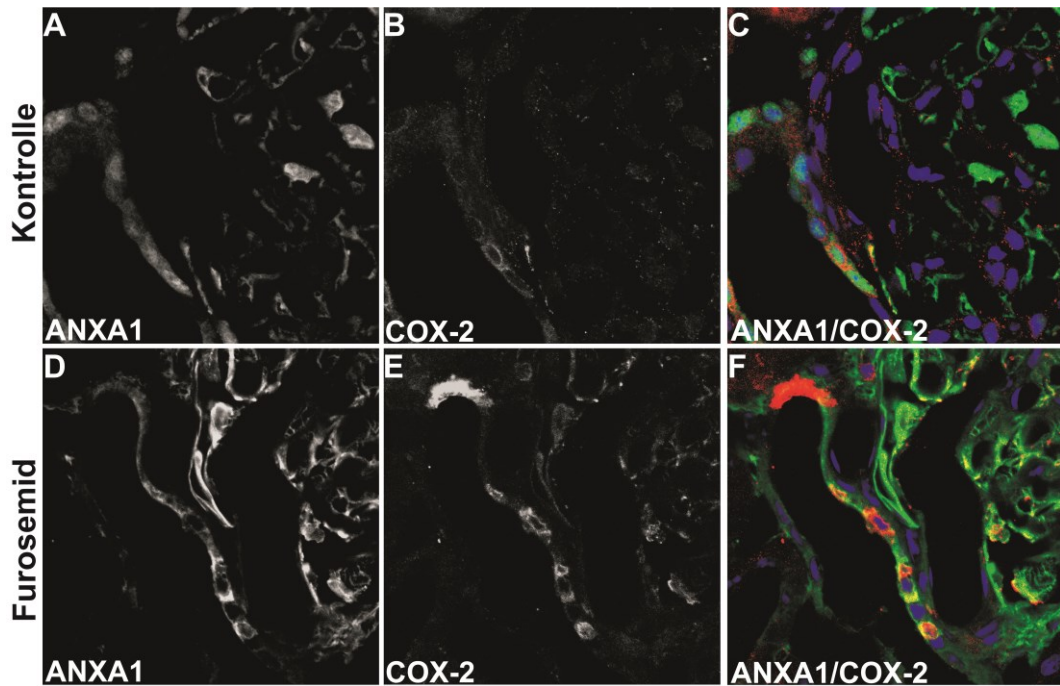


Abbildung 17: ANXA1- und COX-2-Koexpression in mit Furosemid behandelten SD-Ratten
 Die Expression von ANXA1 (A, D) und COX-2 (B, E) ist in den mit Furosemid behandelten Ratten (D-F) höher als in Kontrolltieren (A-C). Das Ausmaß der Koexpression von ANXA1 und COX-2 ist dabei unverändert (C, F) (Immunofluoreszenz: Originale Vergrößerung 400 x).

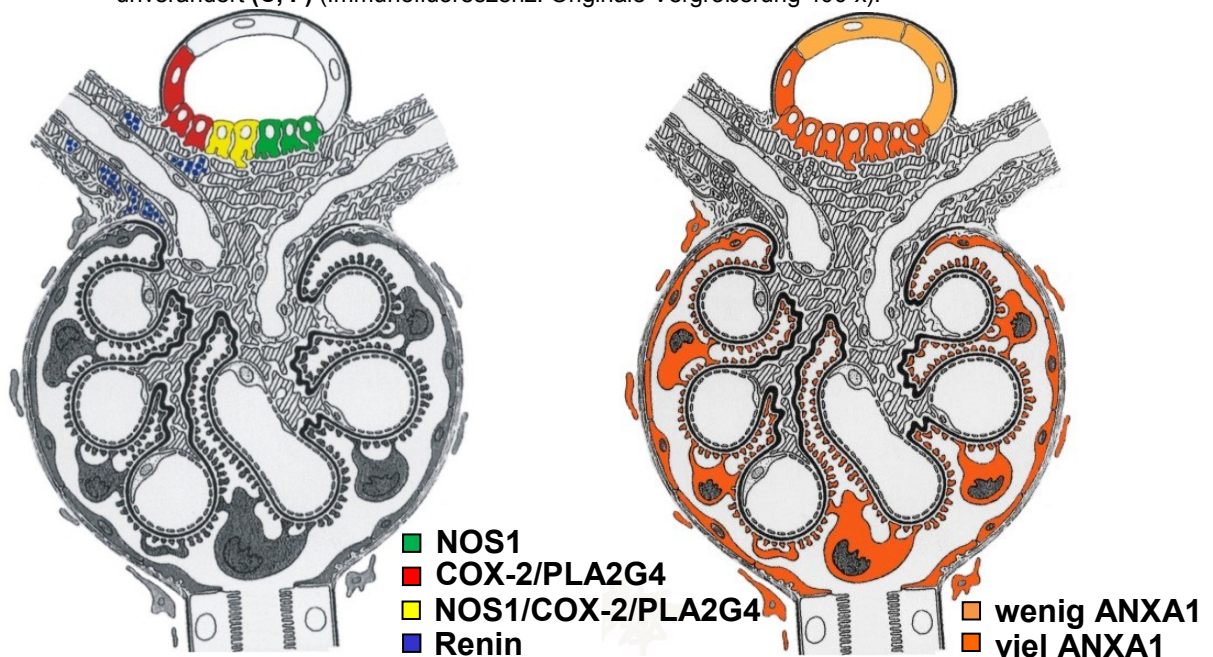


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Verteilung der Immunreaktivität von ANXA1, COX-2, PLA2G4 und Renin

COX-2 (rot), PLA2G4 (rot) und NOS1 (grün) sind typische Enzyme der Macula densa. Sie treten in kräftiger Immunreaktivität unabhängig voneinander in einigen Macula densa-Zellen auf, in anderen ist eine deutliche Kolokalisation (hier gelb) auffällig. Renin (blau) ist ein weiteres, für den JGA sehr bedeutendes Enzym, das in den granulären juxtaglomerulären Zellen an der afferenten Arteriole produziert wird. ANXA1 zeigte sich in den COX-2- und NOS1-positiven Macula densa-Zellen, in den Podozyten, inklusive deren Fortsätzen, im inneren Blatt der Bowman-Kapsel und in interstitiellen Zellen der Niere (orange, dunkel) und in einer weniger intensiven Färbung im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife (orange, hell).

4.2.2 Behandlung der MMDD1 mit Furosemid und Chlorid-freier Lösung

Zur Untersuchung des Effekts von Furosemid auf die Macula densa in der Zellkultur wurden MMDD1-Zellen für jeweils acht Stunden mit 0,1 mM Furosemid oder für 16 Stunden mit einer Chlorid-freien Lösung behandelt. Die Veränderungen der Proteinkonzentrationen von ANXA1 und COX-2 wurde mittels Western Blot-Analyse quantifiziert. Die mRNA-Expressionsänderungen wurden mit Hilfe von Taqman-rtPCR in den Zellen analysiert. Furosemid führte zu einer signifikanten Steigerung der ANXA1-Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (+88%±10%; $p < 0,01$; Abbildung 19) und zu einer Verdopplung der COX-Proteinkonzentration (+107%±12%; $p < 0,01$; Abbildung 20).

Eine Inhibition des Salztransports durch Furosemid führte zu einer erhöhten Proteinkonzentration von ANXA1 und COX-2 in den MMDD1. Eine vermehrte COX-2-Expression durch verminderten Salztransport bei Einsatz eines Chlorid-defizienten Zellmediums wurde im nächsten Experiment gezeigt. In der Kontrolllösung waren 135 mM Chlorid enthalten. Die Behandlung der MMDD1 mit Chlorid-freiem Medium für 16 Stunden verursachte einen signifikanten Anstieg der ANXA1-Expression (+57%±11%; $p < 0,01$; Abbildung 21) und der COX-2-Expression (+49%±11%; $p < 0,01$; Abbildung 22). Dieses Ergebnis bestätigt eine Studie von Yang et al.²⁰

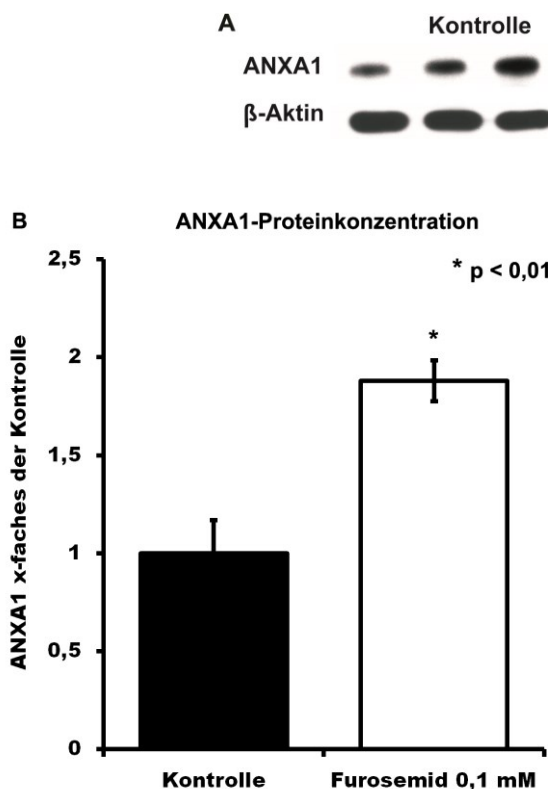


Abbildung 19: ANXA1-Proteinkonzentration in MMDD1 nach Furosemid-Behandlung. Die Behandlung von MMDD1 mit 0,1 mM Furosemid für acht Stunden verursacht eine deutliche Steigerung der ANXA1-Proteinkonzentration in der Western Blot-Analyse (A). β -Aktin dient als Ladekontrolle. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch densitometrische Auswertung und zeigt nahezu eine Verdopplung der ANXA1-Proteinkonzentration durch Furosemid (Western Blot-Analyse: +88%±10%; $p < 0,01$; B).

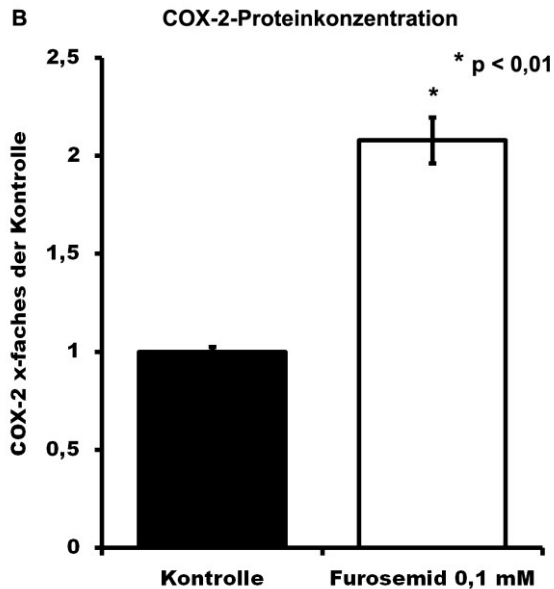
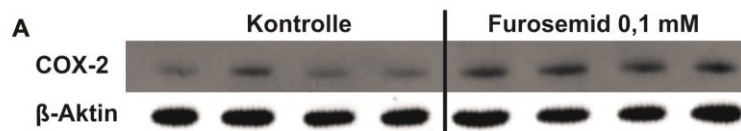


Abbildung 20: COX-2-Protein konzentration in MMDD1 nach Furosemid-Behandlung

Die Behandlung von MMDD1 mit 0,1 mM Furosemid für acht Stunden verursacht eine deutliche Steigerung der COX-2-Proteinkonzentration in der Western Blot-Analyse (**A**). β -Aktin dient als Ladekontrolle. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch densitometrische Auswertung und zeigt eine Verdopplung der COX-2-Proteinkonzentration durch Furosemid (Western Blot-Analyse: $+107\% \pm 12\%$; $p < 0,01$; **B**).

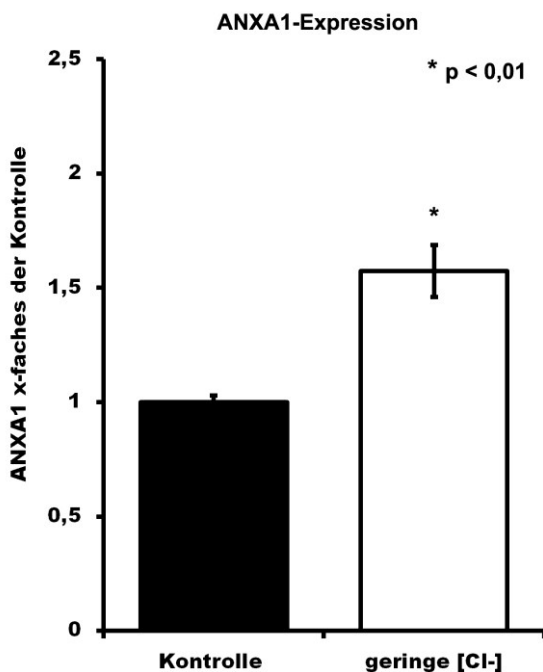


Abbildung 21: ANXA1-Expression in MMDD1

Die Taqman-rtPCR zeigt signifikant erhöhte ANXA1-mRNA-Spiegel in den MMDD1, die für 16 Stunden mit Chlorid-freier Lösung (geringe [Cl-]) behandelt wurden. Das Medium für die Kontrollgruppe enthielt einen Chlorid-Gehalt von 135 mM (Taqman-rtPCR: $+57\% \pm 11\%$; $p < 0,01$; ANXA1-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

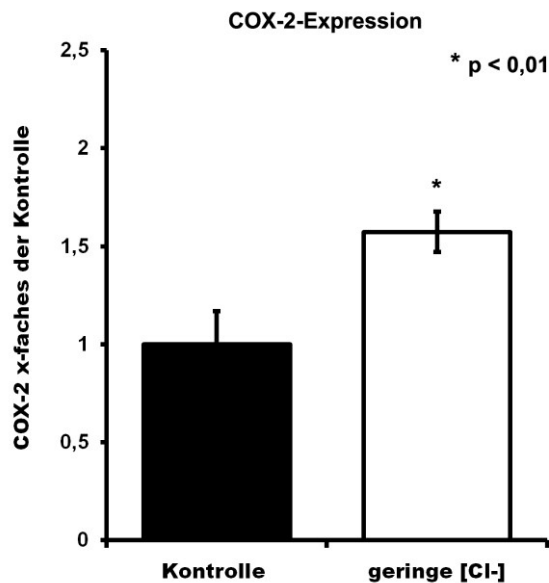


Abbildung 22: COX-2-Expression in MMDD1

Die Taqman-rtPCR zeigt einen signifikant erhöhten COX-2-mRNA-Spiegel in den MMDD1, die für 16 Stunden mit Chlorid-defizienter Lösung (geringe [Cl-]) behandelt wurden. Das Medium für die Kontrollgruppe enthielt einen Chlorid-Gehalt von 135 mM (Taqman-rtPCR: +49%±11%; $p < 0,01$; COX-2-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

4.3 Regulation von COX-2 und Renin durch ANXA1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin der Effekt von ANXA1 auf COX-2 und Renin im JGA untersucht. In Immunzellen konnte gezeigt werden, dass ANXA1 über inhibitorische Effekte auf die Expression von COX-2 eine zentrale Rolle in der Synthese von Eicosanoiden einnimmt.⁴² Als Modell für die weiteren Studien diente die ANXA1^{-/-} Maus, in der die Expression von COX-2 und Renin untersucht wurde. Weiterhin wurde die COX-2-Bildung in kultivierten Macula densa-Zellen nach intrazellulärer ANXA1-Konzentrationssteigerung analysiert.

4.3.1 COX-2 in der ANXA1^{-/-} Maus

Die Nieren der ANXA1^{-/-} Maus aus dem Labor von R. Flower (London, England) weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine normale Morphologie und Funktion auf.⁸⁹ In der COX-2-Expression der gesamten Niere wurden im Gegensatz zur Lunge, Thymus und Knochenmark keine Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt. Die Macula densa wurde jedoch in diesen Studien nicht gezielt betrachtet⁸⁹. Nach Verwendung des ANXA1-Antikörpers in der Immunfluoreszenz auf den Schnitten der ANXA1^{-/-} Maus konnte kein Signal von immunreaktivem ANXA1 nachgewiesen werden. Damit konnte die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen werden. Die Analyse der Macula densa-assoziierten COX-2-Immunoreaktivität zeigte eine signifikant höhere Anzahl COX-2-exprimierender

Macula densa-Zellen in den ANXA1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Kontrolltieren (56±8,4 vs. 27±4,2 Zellen/100 Glomeruli; p < 0,05; Abbildung 23).

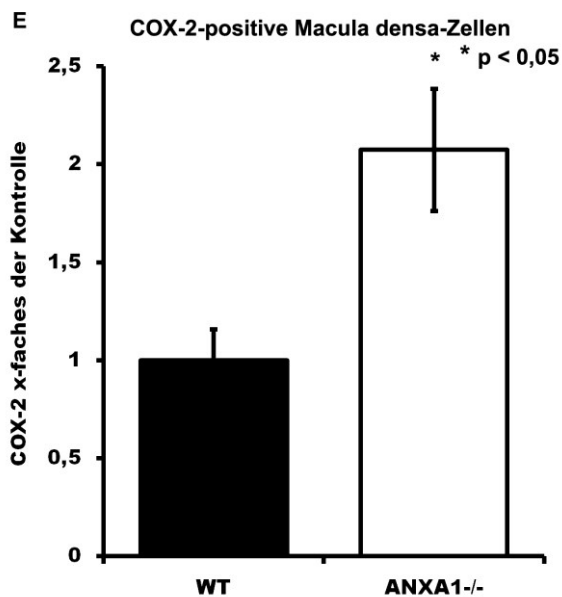
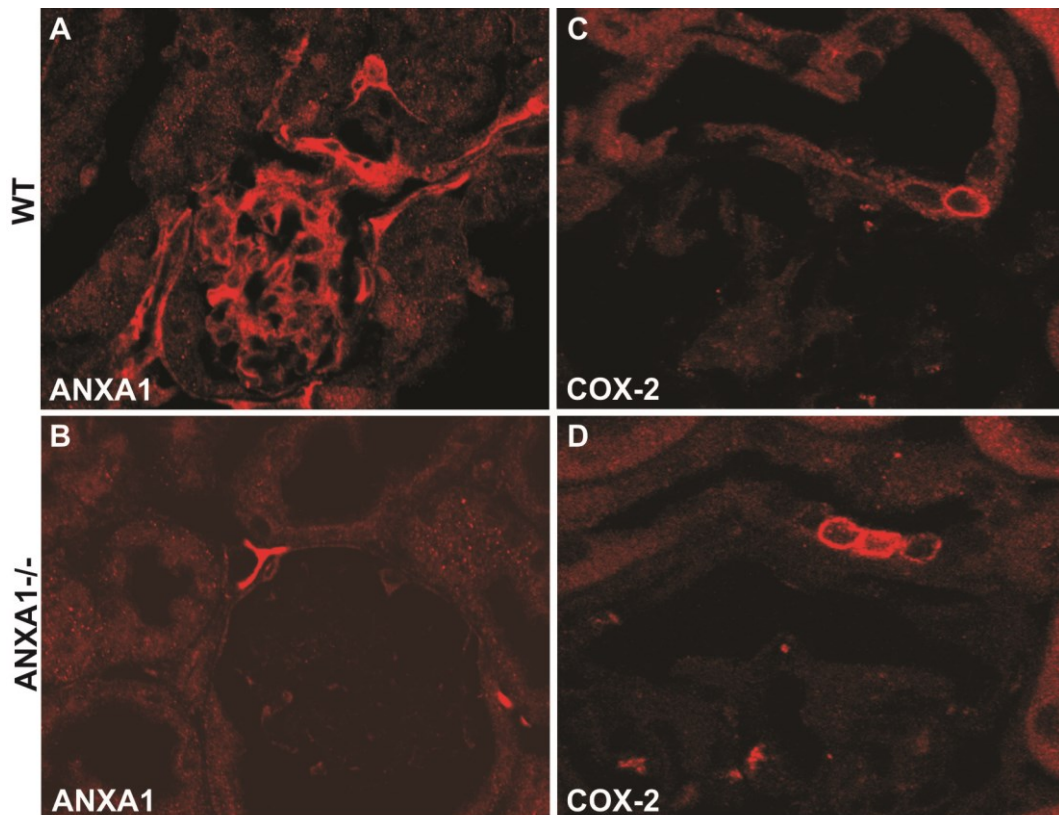


Abbildung 23: ANXA1^{-/-} und COX-2-Immunreaktivität in ANXA1^{-/-} Mäusen
 Repräsentative konfokalmikroskopische Bilder zeigen eine starke ANXA1-Immunfluoreszenz in den Macula densa-Zellen der Kontrolltiere/Wildtyp-Tiere (WT) (A) und ein ausbleibendes ANXA1-Signal in den Macula densa-Zellen der ANXA1^{-/-} Mäuse (B). Die Anzahl der COX-2-immunoreaktiven Macula densa-Zellen ist in den ANXA1^{-/-} Mäusen größer (D) als in den Kontrolltieren (C) (Immunfluoreszenz: Originale Vergrößerung 400 x). Die Quantifizierung der COX-2-exprimierenden Macula densa-Zellen durch Zellzählung bestätigt die gesteigerte Anzahl der immunreaktiven Zellen (E: 27±4 vs. 56±8/100 Glomeruli; p < 0,05; n = 6).

4.3.2 Renin in der ANXA1^{-/-} Maus

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der gesteigerten COX-2-Expression und -Proteinkonzentration in der Macula densa der ANXA1^{-/-} Maus wurde die Expression von Renin im JGA untersucht. In der In-Situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die Expression von Renin-mRNA im JGA in der ANXA1^{-/-} Maus im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht ist (25,4±6,4 vs. 3,8±1,3 JGAs/100 Glomeruli; $p < 0,05$; Abbildung 24).

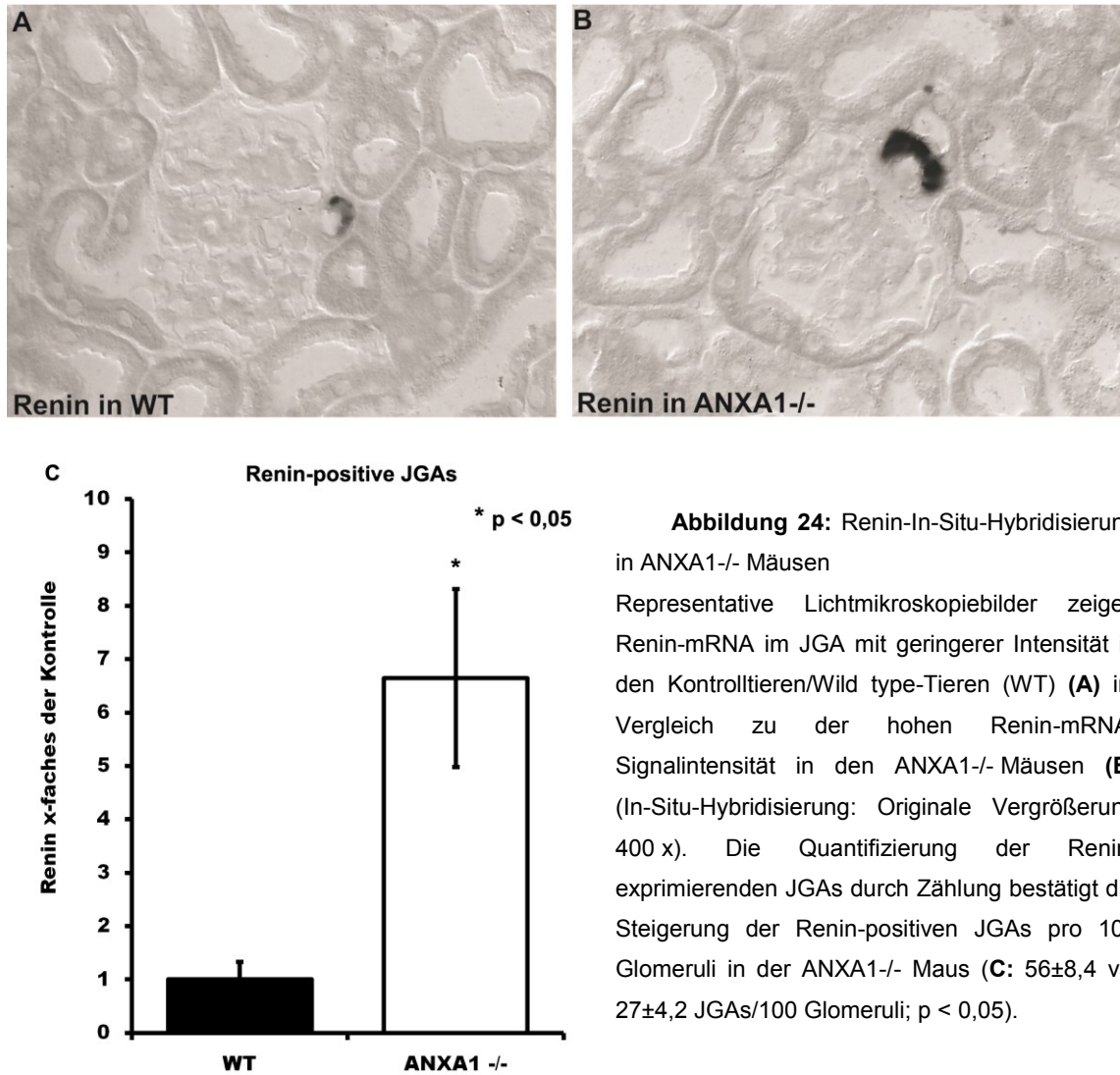


Abbildung 24: Renin-In-Situ-Hybridisierung in ANXA1^{-/-} Mäusen

Representative Lichtmikroskopiebilder zeigen Renin-mRNA im JGA mit geringerer Intensität in den Kontrolltieren/Wild type-Tieren (WT) (A) im Vergleich zu der hohen Renin-mRNA-Signalintensität in den ANXA1^{-/-} Mäusen (B) (In-Situ-Hybridisierung: Originale Vergrößerung 400 x). Die Quantifizierung der Renin-exprimierenden JGAs durch Zählung bestätigt die Steigerung der Renin-positiven JGAs pro 100 Glomeruli in der ANXA1^{-/-} Maus (C: 56±8,4 vs. 27±4,2 JGAs/100 Glomeruli; $p < 0,05$).

4.3.3 Überexpression von ANXA1 in MMDD1

Um die ANXA1-Wirkung in der Macula densa zu untersuchen wurden MMDD1-Zellen mit einem per CMV-Promotor regulierten ANXA1-Transfektionsvektor (ANXA1-Plasmid) transfiziert. Dieser Vektor ist ein Standardvektor, der für Transfektionsexperimente verwendet wird und ein hohes Expressionsniveau

ermöglicht. Die Induktion der ANXA1-mRNA war nach 24 Stunden signifikant erhöht. 1 µg transfiziertes ANXA1 führte zu einer 8,5fachen, 2 µg ANXA1 zu einer 19fachen Erhöhung der ANXA1-mRNA in den MMDD1 (+750%±180% für 1 µg ANXA1 und 1800%±340% für 2 µg ANXA1; $p < 0,05$; Abbildung 25). Der Erfolg der Transfektion wurde ebenfalls durch Analyse der ANXA1-Proteinmenge kontrolliert. Nach 24 Stunden führten 2 µg des ANXA1-Plasmids zu einer Verdopplung der ANXA1-Proteinmenge in den MMDD1 (+114%±3%; $p < 0,01$; Abbildung 26).

Gleichzeitig fand sich eine erhöhte ANXA1-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand der MMDD1. Die Western Blot-Analyse von ANXA1 im Medium zeigt zwei immunreaktive Banden. Bei der 37 kDa-Bande handelt es sich wahrscheinlich um das vollständige ANXA1-Protein, bei der 34 kDa-Bande um das, infolge proteolytischer Abspaltung des N-Terminus, trunkierte ANXA1-Protein (Abbildung 27).⁹⁴

Da sich nach Transfektion von 2 µg ANXA1 der stärkste Effekt zeigte, wurde in den folgenden Experimenten zur Untersuchung der ANXA1-Wirkung auf die COX-2-Expression mit dieser Konzentration gearbeitet. 24 Stunden nach Transfektion von ANXA1 war die COX-2-Expression in den MMDD1 signifikant verringert (-51%±3%; $p < 0,01$; Abbildung 28).

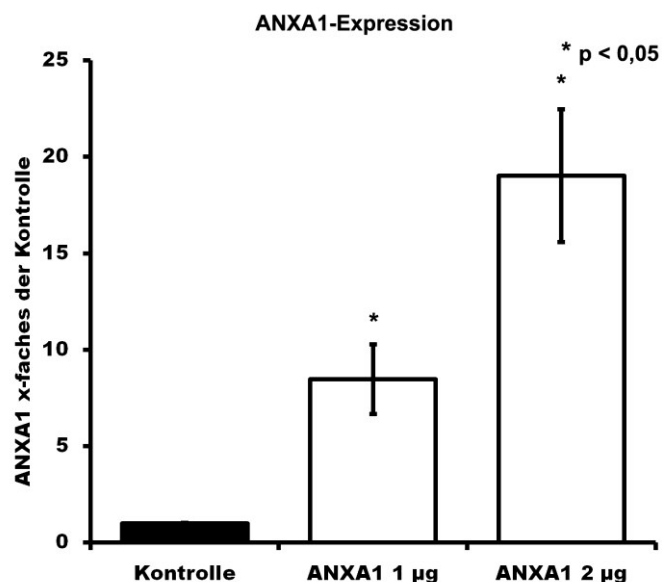


Abbildung 25: ANXA1-Expression in MMDD1 nach Transfektion

Die ANXA1-Expression in der mit ANXA1-Plasmid transfizierten Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigert (Taqman-rtPCR: +750%±180% für 1 µg ANXA1 und 1800%±340% für 2 µg ANXA1; $p < 0,05$; ANXA1-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

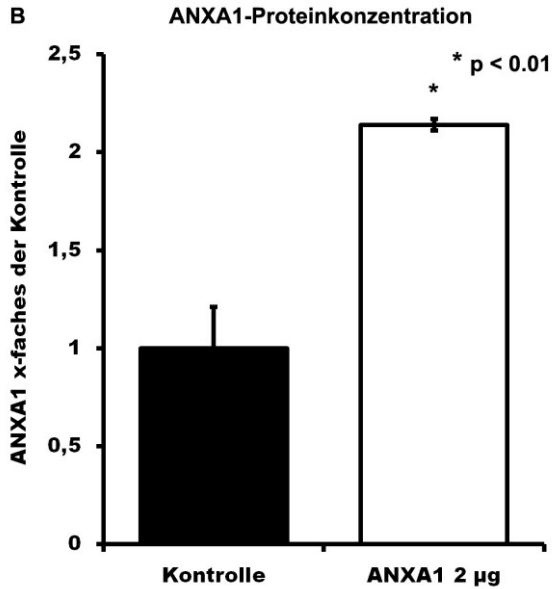
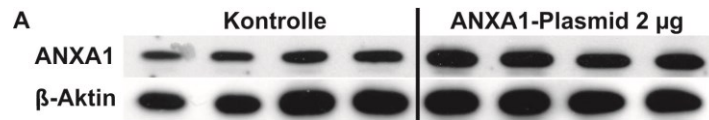


Abbildung 26: ANXA1-Proteinkonzentration in MMDD1 nach Transfektion

Die ANXA1-Proteinkonzentration der mit ANXA1-Plasmid transfizierten Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Western Blot-Analyse erhöht (**A**). β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch densitometrische Auswertung und zeigt einen signifikanten Anstieg der ANXA1-Proteinkonzentration nach der Transfektion (Western Blot-Analyse: +114%±3% für 2 µg ANXA1; p < 0,01; **B**).

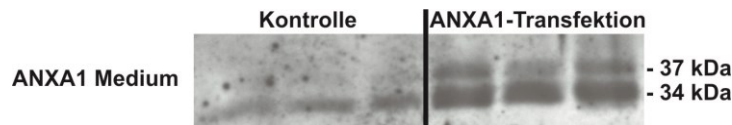


Abbildung 27: ANXA1-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand der MMDD1

Mit ANXA1 transfizierte Zellen zeigen eine vermehrte ANXA1-Proteinkonzentration im Zellüberstand im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das 37 kDa-große Produkt ist das vollständige ANXA1-Protein. Bei dem 34 kDa-ANXA1-Produkt handelt es sich vermutlich um das nach proteolytischer Abspaltung truncierte ANXA1-Protein (Western Blot-Analyse).⁹⁴

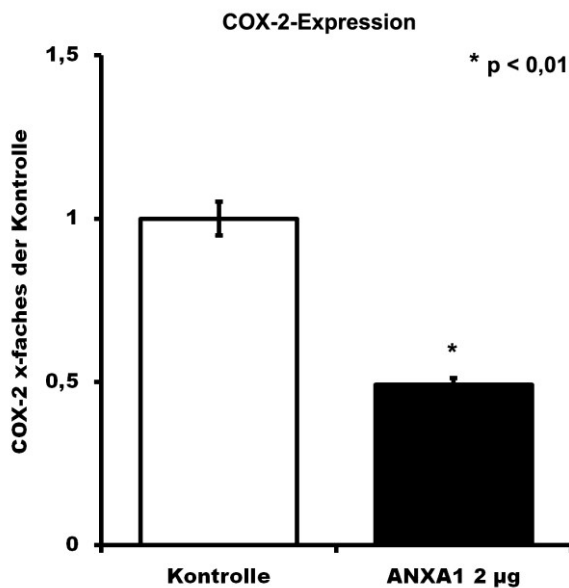


Abbildung 28: COX-2-Expression in MMDD1 nach Transfektion

Die Konzentration der COX-2-mRNA von der Kontrollgruppe im Vergleich zur mit 2 µg ANXA1-Plasmid transfizierten Gruppe ist signifikant vermindert (Taqman rtPCR: -51%±3% für 2 µg ANXA1; p < 0,01; COX-2-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

4.4 Einfluss von DXM auf ANXA1 und COX-2 in der Macula densa

Ein bekannter Stimulus für die Sekretion von ANXA1 ist DXM. So kann in Zellen des Immunsystems und der Adenohypophyse nicht nur die Expression, sondern auch die Sekretion von ANXA1 durch DXM gesteigert werden.^{66,83} Ob DXM auch in der Macula densa zu einer Stimulation der ANXA1-Expression mit gesteigerter Proteinkonzentration und Sekretion von ANXA1 führt, war Fragestellung dieser Teilstudie. Weiterhin sollte die Wirkung von DXM auf die Expression und Proteinkonzentration von COX-2 in der Macula densa untersucht werden. Zu diesem Ziel wurden Zellkulturstudien mit DXM an den MMDD1 durchgeführt. Eine etablierte Konzentration für die Untersuchung der ANXA1-Sekretion für DXM ist 0,1 μM . In Vorversuchen zeigte eine Behandlung der MMDD1 mit DXM für acht Stunden die besten Ergebnisse. Daher wurde 0,1 μM als Konzentration für DXM und acht Stunden als Behandlungsdauer in der hier vorliegenden Arbeit verwendet.

4.4.1 Einfluss von DXM auf MMDD1-ANXA1-Expression und -Sekretion

Eine Behandlung der MMDD1 mit DXM führte zu einem signifikanten Anstieg der ANXA1-mRNA (+56% \pm 9%; $p < 0,01$; Abbildung 29).

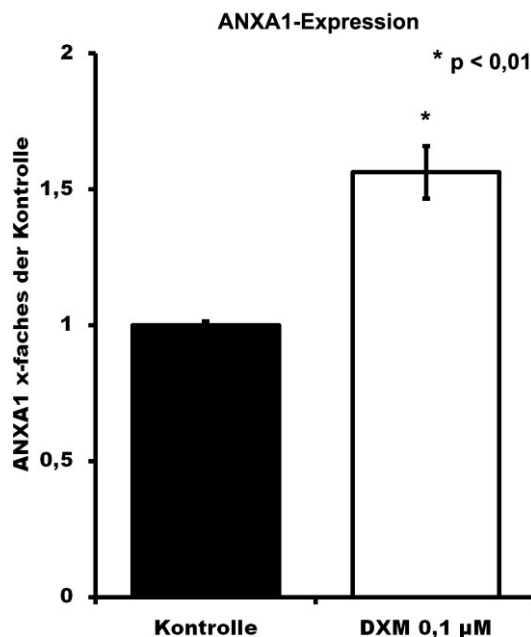
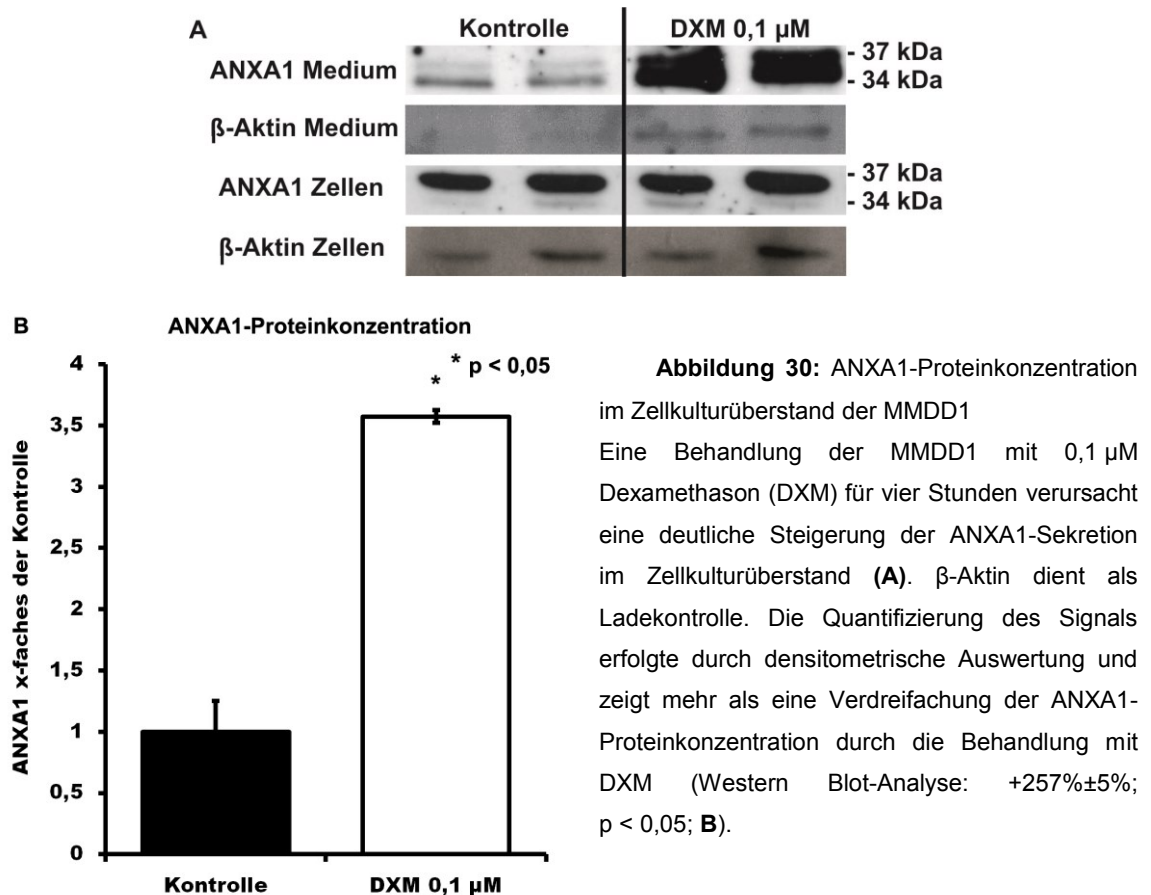


Abbildung 29: ANXA1-Expression in MMDD1

Eine Behandlung der MMDD1 mit 0,1 μM DXM für acht Stunden verursacht einen signifikanten Anstieg der ANXA1-Expression (Taqman-rtPCR: +56% \pm 9%; $p < 0,01$; ANXA1-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

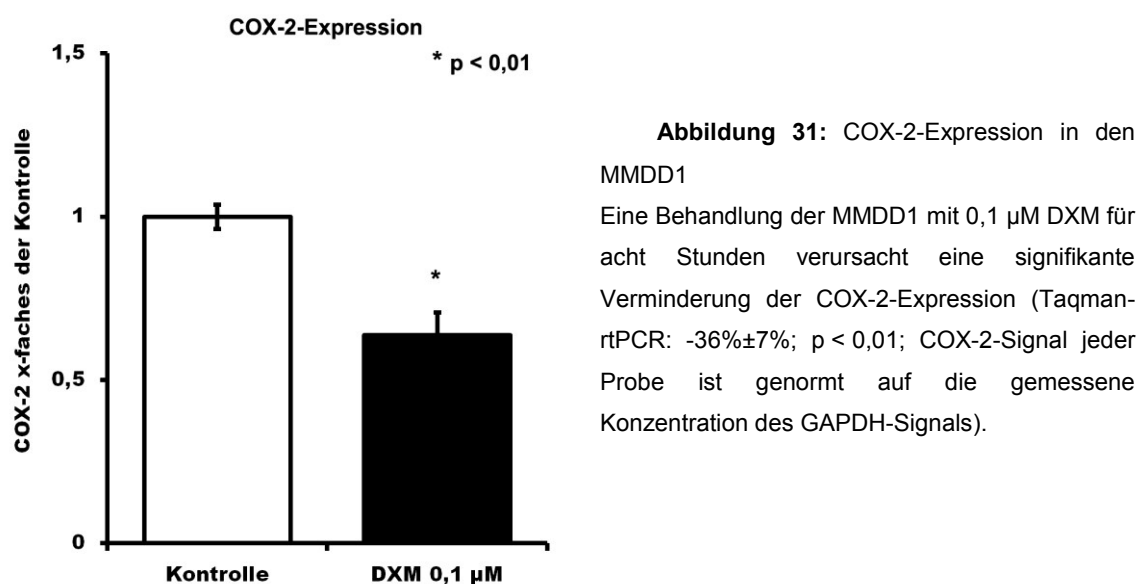
In der Western Blot-Analyse konnte kein Einfluss von DXM auf die intrazelluläre ANXA1-Proteinmenge nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde auch in Immunzellen beobachtet, in denen DXM ebenfalls zu einer Steigerung der ANXA1-Expression, jedoch nicht zu einer Steigerung der intrazellulären ANXA1-Proteinkonzentration führte.⁹⁵ Von den Autoren wurde eine ANXA1-Sekretion als Erklärung für diese Beobachtung gesehen.

Um eine durch DXM initiierte Sekretion von ANXA1 aus den MMDD1 untersuchen zu können, wurden weitere Studien durchgeführt. Für diese Zellkulturexperimente wurde eine kürzere Behandlungsdauer mit DXM von vier Stunden gewählt, um gezielt die Wirkung auf die Sekretion analysieren zu können. Einer bereits eintretenden Steigerung der ANXA1-Proteinsynthese durch DXM sollte damit vorgebeugt werden. Eine Behandlung der MMDD1 mit DXM resultierte in einem starken Anstieg der ANXA1-Sekretion aus den Zellen in das Zellkulturmedium. Die Konzentration der ANXA1-Proteinmenge im Zellmedium nach DXM-Behandlung war im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als verdreifacht ($+257\% \pm 5\%$; $p < 0,05$). Die Western Blot-Analyse von ANXA1 im Zellkulturmedium zeigte das vollständige ANXA1-Protein in der 37 kDa-Bande und das, infolge proteolytischer Abspaltung des N-Terminus, trunkierte 34 kDa-große ANXA1-Protein. Im Ruhezustand war das 34 kDa-ANXA1-Produkt in relativ hoher Konzentration extrazellulär vorhanden. In den Zellen zeigte sich vor allem das 37 kDa-große vollständige ANXA1-Protein. Nach Stimulation mit DXM war die Konzentration beider ANXA1-Varianten außerhalb der MMDD1-Zellen signifikant gesteigert. Gleichzeitig zeigte sich auch eine Vermehrung von β -Aktin, einem obligat intrazellulären Bestandteil, im Zellkulturüberstand (Abbildung 30). Neben ANXA1 müssen daher auch vermehrt Zellbestandteile nach extrazellulär transportiert worden sein. Bei einer lichtmikroskopischen Untersuchungen der MMDD1 nach gleicher Behandlungsdauer mit gleicher DXM-Konzentration zeigten sich keine Veränderungen der Zelldichte oder -morphologie. Es ließen sich weiterhin keine Zeichen für Apoptose finden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass DXM die ANXA1-Expression und -Sekretion in MMDD1 fördert, wobei die intrazelluläre ANXA1-Konzentration konstant bleibt.



4.4.2 Einfluss von DXM auf die MMDD1-COX-2 Expression

In den MMDD1 führte 0,1 µM DXM innerhalb von acht Stunden zu einer signifikant verringerten Expression von COX-2 (-36%±7%; $p < 0,05$; Abbildung 31).



4.5 Sekretion und intrazelluläre Regulation von ANXA1

Ob eine ANXA1-Sekretion aus der Macula densa in einem regulierten oder einem unregulierten Prozess erfolgt, war Frage der darauffolgenden Experimente. Aus anderen Zellsystemen sind verschiedene Sekretionsmechanismen für ANXA1 bekannt. So ist eine Sekretion über den ABCA1⁷⁰ oder eine Externalisierung über Mikropartikel aus der Zellmembran⁷¹ denkbar. Die Möglichkeit der ANXA1-Sekretion über ABCA1 aus der Macula densa wurde in dieser Teilstudie untersucht. Hiefür wurden MMDD1 gleichzeitig mit DXM und den ABCA1-Inhibitoren Glibenclamid oder Probenecid behandelt.

Beide Inhibitoren zeigten keinen Einfluss auf die Sekretion von ANXA1 aus den MMDD1 (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment wurde die COX-2-Expression bei simultaner Gabe von DXM und Glibenclamid untersucht. DXM führte zu einer signifikanten Reduktion der COX-2-mRNA-Bildung, die durch gleichzeitige Applikation von Glibenclamid aufgehoben war. Interessanterweise führte die alleinige Therapie der MMDD1 mit Glibenclamid zu einer Steigerung der COX-2-Expression (Abbildung 32).

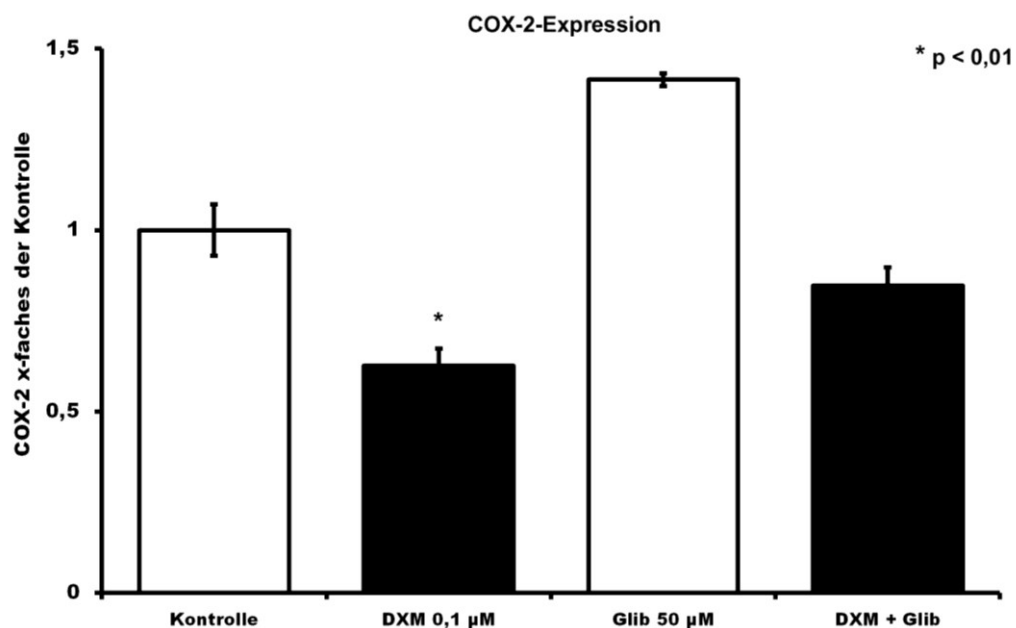


Abbildung 32: COX-2-Expression in MMDD1

Eine Behandlung der MMDD1 mit 1 µM DXM für acht Stunden verursacht eine signifikante Verminderung der COX-2-mRNA (Taqman-rtPCR: $-37\% \pm 5\%$; $p < 0,05$; COX-2-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals). Die Behandlung mit 50 µM Glibenclamid resultiert in einem nicht signifikanten Anstieg der COX-2-mRNA-Expression ($p = 0,54$). Die Behandlung der MMDD1 mit DXM und Glibenclamid führt zu keiner signifikanten Veränderung der COX-2-mRNA-Expression.

4.6 Wirkung des ANXA1-Rezeptors

ANXA1 kann seine Wirkung über Bindung an einen Vertreter der Fpr-Familie entfalten.⁷⁶ Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren Fpr1-3 auch in der Macula densa vorkommen (Abschnitt 4.1.3). Die Wirkung dieser drei Rezeptoren auf die COX-2-Expression und -Proteinkonzentration in der Macula densa wurde in dieser Teilstudie untersucht. Zu diesem Ziel wurde das bakterielle Peptid fMLF als nicht-selektiver Aktivator aller Fpr-Rezeptorsubtypen mit 1 μ M, einer in der Literatur etablierten Konzentration, eingesetzt.⁹⁶ Die Behandlung der MMDD1 fMLF führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl der COX-2-mRNA (-34% \pm 6%; Abbildung 33) als auch der COX-2-Proteinkonzentration (-60% \pm 13%; $p < 0,05$; Abbildung 34).

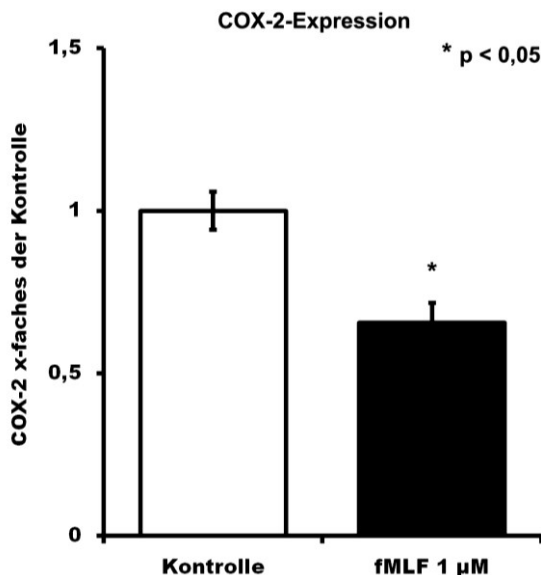


Abbildung 33: COX-2-Expression in MMDD1
Eine Behandlung der MMDD1 mit 1 μ M fMLF für acht Stunden verursacht eine signifikante Verminderung der COX-2-mRNA-Expression (Taqman-rtPCR: -34% \pm 6%; $p < 0,05$; COX-2-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals).

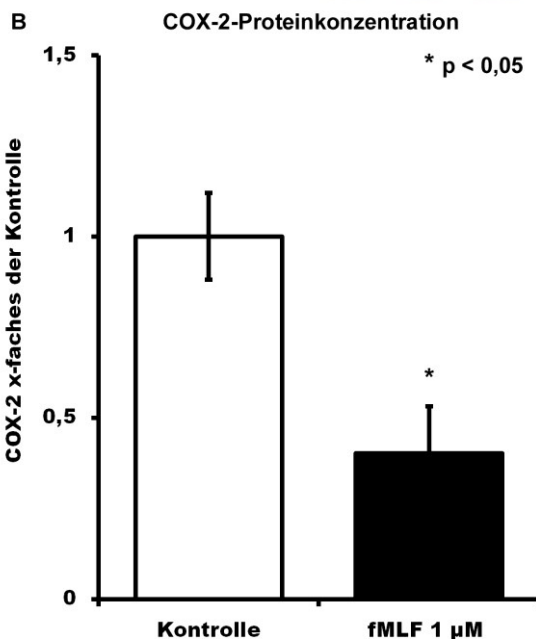


Abbildung 34: COX-2-Proteinkonzentration in MMDD1

Die COX-2-Proteinkonzentration in den für acht Stunden mit 1 μ M fMLF behandelten MMDD1 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Western Blot-Analyse stark vermindert (A). β -Aktin dient als Ladekontrolle. Die Quantifizierung des Signals erfolgte durch densitometrische Auswertung und zeigt eine signifikante Verminderung der COX-2-Proteinkonzentration durch fMLF (Western Blot-Analyse: -60% \pm 13%; B).

Aus den eben beschriebenen Studien kann gefolgert werden, dass eine Stimulation von Fpr zu einer Inhibition von COX-2 führt. Da fMLF ein unspezifischer Agonist der Fpr-Rezeptorfamilie ist, kann keine Aussage über den spezifischen Rezeptor getroffen werden. In den folgenden Teilschritten haben wir daher überprüft, ob der Fpr1-spezifische Antagonist CyH⁹¹ oder der Fpr2- bzw. Fpr3-spezifische Antagonist WRW4⁷⁷ die DXM-Wirkung aufheben kann. Wie bereits vorher gezeigt, führte DXM zu einer Reduktion der COX-2-Expression (-49%±4%; $p < 0,05$). Die gleichzeitige Therapie der MMDD1 mit 0,1 µM CyH konnte die DXM-Wirkung aufheben. Eine alleinige Behandlung mit CyH resultierte nicht in einer Änderung der COX-2-mRNA-Expression.

Die signifikante Inhibition der COX-2-Expression erfolgte auch durch 50 µM des ANXA1-Peptids AC2-26 (-52%±7%; $p < 0,05$; Abbildung 35). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass über Stimulation des Fpr1-Rezeptors in der Macula densa eine Inhibition der COX-2-Expression erreicht wird.

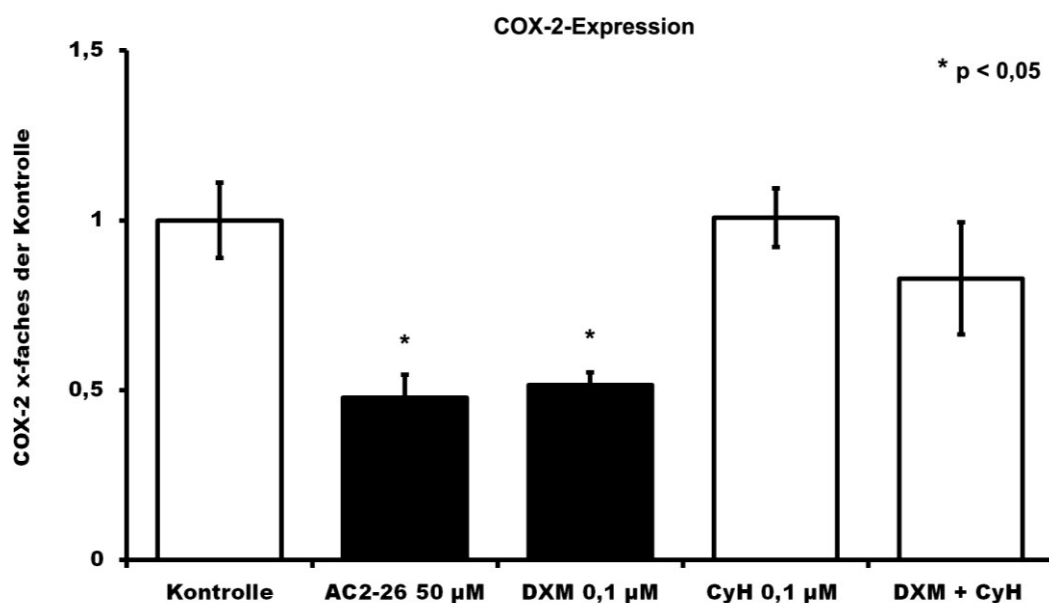


Abbildung 35: COX-2-Expression in MMDD1

Eine Behandlung der MMDD1 mit 0,1 µM Dexamethason (DXM) für 8 Stunden führt zu einer signifikanten Verminderung der COX-2-mRNA (Taqman-rtPCR: -50%±4%; $p < 0,05$; COX-2-Signal jeder Probe ist genormt auf die gemessene Konzentration des GAPDH-Signals). Auch durch 50 µM des ANXA1-Peptids AC2-26 wird die Expression von COX-2 signifikant vermindert (-52%±7% nach 8 h; $p < 0,05$). Die gleichzeitige Behandlung mit 0,1 µM Cyclosporin H (CyH) hebt die DXM-Wirkung auf und führt in alleiniger Therapie nicht zu einer Änderung der COX-2-Expression.

4.7 Intrazelluläre Regulation von ANXA1

Die Affinität von ANXA1 zu Phospholipiden und Proteinen ist bei Anwesenheit von Calcium signifikant gesteigert⁷¹ und beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von ANXA1. In früheren Live-Cell-Imaging-Studien am isolierten JGA zeigte sich eine zyklische Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen im Epithel der Macula densa und des TAL.⁹⁷ Die Frequenz dieser Oszillationen schwankte dabei in Abhängigkeit der Salzkonzentration des Perfusats. Bei einer hohen Salzkonzentration steigt, bei einer niedrigen Salzkonzentration sinkt die Oszillationsfrequenz.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration in MMDD1 durch Zugabe des Calcium-Ionophors Ionomycin initiiert. Um die zeitliche Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen zu analysieren, wurden die MMDD1 kurz vor der Applikation von Ionomycin mit dem Calcium-Indikator Fluo8 geladen, dessen Fluoreszenzintensität Calcium-abhängig ist. Ionomycin verursachte einen schnellen Anstieg der Fluo8-Fluoreszenz und erreichte sein Maximum nach 15 min, ein stabiles Plateau folgte (Abbildung 36).

Das Ziel dieser Teilstudie war, die intrazelluläre Lokalisation von ANXA1 in der Macula densa zu untersuchen. Für die Korrelation der Lokalisationsänderungen von ANXA1 mit der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden MMDD1-Zellen mit einem YFP-markierten ANXA1-Vektor transfiziert. Die Transfektion führte zu einer effektiven Synthese von fluoreszierenden YFP-ANXA1-Produkten, welche in lebenden Zellen im konfokalen Mikroskop beobachtet werden konnten. Unter Ruhebedingungen lagen die YFP-ANXA1-Komplexe für mehr als eine Stunde unverändert gleichmäßig im Zytosol und im Zellkern vor. Durch Zugabe des Calcium-Ionophors Ionomycin wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht. Dadurch kam es zu einer schnellen Umverteilung des fluoreszierenden Proteins vom Zytosol zur Zellmembran. Die Membran-assoziierte Färbung erreichte ein Maximum nach 12 min und war zu späteren Zeitpunkten niedriger. Nach 12 min verringerte sich die Zellmembran-nahe Lokalisation, das fluoreszierende Protein zeigte sich vermehrt in der perinukleären Membran, dem Ort der höchsten intrazellulären COX-2-Konzentration. Das Maximum der perinukleären Fluoreszenzintensität wurde nach 18 min erreicht und blieb danach stabil (Abbildung 37).

Der zeitliche Ablauf der ANXA1-Lokalisationsänderung korrespondiert demnach mit den beobachteten intrazellulären Calcium-Konzentrationsänderungen. Diese Messungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung durch T. Kahl (Berlin).

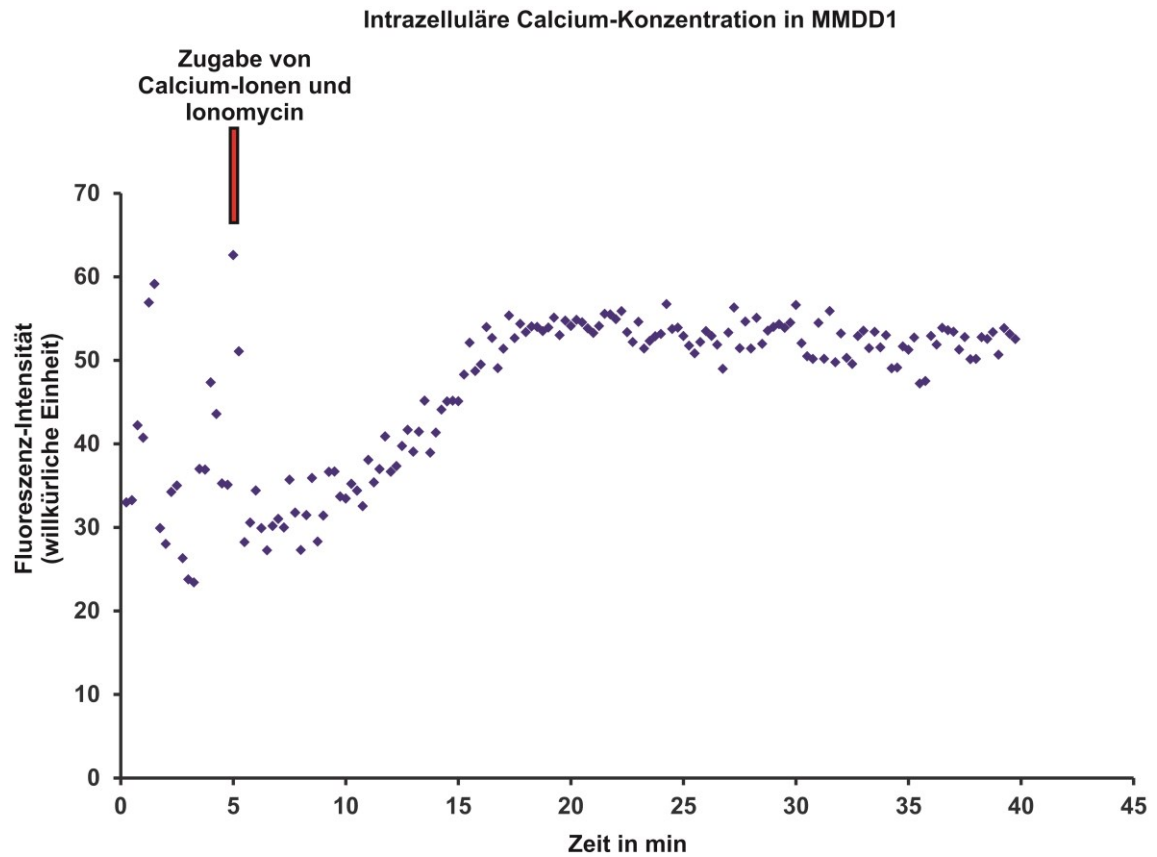


Abbildung 36: Intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Zugabe von Calcium-Ionen und Ionomycin. Fluo8-basierte Fluoreszenzanalyse der intrazellulären Calcium-Spiegel zeigt einen raschen Anstieg infolge der Ionomycin-Applikation, der sein Maximum nach 15 min erreicht.

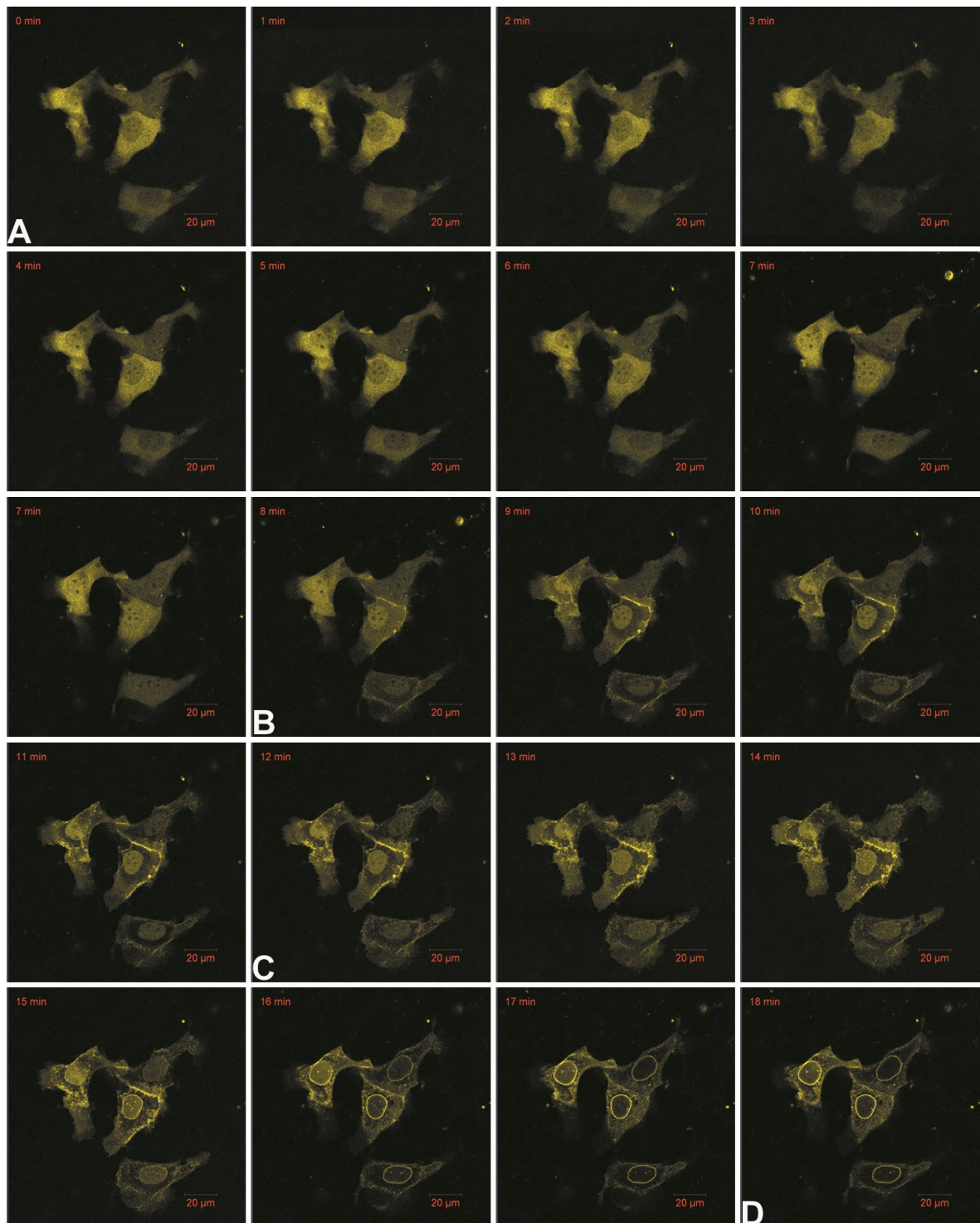


Abbildung 37: Effekt von intrazellulär gesteigerter Calcium-Konzentration auf ANXA1

Konfokales Live-Cell-Imaging von MMDD1-Zellen, die mit einem ANXA1-YFP-Vektor transfiziert wurden zeigen eine zytosolische und eine weniger stark betonte nukleäre Verteilung von ANXA1 unter Kontrollbedingungen **(A)**. **B-D**: Eine Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration infolge des Zusatzes von Calciumchlorid und dem Calcium-Ionophor Ionomycin zum Zellmedium führt zu einer schnellen Umverteilung des fluoreszierenden ANXA1 vom Zytosol zu der Zellmembran. Das Maximum der Umverteilung zur Zellmembran ist nach 12 min **(C)** erreicht und ist im Anschluss vermindert. Nach 12 min beginnt sich das fluoreszierende ANXA1 in der perinukleären Membran anzureichern. Die Intensität der perinukleären Fluoreszenz erlangt nach 18 min das Maximum **(D)** und bleibt infolge stabil.

5 Diskussion

Die Niere ist ein zentrales Organ der Blutdruck- und Volumenhomöostase. Die zentrale Regelstruktur der Niere für diese Funktion ist der JGA, in dem in Abhängigkeit verschiedener vasoaktiver Enzymsysteme eine langfristige Modulation des TGF erfolgt. Zu den wichtigsten vasoaktiven Substanzen gehört PGE₂.^{13–15,98} Die Synthese von PGE₂ in der Macula densa bedarf einer koordinierten Aktion der Calcium-abhängig regulierten PLA2G₄, COX-2 und Prostaglandin E₂-Synthase-1, wobei PLA2G₄ und COX-2 die geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritte katalysieren.^{19,99,100} Die Mechanismen der Regulation von COX-2 in der Macula densa sind nicht vollständig bekannt.

Die Prostaglandin-Synthese in Immunzellen wird durch das endogene antiinflammatorische Protein ANXA1 inhibiert.¹⁰¹ ANXA1 ist bekannt für seine vielfältigen und zum Teil Zell-spezifischen Funktionen. Es ist unter anderem an der Kontrolle des Zellwachstums,⁴⁵ der Zelldifferenzierung,⁴⁶ der Signaltransduktion, des Trafficking von Vesikeln,⁴⁷ der Steuerung der Phagozytose von apoptotischen Zellen und an der Sekretion von Hormonen¹⁰² beteiligt. Weiterhin vermittelt es die anti-inflammatorischen Effekte von Glukokortikoiden durch Regulation der Eicosanoidsynthese und andere Mechanismen.¹⁰³

In früheren Arbeiten von McKanna et al. konnte ANXA1 in der Macula densa von Ratten gezeigt werden.³⁶ Die Funktion von ANXA1 im JGA ist bisher nicht bekannt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher, die Regulation von ANXA1 in der Macula densa und seinen Effekt sowohl auf die Expression von COX-2 als auch auf die Signaltransduktion im JGA zu untersuchen.

5.1 Lokalisation von ANXA1, COX-2 und PLA2G₄ in der Niere

Grundlage für Studien zur funktionellen Charakterisierung von ANXA1 in der Niere ist eine detaillierte Kenntnis der ANXA1-exprimierenden Strukturen und des intrazellulären Verteilungsmusters. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Lokalisation von ANXA1 in der Niere auf Protein- und mRNA-Ebene zu untersuchen. Hierbei wurde ANXA1-Protein mittels Immunhistochemie und ANXA1-mRNA über In-Situ-Hybridisierung dargestellt. Mit diesen Methoden konnte eine weitverbreitete Expression von ANXA1 in der Niere gezeigt werden. Zu den renalen Strukturen mit einer intensiven Färbung für ANXA1 gehören das

parietale Epithel der Bowman-Kapsel, die Podozyten und die Macula densa. Eine im Vergleich zur Macula densa schwächere Färbung fand sich in den Zellen des TAL und des Sammelrohrs. Der Übergang zwischen den schwach gefärbten Zellen des TAL und den kräftig gefärbten Zellen der Macula densa war dabei scharf abgegrenzt. Als Beleg für die Lokalisation von ANXA1 in der Macula densa erfolgte eine Doppelmarkierung mit dem Macula densa-Marker NOS1. Die In-Situ-Hybridisierung zeigte ein vergleichbares Verteilungsmuster mit einer verstärkten ANXA1-mRNA-Akkumulation in der Macula densa und den Podozyten. Mit diesen Ergebnissen konnten die früheren Lokalisationsstudien von McKanna et al. für ANXA1 in der Rattenniere bestätigt und erweitert werden.³⁶ Bereits in dieser Arbeit wurde eine funktionelle Relevanz von ANXA1 für die Funktion der Macula densa postuliert. Der Mechanismus der ANXA1-Wirkung im JGA wurde jedoch bisher nicht untersucht.

Macula densa-Zellen synthetisieren alle für die PGE₂-Bildung notwendigen Enzyme. Die Schrittmacherenzyme PLA₂G₄ und COX₂ werden in Abhängigkeit von der Salzkonzentration in der Tubulusflüssigkeit reguliert.^{35,103,104} In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass ANXA1 in der Macula densa von Ratten mit PLA₂G₄ und COX-2 koexprimiert ist. Der Befund der Koexpression konnte auch in den kultivierten Macula densa-Zellen nachgewiesen werden. Mit diesem Proteinexpressionsmuster gleichen die Macula densa-Zellen Makrophagen, in denen ebenfalls eine Koexpression von ANXA1 und allen Enzymen, die zur PGE₂-Synthese benötigt werden, nachgewiesen werden konnte.⁴² Das hohe Maß an Koexpression lässt auf eine funktionelle Verknüpfung schließen, die in den folgenden Teilstudien untersucht wurde. Hierfür wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von ANXA1, COX-2 und PLA₂G₄ sowohl auf Nierengewebsschnitten als auch in der Zellkultur an MMDD1-Zellen untersucht. Dort zeigten sich ANXA1 und PLA₂G₄ im Ruhezustand homogen verteilt im Zytosol und in geringerer Konzentration im Zellkern. COX-2 wies vor allem ein perinukleäres Verteilungsmuster auf. Eine direkte Interaktion zwischen ANXA1 und COX-2 im Ruhezustand ist daher unwahrscheinlich.

In menschlichen embryonalen Nierenzellen wurde gezeigt, dass ANXA1 in Abhängigkeit von der intrazellulären Calcium-Konzentration seine Eigenschaften und Lokalisation ändert.⁷¹ In Live-Cell-Imaging-Studien am isolierten JGA wurde beobachtet, dass intrazelluläres ionisiertes Calcium in Abhängigkeit von der

luminalen NaCl-Konzentration Schwankungen unterliegt.⁹⁷ Da ANXA1 ein Calcium-abhängig reguliertes Protein ist wurde in der folgenden Teilstudie die Hypothese untersucht, dass ionisiertes Calcium auch in der Macula densa die Lokalisation von ANXA1 beeinflusst. In Live-Cell-Imaging-Studien konnte hier gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in MMDD1 zu einer raschen Bindung von ANXA1 an die Zellmembran und, zu einem späteren Zeitpunkt, auch die perinukleäre Membran führt. Aus Endothelzellen ist bekannt, dass ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Translokation von PLA2G4 zu intrazellulären Membranen kommt, an der eine Protein-Protein-Interaktion zwischen ANXA1 und PLA2G4 erfolgt.^{33,105,106}

5.2 Regulation von ANXA1 und COX-2 in der Macula densa

Eine charakteristische Eigenschaft der Macula densa ist die Modulation der Expression von COX-2 und NOS1 in Abhängigkeit von der tubulären Salzkonzentration. Die Regulation von ANXA1-Expression in der Macula densa ist hingegen nicht bekannt. In der folgenden Teilstudie sollte daher überprüft werden, ob ANXA1 in der Macula densa ebenfalls in Abhängigkeit vom Salztransport exprimiert wird und ob dabei Einfluss auf das Ausmaß der Koexpression mit COX-2 genommen wird. Hierfür wurde das Modell der chronischen Furosemid-Behandlung verwendet. Furosemid führt über eine Inhibition des NKCC2 zu einer Verminderung der intrazellulären NaCl-Konzentration. Dies führt zu einer Stimulation der Expression von COX-2 in der Macula densa und zu einer Steigerung der Synthese und Freisetzung von Renin aus den granulären Zellen der afferenten Arteriole.^{107,108}

In Anbetracht der Tatsache, dass ANXA1 in vielen verschiedenen Zellen der Niere exprimiert wird, haben wir darauf verzichtet die globale renale Expression von ANXA1 zu messen. Die Quantifizierung erfolgte stattdessen mit einem etablierten Zählverfahren.^{11,90} Hierfür wurden die Gewebsschnitte aller Versuchstiere im gleichen Experiment in einem standardisierten Verfahren bearbeitet. Die Anzahl der ANXA1-positiven Macula densa-Zellen von mindestens 100 Glomeruli pro Tier wurden ausgezählt und ins Verhältnis zur Zahl der Glomeruli gesetzt. Die Macula densa-Zellen wurden dabei durch ihre charakteristischen morphologischen Eigenschaften und Position im JGA von den umliegenden TAL-Zellen abgegrenzt. Diese Art der Signalquantifizierung ist sehr sensitiv für die Ermittlung der Anzahl

immunreaktiver Zellen und bietet die Möglichkeit auf zellulärer Ebene das Ausmaß der Kolo-kalisation von ANXA1 und COX-2 beurteilen zu können.

Die Behandlung von Ratten mit Furosemid in unseren Studien führte zu einer Verdopplung der Macula densa-Zellen mit kräftiger ANXA1-Expression in den behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren und zeigte damit eine ähnliche quantitative Zunahme wie die COX-2-positiven Macula densa-Zellen. Das Ausmaß der Kolo-kalisation beider Enzyme und die intrazelluläre Verteilung blieben dabei konstant. Diese Daten weisen auf eine parallele Regulation von ANXA1 und COX-2 hin und sind vereinbar mit einer funktionellen Beziehung zwischen beiden Produkten. Anhand dieser im Tiermodell erhobenen Daten kann nicht festgestellt werden, ob es sich bei der Expressionssteigerung von ANXA1 und COX-2 um einen lokalen oder um einen systemischen Effekt des Furosemids handelt. So ist für Furosemid bekannt, dass es die Renin-Sekretion und dadurch ebenfalls die Freisetzung des Mineralkortikoids Aldosteron stimuliert.¹⁰⁹ Weiterhin fördert Furosemid die Aktivierung von Mineralkortikoiden-Rezeptoren.¹¹⁰

Zur Differenzierung der lokalen und systemischen Wirkung von Furosemid wurden die Versuche des Tiermodells daher in Zellkulturstudien rekapituliert. Eine parallele Stimulation von COX-2 und ANXA1 in Abhängigkeit vom Salztransport konnte hierbei auch in der Zellkultur nachgewiesen werden. Sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Western Blot-Analyse wurde eine gesteigerte Proteinmenge für COX-2 und ANXA1 nach Furosemid-Behandlung in den Macula densa-Zellen beobachtet. In einem weiteren experimentellen Ansatz mit Veränderung des Salztransports wurden die Zellen anstelle des Kulturmediums einer isoosmolaren Chlorid-freien Lösung ausgesetzt. Auch durch diese Behandlung wurde die Expression von ANXA1 und COX-2 signifikant gesteigert. Diese Studien bestätigen frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe von J. Schnermann (Bethesda, MD, USA).²⁴ Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente und der tierexperimentellen Studien zeigen damit, dass ANXA1 und COX-2 in der Macula densa kolo-kalisiert sind und ANXA1, in gleicher Weise wie COX-2, salzabhängig reguliert wird.

Die Regulation der Expression von ANXA1 ist zellspezifisch. Es konnten drei verschiedene Signalkaskaden identifiziert werden, so kann die Bildung von ANXA1-mRNA über die p38-MAP-Kinase, die CREB-Bindungsstelle der DNA und den Glukokortikoid-Rezeptor reguliert werden.^{40,66} Die Gene von ANXA1 und

COX-2, die beide in großer Nähe zueinander auf dem Chromosom 1 liegen, ähneln sich in den regulatorischen Eigenschaften der Promotorregionen, wodurch eine gleichgerichteten Regulation auf dem Level der Expression denkbar ist.^{111,112} Interessanterweise wurde in Kolonkarzinomzellen die p38-MAP-Kinase als Aktivator für die ANXA1-Expression identifiziert.¹¹³ In der Macula densa konnte gezeigt werden, dass die p38-MAP-Kinase die Expression von COX-2 fördert.^{20,114} Die Aktivität der p38-MAP-Kinase kann dabei durch die tubuläre Salzregulation in der Niere reguliert werden. So ist die Konzentration der p38-MAP-Kinase in der Macula densa von Ratten, die eine salzarme Diät erhielten¹¹⁴ und in MMDD1-Zellen, die einem Chlorid-freien Medium ausgesetzt waren,²⁰ erhöht. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass das in dieser Studie verwendete Furosemid durch die Verminderung der intrazellulären NaCl-Konzentration ebenfalls eine Induktion der p38-MAP-Kinase initiieren und damit eine parallele Regulation von ANXA1 und COX-2 verursachen könnte.

Weiterhin zeigt sich in zahlreichen Zellsystemen, dass auch PLA2G4 und COX-2 parallel reguliert sind. Ein Mediator dafür ist ebenfalls die p38-MAP-Kinase, die in Makrophagen eine Aktivitätssteigerung der PLA2G4 bewirkt.¹¹⁵

Auch DXM steigert wie Furosemid die Expression von ANXA1 durch eine Aktivierung der p38-MAP-Kinase. So konnte in lymphoblastischen Stammzellen,⁴⁰ in Chorionkarzinomzellen³⁹ und in menschlichen Kolonkarzinomzellen¹¹³ nach DXM-Behandlung eine Stimulation der ANXA1-mRNA-Bildung nachgewiesen werden.

In den lymphoblastischen Stammzellen wurde weiterhin eine Steigerung der ANXA1-Expression durch DXM über die Aktivierung von cAMP beobachtet, wobei cAMP die ANXA1-Expression über die CREB-Bindungsstelle der DNA stimuliert.⁴⁰ Auch für COX-2 wurde diese Art der Expressionssteigerung in Zellen der inneren renalen Medulla beschrieben.¹¹⁶

Neben der Aktivierung der ANXA1-Expression via p38-MAP-Kinase und cAMP ist eine Stimulation der ANXA1-mRNA-Bildung durch den Glukokortikoid-Rezeptor bekannt. Die ANXA1-Expression wird auf diesem Wege sowohl in Astrozytomzellen¹¹⁷ als auch in Follikulostellarzellen¹¹⁸ gesteigert. In der Macula densa konnte beobachtet werden, dass die Expression von COX-2 durch Kortikoide negativ reguliert wird. Hierbei sind Mineralkortikoide jedoch von größerer Bedeutung als Glukokortikoide, die erst in hoher Konzentration ebenfalls

durch Stimulation des Mineralkortikoid-Rezeptors zu einer Verminderung der COX-2-mRNA-Bildung führen.²⁹ Eine Inhibition der mineralokortikoiden Wirkung durch Gabe von Spironolacton konnte ebenfalls eine gesteigerte COX-2-Expression in der Macula densa initiieren.²⁹ Kortikoide scheinen daher eine tonische Inhibition der COX-2-Expression in der Macula densa zu bewirken. In der hier vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass DXM die Expression von ANXA1 in der Macula densa stimuliert, wohingegen die COX-2-Expression vermindert wird. Welche Rolle ANXA1 in der DXM-medierten Inhibition der COX-2-Expression in der Macula densa spielt, war nicht bekannt und sollte in den folgenden Teilstudien untersucht werden.

5.3 Regulation von COX-2 durch ANXA1

Das Ziel dieser Teilstudie war die Regulation von COX-2 durch ANXA1 in der Macula densa zu analysieren. Als In-vivo-Modell für diese Teilstudie wurden ANXA1-/- Mäusen auf ihre Expression von COX-2 untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der COX-2-Expression in der Macula densa in der ANXA1-/- Maus. In Studien anderer Arbeitsgruppen an der ANXA1-/- Maus zeigte sich weiterhin eine Steigerung der COX-2-Bildung in der Lunge, im Thymus und im Rückenmark, speziell in der gesamten Niere wurde jedoch keine signifikante Änderung verzeichnet.⁸⁹ Die Macula densa, als ein kleiner Anteil der Niere, wurde bei dieser Studie jedoch nicht gezielt untersucht, wodurch eine dortige COX-2-Expressionssteigerung unerkannt geblieben sein könnte.

Bei der Untersuchung des Rückenmarks der ANXA1-/- Maus zeigte sich weiterhin eine vermehrte Bildung der PLA2G4.¹¹⁹ Aufgrund dieser Studie lässt sich die Hypothese aufstellen, dass auch in der Macula densa der ANXA1-/- Maus eine Steigerung der Expression von PLA2G4 nachzuweisen ist.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete vermehrte Konzentration von COX-2-mRNA in der Macula densa kann mehrere Ursachen haben. So könnte neben dem lokalen Effekt durch das fehlende ANXA1 auch eine systemische Veränderung der Konzentration von Kortikoiden oder anderen Hormonen in der ANXA1-/- Maus zu einer Modulation der COX-2-Expression führen. In kultivierten Zellen aus dem Hypophysenvorderlappen konnte gezeigt werden, dass ANXA1 normalerweise die Freisetzung von ACTH hemmt.⁹⁴ Auch in der Nebennierenrinde nimmt ANXA1 Einfluss auf die Hormonsekretion. Es kommt nicht zu einer

Inhibition der ACTH-medierten Aldosteronfreisetzung, jedoch zu einer verminderten Sekretion von Glukokortikoiden.¹²⁰ Eine genaue Untersuchung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in der ANXA1-/- Maus wird Gegenstand zukünftiger Studien in unserem Labor sein.

Die genaue Analyse der Regulation der COX-2-Expression in Abhängigkeit von ANXA1 kann im In-vivo-Modell nicht klar geführt werden, da auch hier die Differenzierung zwischen lokalen und systemischen Effekten von ANXA1 problematisch ist. Im Folgenden wurden daher anknüpfende Zellkulturexperimente durchgeführt. In Transfektionsstudien erfolgte die Untersuchung des Einflusses einer Überexpression von ANXA1 auf die COX-2-Expression. Es zeigte sich eine inverse Regulation der Expression beider Enzyme. Je mehr ANXA1-Protein oder -mRNA in den MMDD1-Zellen vorhanden war, desto geringer war die Menge an COX-2-Protein und -mRNA.

Über welchen Mechanismus eine lokale Inhibition von ANXA1 auf die COX-2-Expression in der Macula densa erfolgt, ist nicht bekannt. In Immunzellen wurde die Wirkung von ANXA1 auf COX-2 auf sowohl intra- als auch extrazellulärem Wege untersucht. Die intrazelluläre Steigerung der ANXA1-Expression in Makrophagen in einem Transfektionsexperiment führte nicht zu einer Hemmung der COX-2-Expression in Makrophagen.⁶³ Die Inhibition der COX-2-Expression durch eine intrazelluläre Steigerung der ANXA1-Konzentration scheint daher zellspezifisch zu sein und ist möglicherweise von einer Externalisierung von ANXA1 aus der Zelle abhängig. In Monozyten wurde die Entwicklung der antiinflammatorischen Effekte von ANXA1 nach erfolgter Externalisierung dieses Proteins beschrieben.¹²¹ Weiterhin konnte in mehreren Zellsystemen nachgewiesen werden, dass extrazellulär appliziertes ANXA1 einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von COX-2 ausübt. In Makrophagen wurde durch einen Konzentrationsanstieg des exogenen ANXA1 eine verminderte Expression von COX-2 beobachtet.⁶³ In kultivierten Myokardzellen konnte der kardioprotektive Effekt von Glukokortikoiden im Rahmen von inflammatorischen Prozessen auf eine extrazelluläre ANXA1-Wirkung zurückgeführt werden. So verhinderte das von extrazellulär applizierte ANXA1-Peptid AC2-26 die Lipopolysaccharid-induzierte COX-2-Expression in Zellen der kardialen Papillarmuskulatur.¹²²

Auch in den MMDD1-Zellen zeigte sich nach erfolgter Überexpression eine vermehrte Anreicherung von ANXA1-Protein nicht nur in den Zellen, sondern auch

im Zellkulturmedium. Die Frage, inwieweit die beobachtete ANXA1-Exkretion über einen geordneten Prozess erfolgt, sollte mithilfe der weiterführenden Studien beantwortet werden.

5.4 Einfluss von DXM auf ANXA1-Sekretion in der Macula densa

In den weiterführenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob ANXA1 einem Stimulus folgend freigesetzt wird und somit von extrazellulär zu einer Inhibition von COX-2 führen kann. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die Freisetzung von ANXA1 aus den MMDD1 durch DXM analysiert. In neuroendokrinen Zellen der Adenohypophyse ist bekannt, dass DXM zu einer schnellen Freisetzung von ANXA1 führt.⁶⁶ In einer anderen Studie konnte ein inhibitorischer Effekt von Glukokortikoiden auf die COX-2-Expression in der Macula densa gezeigt werden.¹²³ DXM stellt daher einen geeigneten Stimulus zur Analyse der Sekretion von ANXA1 aus der Macula densa und dessen Einfluss auf die Expression von COX-2 dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit DXM oder eine Überexpression von ANXA1 zu einem Expressionsanstieg und einer gesteigerten Sekretion von ANXA1, jedoch nicht zu einer Veränderung der intrazellulären ANXA1-Proteinmenge in den MMDD1 führte. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Zellsystemen hat sich gezeigt, dass die Mechanismen der ANXA1-Sekretion bisher unvollständig verstanden sind und zellspezifisch zu sein scheinen. In der Macula densa und in anderen Zellen zeigt sich ANXA1 im Ruhezustand in zytosolischer Verteilung. Aufgrund der fehlenden hydrophoben Gruppen kann ANXA1 für die Exozytose nicht zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und dort über den Golgi-Apparat in Vesikel verpackt werden.¹²⁴ Die Freisetzung von ANXA1 kann daher nicht über den konventionellen sekretorischen Weg erfolgen. Als alternative Möglichkeit wird eine ANXA1-Sekretion über den spezifischen Transporter ABCA1 diskutiert, der ATP-abhängig verschiedene Substrate transportieren kann. Dieser Mechanismus der ANXA1-Sekretion konnte in Darmmukosazellen und in neuroendokrinen Zellen der Adenohypophyse gezeigt werden.^{68,70} Im Rahmen dieser Studie konnte eine Expression von ABCA1 in den MMDD1 nachgewiesen werden. Eine Inhibition von ABCA1 durch Glibenclamid führte jedoch nicht zu einer Hemmung der Ausscheidung von ANXA1 durch DXM. Weiterhin wurde überprüft, ob Glibenclamid die unter DXM-

Behandlung induzierte Verminderung der COX-2-Expression in den MMDD1 verhindern kann. Die Behandlung der Macula densa-Zellen mit Glibenclamid führte jedoch zu einer ANXA1-unabhängigen Steigerung der COX-2-Expression. Die Ursache für diesen Effekt wurde bisher nicht untersucht. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Glibenclamid eine hemmende Wirkung auf ROMK, den an der apikalen Membran der Macula densa-Zellen gelegene Kalium-Kanal, ausübt.¹²⁵ Dies führt zu einer effektiven Hemmung des Salztransports über den NKCC2 und damit zu dem klinischen Symptomenkomplex des Bartter-Syndroms Typ II. Wie zuvor dargestellt handelt es sich dabei um einen gut belegten Stimulus für die Bildung von COX-2. Aus diesen Ergebnissen lässt sich keine Bedeutung von ABCA1 für die ANXA1-Sekretion oder die ANXA1-medierte Inhibition der COX-2-Expression ableiten.

Einer alternativen Hypothese zufolge kann ANXA1 auch durch Bildung von Zellmembranmikropartikeln aus der Zelle sezerniert werden. In humanen embryonalen Nierenzellen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit einer Bildung von ANXA1-angereicherten Zellmembranprotrusionen einhergeht, die als Mikropartikel abgespalten werden.⁷¹ Eine Mikropartikelbildung kann zur interzellulären Kommunikation in Form von Exosomen dienen.¹²⁶ In einer anderen Studie konnte beobachtet werden, dass Macula densa-Zellen in Abhängigkeit des Salzgehalts der Tubulusflüssigkeit schnell ihr Zellvolumen ändern. Hohe luminale NaCl-Konzentrationen führen in isolierten JGA-Präparaten zu einer Macula densa-Zellvergrößerung mit Mikropartikelabspaltungen, niedrige NaCl-Konzentrationen zu einer Macula densa-Zellverkleinerung.¹²⁷ Eine alternative ANXA1-Sekretion aus der Macula densa über Mikropartikelbildungen in Abhängigkeit von Zellvolumenänderungen ist daher denkbar.

Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass die Sekretion von ANXA1 einer physiologischen Steuerung unterliegt. Die Hypothese, dass ANXA1 von extrazellulär eine Inhibition von COX-2 induzieren kann, sollte in den anschließenden Teilstudien untersucht werden.

5.5 Wirkung der ANXA1-Rezeptoren

In Mikroglia konnte beobachtet werden, dass eine Stimulation mit ANXA1 eine Inhibition der Expression von COX-2 verursacht.⁸⁴ Auf welchem Weg diese

negative Regulation von COX-2 durch ANXA1 erfolgt, wurde jedoch nicht untersucht.

ANXA1 kann seine Wirkung über Bindung an einen Vertreter der G-Proteingekoppelten Fpr-Familie entfalten.^{72,73,75,78,80,83} Als die klassischen ANXA1-Rezeptoren der Maus gelten dabei der Fpr2 und der Fpr3, die beide äquivalent zu dem humanen FPRL1 sind. N-terminale Spaltprodukte von ANXA1 wie z. B. AC2-26 binden neben Fpr2 und Fpr3 auch an Fpr1. Welche Fpr-Rezeptoren in der Macula densa gebildet werden, war unbekannt. In der PCR-Analyse konnte im Rahmen dieser Arbeit die Expression sowohl des Fpr1, als auch von Fpr2 und Fpr3 in den Nieren von Mäusen und in den MMDD1 nachgewiesen werden. Die Behandlung der MMDD1 mit dem unspezifischen Fpr-Agonisten fMLF oder dem ANXA1-Peptid AC2-26 zeigte eine Verminderung der COX-2-Bildung und -Proteinkonzentration und rekapituliert damit die Wirkung von DXM oder einer ANXA1-Überexpression. Auch in Mikrogliazellen führt die extrazelluläre Applikation von dem ANXA1-Spaltprodukt AC2-26 sowohl zu einer verminderten Expression von COX2 als auch zu einer verringerten Freisetzung von PGE2.⁹⁴

Um die Frage nach dem spezifischen ANXA1-Rezeptor in der Macula densa zu klären, wurden selektiv wirkende Antagonisten eingesetzt. Die Macula densa-COX-2-Expression wurde nach selektiver Inhibition von Fpr1 durch CyH und von Fpr2 bzw. Fpr3 durch WRW4 untersucht. Bei Behandlung der MMDD1 mit CyH konnte die unter DXM-Einwirkung beobachtete Verringerung der COX-2-Expression verhindert werden. Der Fpr2- und Fpr3-spezifische Antagonist WRW4 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Macula densa-COX-2-Expression. Diese Daten sind vereinbar mit der Rolle von Fpr1 als ANXA1-Rezeptor in der Macula densa.

Damit scheinen die klassischen ANXA1-Rezeptoren Fpr2 und Fpr3 in der Macula densa keine zentrale Rolle für den beschriebenen Regulationsmechanismus zu spielen. Inwieweit es sich bei diesem Effekt um eine zellspezifische Besonderheit von Macula densa-Zellen handelt soll in zukünftigen Studien an genetisch manipulierten Tieren untersucht werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass extrazelluläres ANXA1 durch Aktivierung des Fpr1 eine hemmende Wirkung auf die COX-2-Synthese ausübt.

5.6 Regulation von Renin durch ANXA1

Zur Untersuchung der funktionelle Relevanz von ANXA1 im JGA wurde der Einfluss von ANXA1 auf die Expression von Renin analysiert. In der ANXA1^{-/-} Maus konnte im Rahmen dieser Studie eine gesteigerte Renin-Expression im JGA gezeigt werden. ANXA1 scheint daher eine tonische Inhibition der Bildung von Renin-mRNA in den juxtaglomerulären Zellen zu induzieren. Die Expression und Aktivität von Renin ist eng an die COX-2-Expression und -Proteinkonzentration in der Macula densa gebunden.^{128,129} COX-2 wird in Expression und Proteinkonzentration wiederum durch eine salzarmen Diät,²³ die Einnahme von Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmern wie z. B. Ramipril,¹³⁰ die Gabe von Diuretika,²³ eine experimentell verursachte renovaskuläre Hypertension¹³¹ und durch eine operative Entfernung der Nebenniere mit konsekutiver Kortikoiddepletion²⁹ positiv reguliert. Eine Steigerung der Plasma-Renin-Aktivität durch eine salzarme Diät ist ohne COX-2 nicht möglich,¹³² wodurch die zentrale Bedeutung von COX-2 für die Aktivität von Renin deutlich wird. Die zugrunde liegende Signalkaskade im JGA beginnt in der Macula densa, in der die von der PLA2G4 gebildeten Arachidonsäurederivate durch die COX-2 zu PGE2 umgewandelt werden. PGE2 verlässt die Macula densa-Zelle und bindet infolge an den EP4-Rezeptor der juxtaglomerulären Zelle, wodurch eine Freisetzung von Renin induziert wird.¹³³ Diese Signalkaskade, die in der Exkretion von Renin resultiert, kann in einem zentralen Schritt auf der Ebene der COX-2 durch ANXA1 inhibiert werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass ANXA1 eine zentrale Rolle bei der Modulation der Renin-Freisetzung im JGA einnimmt, wodurch sich eine Bedeutung bei der Regulation von Blutdruck und Volumenstatus des extrazellulären Raumes vermuten lässt.

6 Zusammenfassung

Die Niere ist ein zentrales Organ für die Regulation der Blutdruck- und Volumenhomöostase. Für diese Funktion ist der JGA die zentrale Regelstruktur, in der die Modulation des TGF durch verschiedene vasoaktive Enzymsysteme erfolgt. Die Bildung von PGE2 in Abhängigkeit von COX-2 und PLA2G4 in der Macula densa ist dabei einer der bedeutendsten Reaktionsschritte. Die Mechanismen der Regulation von COX-2 sowie der konsekutiven Bildung und Sekretion von Renin sind nicht vollständig bekannt.

Publizierte Daten zeigen eine Regulation der Prostaglandin-Synthese durch das antiinflammatorische Protein ANXA1. So wurde gezeigt, dass ANXA1 auch im JGA exprimiert wird. Die dortige Funktion und Wirkung auf die Expression von COX-2 und Renin war jedoch noch unbekannt. Die Hypothese der hier vorliegenden Studie war, dass ANXA1 in der Macula densa in Abhängigkeit vom Salztransport reguliert wird und eine inhibitorische Wirkung auf die Biosynthese von COX-2 und Renin ausübt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ANXA1 in der Macula densa exprimiert wird und mit den für PGE2-Synthese bedeutenden Enzymen PLA2G4 und COX-2 kolokalisiert ist. Die Regulation der ANXA1-Expression erfolgt salzabhängig, wobei eine Verminderung der Salzaufnahme in die Macula densa in eine Steigerung der Expression von ANXA1 und COX-2 resultiert. In ANXA1^{-/-} Mäusen war die Anzahl der COX-2-positiven Zellen im JGA höher als in den Kontrolltieren, gleichzeitig war die Expression von Renin gesteigert. Diese Stimulation der Expression ist mit dem Konzept einer inhibitorischen Wirkung von ANXA1 auf die PGE2-Synthese im JGA vereinbar. Zur weiteren Aufklärung der Mechanismen wurden Zellkulturstudien durchgeführt. Kultivierte Macula densa-Zellen, in denen ANXA1 überexprimiert war, zeigten eine verminderte Konzentration von COX-2-mRNA. Analog dazu ließ sich auch nach einer Behandlung der Macula densa-Zellen mit DXM eine Verminderung der COX-2-mRNA bei gleichzeitiger Steigerung der ANXA1-mRNA und -Sekretion nachweisen.

Eine pharmakologische Inhibition des ANXA1-Rezeptors Fpr1 verhinderte den DXM-Effekt auf die COX-2-Expression. Eine Stimulation des ANXA1-Rezeptors führte zu einer Verminderung der COX-2-Expression. Daher kann postuliert werden, dass ANXA1 über Bindung an seinen Rezeptor die COX-2-Expression in der Macula densa inhibiert.

Diese Daten zeigen, dass ANXA1 ein wichtiger intrinsischer Regulator der COX-2-Bildung und damit der PGE2-Synthese in der Macula densa ist. Über diesen Mechanismus hemmt ANXA1 die Renin-Bildung im JGA und ist damit ein wichtiger Modulator sowohl der GFR als auch der Blutdruckregulation.

Literaturverzeichnis

1. Schnermann J. The Juxtaglomerular Apparatus: From Anatomical Peculiarity to Physiological Relevance. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1681–1694.
2. Liu R, Pittner J, Persson AEG. Changes of Cell Volume and Nitric Oxide Concentration in Macula Densa Cells Caused by Changes in Luminal NaCl Concentration. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(11):2688–2696.
3. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin Release. *JASN*. 2010;21(7):1093–1096.
4. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, u. a. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev.* 1996;76(2):425–536.
5. Schnermann J, Briggs JP. Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int*. 2008;74(4):418–426.
6. Blantz RC. Making sense of the sensor: Mysteries of the macula densa. *Kidney Int*. 2000;70(5):828–830.
7. Thurau K, Schnermann J. The Na concentration of the macula densa cells as a factor regulating glomerular filtration rate (micropuncture studies). 1965. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1998;9(5):925–934.
8. Schnermann J, Traynor T, Yang T, u. a. Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments. *Kidney Int. Suppl*. 1998;67:S40–45.
9. Thomson SC, Bachmann S, Bostanjoglo M, u. a. Temporal adjustment of the juxtaglomerular apparatus during sustained inhibition of proximal reabsorption. *J. Clin. Invest*. 1999;104(8):1149–1158.
10. Castrop H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;189(1):3–14.
11. Bosse HM, Böhm R, Resch S, Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am. J. Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):F793–805.
12. Welch WJ, Tojo A, Lee J-U, u. a. Nitric oxide synthase in the JGA of the SHR: expression and role in tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999;277(1):F130–138.
13. Lang F, Gerok W, Häussinger D. New clues to the pathophysiology of hepatorenal failure. *Clin Investig*. 1993;71(2):93–97.
14. Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, u. a. Role of nitric oxide and prostaglandin E2 in acute renal hypoperfusion. *Nephrology (Carlton)*. 2003;8(2):65–71.
15. Townend JN, Doran J, Lote CJ, Davies MK. Peripheral haemodynamic effects of inhibition of prostaglandin synthesis in congestive heart failure and interactions with captopril. *Br Heart J*. 1995;73(5):434–441.
16. Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, u. a. Physiology of Kidney Renin. *Physiol. Rev.* 2010;90(2):607–673.
17. Wilcox CS, Deng X, Welch WJ. NO generation and action during changes in salt intake: roles of nNOS and macula densa. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1998;274(6):R1588–1593.
18. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflammation Research*. 2004;53(4):125–132.

19. Buczynski MW, Dumlaio DS, Dennis EA. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. Lipid Res.* 2009;50(6):1015–1038.
20. Yang T, Park JM, Arend L, u. a. Low Chloride Stimulation of Prostaglandin E2Release and Cyclooxygenase-2 Expression in a Mouse Macula Densa Cell Line. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(48):37922–37929.
21. Kleta R, Basoglu C, Kuwertz-Bröking E. New treatment options for Bartter's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(9):661–662.
22. Harris RC. COX-2 and the kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006;47 Suppl 1:S37–42.
23. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, u. a. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.* 1994;94(6):2504–2510.
24. Theilig F, Campean V, Paliege A, u. a. Epithelial COX-2 Expression Is Not Regulated By Nitric Oxide in Rodent Renal Cortex. *Hypertension.* 2002;39(4):848–853.
25. Yang T, Singh I, Pham H, u. a. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998;274(3):F481–489.
26. Cheng H-F, Wang J-L, Zhang M-Z, u. a. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *Journal of Clinical Investigation.* 1999;103(7):953–961.
27. Harris RC, Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001;281(1):F1–11.
28. Madsen K, Stubbe J, Yang T, u. a. Low endogenous glucocorticoid allows induction of kidney cortical cyclooxygenase-2 during postnatal rat development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(1):F26–37.
29. Zhang M-Z, Harris RC, McKanna JA. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(26):15280 –15285.
30. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, u. a. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(15):7240–7244.
31. Cheng S-E, Lin C-C, Lee I-T, u. a. Cigarette smoke extract regulates cytosolic phospholipase A2 expression via NADPH oxidase/MAPKs/AP-1 and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem.* 2011;112(2):589–599.
32. Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Letters.* 1997;410(1):49–53.
33. Kim S-W, Rhee HJ, Ko J, u. a. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 by Annexin I. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(19):15712 –15719.
34. Yona S, Ward B, Buckingham JC, Perretti M, Flower RJ. Macrophage biology in the Anx-A1-/- mouse. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2005;72(2):95–103.
35. Mangat H, Peterson LN, Burns KD. Hypercalcemia stimulates expression of intrarenal phospholipase A2 and prostaglandin H synthase-2 in rats. Role of angiotensin II AT1 receptors. *J. Clin. Invest.* 1997;100(8):1941–1950.
36. McKanna JA, Chuncharunee A, Munger KA, u. a. Localization of p35 (annexin I, lipocortin I) in normal adult rat kidney and during recovery from ischemia. *J. Cell. Physiol.* 1992;153(3):467–476.
37. Barnes JA, Gomes AV. Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol. Cell. Biochem.* 2002;231(1-2):1–7.

38. Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 2000;130(2):289–298.
39. Antonicelli F, De Coupade C, Russo-Marie F, Le Garrec Y. CREB is involved in mouse annexin A1 regulation by cAMP and glucocorticoids. *Eur J Biochem.* 2001;268(1):62–69.
40. Castro-Caldas M, Mendes AF, Duarte CB, Lopes MCF. Dexamethasone-induced and estradiol-induced CREB activation and annexin 1 expression in CCRF-CEM lymphoblastic cells: evidence for the involvement of cAMP and p38 MAPK. *Mediators Inflamm.* 2003;12(6):329–337.
41. Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, u. a. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lancet.* 1990;335(8703):1416–1418.
42. De Caterina R, Sicari R, Giannessi D, u. a. Macrophage-specific eicosanoid synthesis inhibition and lipocortin-1 induction by glucocorticoids. *J. Appl. Physiol.* 1993;75(6):2368–2375.
43. Smith SF, Tetley TD, Datta AK, u. a. Lipocortin-1 distribution in bronchoalveolar lavage from healthy human lung: effect of prednisolone. *J. Appl. Physiol.* 1995;79(1):121–128.
44. Mulla A, Leroux C, Solito E, Buckingham JC. Correlation between the antiinflammatory protein annexin 1 (lipocortin 1) and serum cortisol in subjects with normal and dysregulated adrenal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90(1):557–562.
45. Croxtall JD, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(8):3571–3575.
46. Violette SM, King I, Browning JL, u. a. Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 1990;142(1):70–77.
47. Meers P, Mealy T, Pavlotsky N, Tauber AI. Annexin I-mediated vesicular aggregation: mechanism and role in human neutrophils. *Biochemistry.* 1992;31(28):6372–6382.
48. Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 1993;120(1):77–83.
49. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, u. a. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci.* 1997;110(10):1199–1213.
50. Pepinsky RB. Phosphorylation of lipocortin-1 by the epidermal growth factor receptor. *Meth. Enzymol.* 1991;198:260–272.
51. Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, u. a. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat. Med.* 1996;2(11):1259–1262.
52. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* 1997;120(6):1075–1082.
53. Yang Y, Hutchinson P, Morand EF. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(7):1538–1544.
54. Relton JK, Strijbos PJ, O'Shaughnessy CT, u. a. Lipocortin-1 is an endogenous inhibitor of ischemic damage in the rat brain. *J. Exp. Med.* 1991;174(2):305–310.
55. Cuzzocrea S, Taylor A, Zingarelli B, u. a. Lipocortin 1 protects against splanchnic artery occlusion and reperfusion injury by affecting neutrophil migration. *J. Immunol.* 1997;159(10):5089–5097.

56. La M, D'Amico M, Bandiera S, u. a. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *FASEB J.* 2001;15(12):2247–2256.
57. Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, u. a. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121(5):883–888.
58. Davidson J, Flower RJ, Milton AS, Peers SH, Rotondo D. Antipyretic actions of human recombinant lipocortin-1. *Br. J. Pharmacol.* 1991;102(1):7–9.
59. Taylor AD, Cowell AM, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone suppresses the release of prolactin from the rat anterior pituitary gland by lipocortin 1 dependent and independent mechanisms. *Neuroendocrinology.* 1995;62(5):530–542.
60. Taylor AD, Philip JG, John CD, u. a. Annexin 1 (lipocortin 1) mediates the glucocorticoid inhibition of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated prolactin secretion. *Endocrinology.* 2000;141(6):2209–2219.
61. Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994;15(3):71–76.
62. Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes.* 1994;1197(1):63–93.
63. Smyth T, Harris HJ, Brown A, u. a. Differential modulatory effects of Annexin 1 on nitric oxide synthase induction by lipopolysaccharide in macrophages. *Immunology.* 2006;117(3):340–349.
64. Lim LHK, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 2007;21(4):968–975.
65. Skrahina T, Piljic A, Schultz C. Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins. *Experimental Cell Research.* 2008;314(5):1039–1047.
66. Solito E, Mulla A, Morris JF, u. a. Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology.* 2003;144(4):1164–1174.
67. Omer S, Meredith D, Morris JF, Christian HC. Evidence for the Role of Adenosine 5'-Triphosphate-Binding Cassette (ABC)-A1 in the Externalization of Annexin 1 from Pituitary Folliculostellate Cells and ABCA1-Transfected Cell Models. *Endocrinology.* 2006;147(7):3219–3227.
68. Wein S, Fauroux M, Laffitte J, u. a. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. *Biochemical Pharmacology.* 2004;67(6):1195–1202.
69. Klein I, Sarkadi B, Váradi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1461(2):237–262.
70. Chapman LP, Epton MJ, Buckingham JC, Morris JF, Christian HC. Evidence for a Role of the Adenosine 5'-Triphosphate-Binding Cassette Transporter A1 in the Externalization of Annexin I from Pituitary Folliculo-Stellate Cells. *Endocrinology.* 2003;144(3):1062–1073.
71. Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):80–89.

72. John CD, Gavins FN, Buss NA, Cover PO, Buckingham JC. Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008;8(6):765–776.
73. Ye RD, Boulay F, Wang JM, u. a. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*. 2009;61(2):119–161.
74. Movitz C, Brive L, Hellstrand K, Rabiet M-J, Dahlgren C. The Annexin I Sequence Gln9-Ala10-Trp11-Phe12 Is a Core Structure for Interaction with the Formyl Peptide Receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(19):14338–14345.
75. Perretti M, Getting SJ, Solito E, Murphy PM, Gao J-L. Involvement of the Receptor for Formylated Peptides in the in Vivo Anti-Migratory Actions of Annexin 1 and its Mimetics. *Am J Pathol*. 2001;158(6):1969–1973.
76. John CD, Sahni V, Mehet D, u. a. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. *FASEB J*. 2007;21(4):1037–1046.
77. Stenfeldt A-L, Karlsson J, Wennerås C, u. a. Cyclosporin H, Boc-MLF and Boc-FLFLF are Antagonists that Preferentially Inhibit Activity Triggered Through the Formyl Peptide Receptor. *Inflammation*. 2007;30(6):224–229.
78. Ernst S, Lange C, Wilbers A, u. a. An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family. *J Immunol*. 2004;172(12):7669–7676.
79. Rabiet M-J, Huet E, Boulay F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview. *Biochimie*. 2007;89(9):1089–1106.
80. Walther A, Riehemann K, Gerke V. A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor: Annexin I Regulates Neutrophil Extravasation by Interacting with the FPR. *Molecular Cell*. 2000;5(5):831–840.
81. Dufton N, Hannon R, Brancaleone V, u. a. Anti-Inflammatory Role of the Murine Formyl-Peptide Receptor 2: Ligand-Specific Effects on Leukocyte Responses and Experimental Inflammation. *J Immunol*. 2010;184(5):2611–2619.
82. Solito E, Raguene-Nicol C, de Coupade C, Bisagni-Faure A, Russo-Marie F. U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. *Br J Pharmacol*. 1998;124(8):1675–1683.
83. D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*. 2008;155(2):152–169.
84. Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, u. a. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol*. 1999;126(6):1307–1314.
85. Solito E, Christian HC, Festa M, u. a. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J*. 2006;20(9):1498–1500.
86. Coméra C, Russo-Marie F. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br. J. Pharmacol*. 1995;115(6):1043–1047.
87. Cirino G, Cicala C, Sorrentino L, u. a. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol*. 1993;108(3):573–574.

88. Rescher U, Danielczyk A, Markoff A, Gerke V. Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. *J. Immunol.* 2002;169(3):1500–1504.
89. Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, u. a. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J.* 2003;17(2):253–255.
90. Weichert W, Paliege A, Provoost AP, Bachmann S. Upregulation of juxtaglomerular NOS1 and COX-2 precedes glomerulosclerosis in fawn-hooded hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(4):F706–714.
91. Wenzel-Seifert K, Seifert R. Cyclosporin H is a potent and selective formyl peptide receptor antagonist. Comparison with N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl- L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanine and cyclosporins A, B, C, D, and E. *The Journal of Immunology.* 1993;150(10):4591 –4599.
92. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, u. a. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(21):7413–7417.
93. Rajalingam D, Loftis C, Xu JJ, Kumar TKS. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science.* 2009;18(5):980–993.
94. Taylor AD, Cowell AM, Flower J, Buckingham JC. Lipocortin 1 mediates an early inhibitory action of glucocorticoids on the secretion of ACTH by the rat anterior pituitary gland in vitro. *Neuroendocrinology.* 1993;58(4):430–439.
95. Solito E, De Caterina R, Giannessi D, u. a. Studies on the induction of lipocortin-1 by glucocorticoids. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 1993;29(3):391–394.
96. Hartt JK, Barish G, Murphy PM, Gao J-L. N-Formylpeptides Induce Two Distinct Concentration Optima for Mouse Neutrophil Chemotaxis by Differential Interaction with Two N-Formylpeptide Receptor (Fpr) Subtypes. *The Journal of Experimental Medicine.* 1999;190(5):741 –748.
97. Peti-Peterdi J, Bell PD. Cytosolic [Ca²⁺] signaling pathway in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1999;277(3):F472–476.
98. Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu. Rev. Physiol.* 2011;73:377–399.
99. Seidel S, Neymeyer H, Kahl T, u. a. Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2. *American journal of physiology. Renal physiology.* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791338>. Zugegriffen August 24, 2012.
100. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I. Functional Coupling Between Various Phospholipase A2s and Cyclooxygenases in Immediate and Delayed Prostanoid Biosynthetic Pathways. *J. Biol. Chem.* 1999;274(5):3103–3115.
101. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:39–47.
102. McArthur S, Yazid S, Christian H, u. a. Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization. *FASEB J.* 2009;23(11):4000–4010.
103. Croxtall JD, Choudhury Q, Newman S, Flower RJ. Lipocortin 1 and the control of cPLA2 activity in A549 cells: Glucocorticoids block EGF stimulation of cPLA2 phosphorylation. *Biochemical Pharmacology.* 1996;52(2):351–356.
104. Paliege A, Parsumathy A, Mizel D, u. a. Effect of apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(3):R694–700.

105. Herbert SP, Odell AF, Ponnambalam S, Walker JH. The Confluence-dependent Interaction of Cytosolic Phospholipase A2- α with Annexin A1 Regulates Endothelial Cell Prostaglandin E2 Generation. *J. Biol. Chem.* 2007;282(47):34468–34478.
106. Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin L-L. Calcium-mediated Translocation of Cytosolic Phospholipase A to the Nuclear Envelope and Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 1995;270(51):30749–30754.
107. Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC. Effect of selective inhibition of the inducible cyclooxygenase on renin release in healthy volunteers. *J. Investig. Med.* 1998;46(6):290–296.
108. Mann B, Hartner A, Jensen BL, u. a. Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int.* 2001;59(1):62–68.
109. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1991;260(4):F486–F493.
110. Fuster D, Escher G, Vogt B, u. a. Furosemide Inhibits 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *Endocrinology.* 1998;139(9):3849–3854.
111. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J.* 1994;302(Pt 3):723–727.
112. Morii H, Ozaki M, Watanabe Y. 5'-Flanking Region Surrounding a Human Cytosolic Phospholipase A2 Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1994;205(1):6–11.
113. Lecona E, Barrasa JI, Olmo N, u. a. Upregulation of Annexin A1 Expression by Butyrate in Human Colon Adenocarcinoma Cells: Role of p53, NF- κ B, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology.* 2008;28(15):4665–4674.
114. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J. Clin. Invest.* 2000;106(5):681–688.
115. Hiller G, Sundler R. Activation of Arachidonate Release and Cytosolic Phospholipase A2 via Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Macrophages Stimulated by Bacteria or Zymosan. *Cellular Signalling.* 1999;11(12):863–869.
116. Steinert D, Küper C, Bartels H, Beck F-X, Neuhofer W. PGE2 potentiates tonicity-induced COX-2 expression in renal medullary cells in a positive feedback loop involving EP2-cAMP-PKA signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(1):C75–C87.
117. Mizuno H, Uemura K, Moriyama A, u. a. Glucocorticoid induced the expression of mRNA and the secretion of lipocortin 1 in rat astrocytoma cells. *Brain Research.* 1997;746(1–2):256–264.
118. John CD, Theogaraj E, Christian HC, u. a. Time-specific effects of perinatal glucocorticoid treatment on anterior pituitary morphology, annexin 1 expression and adrenocorticotrophic hormone secretion in the adult female rat. *J. Neuroendocrinol.* 2006;18(12):949–959.
119. Ayoub SS, Yazid S, Flower RJ. Increased susceptibility of annexin-A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin-A1. *Br J Pharmacol.* 2008;154(5):1135–1142.
120. Davies E, Omer S, Buckingham JC, Morris JF, Christian HC. Expression and Externalization of Annexin 1 in the Adrenal Gland: Structure and Function of the Adrenal Gland in Annexin 1-Null Mutant Mice. *Endocrinology.* 2007;148(3):1030–1038.

121. Sudlow AW, Carey F, Forder R, Rothwell NJ. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE2 and TNF alpha release from human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol*. 1996;117(7):1449–1456.
122. Ritchie RH, Sun X, Bilszta JL, Gulluyan LM, Dusting GJ. Cardioprotective actions of an N-terminal fragment of annexin-1 in rat myocardium in vitro. *Eur. J. Pharmacol*. 2003;461(2-3):171–179.
123. Zhang M-Z, Wang S, Cheng H, u. a. Regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 in young rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2003;285(5):F881 –F888.
124. Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, u. a. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*. 1986;320(6057):77–81.
125. Konstas A-A, Dabrowski M, Korbmacher C, Tucker SJ. Intrinsic Sensitivity of Kir1.1 (ROMK) to Glibenclamide in the Absence of SUR2B. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(24):21346 – 21351.
126. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78(9):838–848.
127. Komlosi P, Fintha A, Bell PD. Unraveling the relationship between macula densa cell volume and luminal solute concentration/osmolality. *Kidney Int*. 2006;70(5):865–871.
128. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, u. a. Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2001;280(3):F449–456.
129. Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, u. a. Cyclooxygenase-2 Mediates Increased Renal Renin Content Induced by Low-Sodium Diet. *Hypertension*. 1997;29(1):297–302.
130. Wolf K, Castrop H, Hartner A, u. a. Inhibition of the Renin-Angiotensin System Upregulates Cyclooxygenase-2 Expression in the Macula Densa. *Hypertension*. 1999;34(3):503–507.
131. Hartner A, Goppelt-Struebe M, Hilgers KF. Coordinate Expression of Cyclooxygenase-2 and Renin in the Rat Kidney in Renovascular Hypertension. *Hypertension*. 1998;31(1):201–205.
132. Yang T, Endo Y, Huang YG, u. a. Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279(5):F819–F825.
133. Facemire CS, Nguyen M, Jania L, u. a. A major role for the EP4 receptor in regulation of renin. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2011;301(5):F1035–1041.

Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Dr. Alexander Paliege, der nicht nur die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojekts übernommen hat, sondern auch ausschlaggebend für meine heutige Begeisterung für die Nephrologie war und ist. Durch seine Förderung und Unterstützung konnte ich sowohl an zahlreichen interessanten nationalen und internationalen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen als auch einen sehr lehrreichen Forschungsaufenthalt an der University of Southern California in dem Labor von Prof. Dr. Janos Peti-Peterdi durchführen.

Nicht weniger zu danken gilt es meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sebastian Bachmann für seine wohlwollende Begleitung, seine konstruktive Kritik und kontinuierliche Förderung meiner Promotionsarbeit.

Ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit hat auch die kollegiale und positive Stimmung im Labor beigetragen. Hier möchte ich insbesondere Tom Röschel und Turgay Saritas nennen, mit denen die Zusammenarbeit selbst zu ausgefallenen Arbeitszeiten eine Freude war.

Ein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, die mir nicht nur hinsichtlich der Promotionsarbeit stets unterstützend beistand.

Eidesstaatliche Erklärung

Ich, Saskia Seidel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation und Wirkung von Annexin A1 in der Macula densa“ 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

Lebenslauf

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

Anhang: Publikationsliste

Seidel S, Neymeyer H, Kahl T, Roeschel T, Flower RJ, Schnermann JB, Bachmann S, Paliege A, Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2; American Journal of Physiology Renal Physiology. Juli 2012

Nakano D, Kobori H, Burford JL, Gevorgyan H, **Seidel S**, Hitomi H, Nishiyama A, Peti-Peterdi J, Multiphoton Imaging of the Glomerular Permeability of Angiotensinogen; Journal of American Society of Nephrology. Juli 2012

Paliege A, Roeschel T, Neymeyer H, **Seidel S**, Kahl T, Daigeler AL, Mutig K, Mrowka R, Ferreri NR, Wilson BS, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb; American Journal of Physiology Renal Physiology. April 2012

Ausgewählte Kongressbeiträge, Poster

Seidel S, Paliege A, Bachmann S, Flower RJ, Peti-Peterdi J, Localization and signaling of FPR2 in the kidney, Experimental Biology, Washington, DC, 2011

Seidel S, Roeschel T, Kahl T, Schnermann J, Bachmann S, Paliege A, Annexin A1 mediates the effects of dexamethasone on macula densa cyclooxygenase-2 expression, Experimental Biology, Anaheim, Kalifornien, 2010

Seidel S, Roeschel T, Paliege A, Regulation of Annexin A1 in the macula densa: association with neuronal nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2, European Student's Conference, Berlin, 2009