

**Tubuläre Volumenregulation
bei Glomerulonephritis
in der Megalin-teildefizienten Maus**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Kastner
aus Teterow, Mecklenburg

Mai 2011

Bearbeitungszeitraum: 1. Mai 2006 bis 31. Mai 2011

Leitung: Prof. Dr. Sebastian Bachmann

Institut für Vegetative Anatomie, Charité Universitätsmedizin Berlin

Erstgutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputation am 3. November 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Funktionen und Feinbau der Niere	10
1.1.1 Regulationsmechanismen der Niere	12
1.2 Wichtige Transportproteine und Wasserkanäle für den epithelialen Natrium- und Wassertransport in der Niere	14
1.2.1 Regulation des Epithelialen Natriumkanals	16
1.3 Nierenschäden, Proteinurie und Volumendysregulation.....	18
1.3.1 Nierenschäden und Bluthochdruck.....	18
1.3.2 Proteinurie und Ödembildung	19
1.3.3 Lokalisation der Natriumretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen.....	20
1.4 Die anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis.....	21
1.5 Die konditionelle partielle Megalin- <i>knockout</i> -Maus.....	22
2 Herleitung der Aufgabenstellung der Arbeit.....	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Lösungen, Puffer und Medien	25
3.2 Versuchstiere	28
3.2.1 Das anti-GBM-GN-Modell	28
3.3 Physiologische Analysen.....	29
3.3.1 Blutdruckmessung	29
3.3.2 Analyse von Urin- und Plasmaparametern.....	29
3.4 Perfusionsfixierung, Organentnahme und Gewebeaufbereitung.....	30
3.5 Molekularbiologische Analysen.....	31
3.5.1 mRNA-Extraktion	31
3.5.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion.....	31
3.5.3 <i>TaqMan</i> [®] <i>real-time quantitative PCR</i>	32
3.6 Proteinchemische Analysen.....	33
3.6.1 Zellfraktionierung.....	33

Inhaltsverzeichnis	4
3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting	35
3.6.4 NHE-Aktivitätsmessung	36
3.7 Morphologische Techniken	36
3.7.1 Immunhistochemie	36
3.7.2 Verwendete Antikörper	37
3.7.3 Quantifizierung des COX-2 und Renin-Gehaltes	38
3.8 Datenquantifizierung und statistische Analyse	39
3.9 Produktion von Antikörpern gegen den epithelialen Natriumkanal	39
3.9.1 Expression rekombinanter GST-ENaC-Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	39
3.9.2 Isolation und Aufreinigung der rekombinanten GST-ENaC-Fusionsproteine	41
3.9.3 Antisera aus Kaninchen und Affinitätsreinigung	41
3.10 Suche nach enzymatischen Schnittstellen in künstlichen Maus- α - und γ ENaC-Peptiden	43
3.10.1 Inkubation der künstlichen Peptide mit immobilisiertem Sammelurin	43
3.10.2 Massenspektrometrische Analyse der Peptide (MALDI-TOF)	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Klinische und physiologische Parameter	46
4.2 Analyse von proximal-tubulären Na ⁺ -Transportern und AQP1	50
4.3 Analyse von distal-tubulären Na ⁺ -Transportern und AQP2	53
4.4 Suche nach enzymatischen Schnittstellen in künstlichen Maus- α - und γ ENaC-Peptiden	58
5 Diskussion	63
5.1 anti-GBM-GN und RME-Defizienz in der Maus und ihr Einfluss auf renale Natriumtransporter und Wasserkanäle	63
5.2 Schnittstellen in den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC	69
6 Zusammenfassung	73
Kurzfassung	74
Abstract	76
Literaturverzeichnis	78
Danksagung	101
Lebenslauf	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema eines Säugernephrons: Lage der Segmente in den Nierenzonen	10
Abb. 2: Glomeruläre Filtrationsbarriere	11
Abb. 3: anti-GBM-Glomerulonephritis in der Maus	46
Abb. 4: Ausscheidung des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) im Urin	48
Abb. 5: Messungen des systolischen Blutdrucks.....	49
Abb. 1: Immunhistochemische Analyse der proximal-tubulären Transporter NHE3, NaPi-IIa und AQP1.....	50
Abb. 7: Semiquantitative Immunblots von NHE3, NaPi-IIa und AQP1	51
Abb. 8: NHE-Aktivität.....	52
Abb. 9: Semiquantitative Immunblots veränderter Natrium-Transporter und Wasserkanäle in der kortikalen und in der medullären Plasmamembran	54
Abb. 10: Immunhistochemische Analyse der Transporter α ENaC, γ ENaC, α Na ⁺ - K ⁺ -ATPase und AQP2 im Nierenkortex.....	57
Abb. 11: Enzymatische Schnittstellen in den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der <i>Cre(-)</i> und <i>Cre(+)</i> -Mäuse in Gruppen mit oder ohne anti-GBM-GN	29
Tab. 2: Abschnitten der extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC entsprechende, synthetische Peptide	44
Tab. 3: Physiologische Parameter	47
Tab. 4: COX-2 und RAAS-Parameter	49
Tab. 5: Numerische Werte semiquantitativer Immunblots der proximal-tubulären Transporter in der BBM	51
Tab. 6: <i>quantitative real-time</i> -PCR für proximal tubuläre Parameter	52
Tab. 7: Zusammenfassung proximal-tubulärer veränderter Parameter in den Mäusen ..	53
Tab. 8: Numerische Werte semiquantitativer Immunblots distal-tubulärer Transporter	56
Tab. 9: Peaks aus der MALDI-TOF-Analyse von synthetischen α ENaC-Peptiden und von deren Schnittprodukten im Zeitverlauf	58
Tab. 10: Schnittstellen in synthetischen Peptiden aus den extrazellulären Schleifen von α ENaC	59
Tab. 11: Peaks aus der MALDI-TOF-Analyse von synthetischen γ ENaC-Peptiden und von deren Schnittprodukten im Zeitverlauf	60
Tab. 12: Schnittstellen in synthetischen Peptiden aus den extrazellulären Schleifen von γ ENaC	61

Abkürzungsverzeichnis

ACE	engl. <i>angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
A. dest.	lat. <i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
anti-GBM-GN	anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis
AQP1	Aquaporin Isoform 1
AQP2	Aquaporin Isoform 2
AS	Aminosäure
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
ATL	engl. <i>ascending thin limb</i> , aufsteigender dünner Ast der HENLESchen Schleife
BBM	engl. <i>brush border membrane</i> , Bürstensaummembran
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin
CAP	engl. <i>channel activating protease</i>
CCD	engl. <i>cortical collecting duct</i> , kortikales Sammelrohr
CD	engl. <i>collecting duct</i> , Sammelrohr
CNT	engl. <i>connecting tubule</i> , Verbindungstubulus
DAB	Diaminobenzidin
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DCT	engl. <i>distal convoluted tubule</i> , distales Konvolut
DCT1	engl. <i>early distal convoluted tubule</i> , frühes distales Konvolut
DCT2	engl. <i>late distal convoluted tubule</i> , spätes distales Konvolut
DTL	engl. <i>descending thin limb</i> , absteigender dünner Ast der HENLESchen Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EIPA	5-(N-Ethyl-N'-isopropyl)-amilorid
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ENaC	engl. <i>epithelial sodium channel</i> , Epithelialer Natriumkanal
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GST	Glutathion-S-Transferase
HAES	Hydroxyethylstärke
HEPES	2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Na,K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaPi-IIa	engl. <i>type IIa sodium-phosphate cotransporter</i> , Typ IIa Natrium-Phosphat-Kotransporter
NCC	engl. <i>sodium chloride cotransporter</i> , Natrium-Chlorid-Kotransporter
NGS	engl. <i>normal goat serum</i> , normales Ziegen Serum
NHE3	engl. <i>sodium-hydrogen exchanger isoform 3</i> , Natrium-Wasserstoff-Austauscher Isoform 3
NKCC2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter Isoform 2
MALDI-TOF	engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization, time of flight</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, Flugzeit
MCD	engl. <i>medullary collecting duct</i> , medulläres Sammelrohr
MD	<i>Macula densa</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
P1-4	erstes bis viertes Pellet
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

PCT	engl. <i>proximal convoluted tubule</i> , proximales Konvolut
PM	Plasmamembran
PST	engl. <i>proximal straight tubule</i> , dicker absteigender Ast der HENLESchen Schleife
PT	engl. <i>proximal tubule</i> , Proximaler Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RME	engl. <i>receptor mediated endocytosis</i> , rezeptorvermittelte Endozytose
ROMK	engl. <i>renal outer medullary potassium channel</i> , Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	engl. <i>thick ascending limb</i> , dicker aufsteigender Ast der HENLESchen Schleife
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	tubuloglomerulärer <i>feedback</i>
TMPRSS4	<i>transmembrane protease, serine 4</i>
Ü1-4	erster bis vierter Überstand
v/v	engl. <i>volume per volume</i> , Volumen [in %] bezogen auf das Gesamtvolumen
w/v	engl. <i>weight per volume</i> , Gewicht [in %] bezogen auf das Gesamtvolumen

1 Einleitung

1.1 Funktionen und Feinbau der Niere

Zu den Hauptfunktionen der Niere gehört die Einstellung des Salz- und Elektrolythaushaltes sowie des Wasserhaushaltes. Dies erfolgt durch einen leistungsfähigen Harnkonzentrierungsmechanismus. Regulation von Salz- und Wasserhaushalt bedingen die Regulation des Blutdrucks. Die menschliche Niere produziert am Tag 180 l Primärharn, wovon nur 1-2 l Endharn ausgeschieden werden. Stoffwechselendprodukte oder Fremdstoffe werden abgegeben, wertvolle Ressourcen zurückgewonnen. Weiterhin reguliert die Niere den Säure- und Basenhaushalt, die Erythropoese durch Bildung des Hormons Erythropoietin und den Calcium- und Phosphatstoffwechsel durch Bildung von Calcitriol, dem aktiven Vitamin D (KRIZ 2003, SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2007). Die Niere wird in vier Zonen eingeteilt. Die äußerste Zone bildet die Nierenrinde (Cortex), nach innen schließt sich das Nierenmark (Medulla) an, die wiederum in äußere und innere Medulla unterteilt wird. Die äußere Medulla besteht nochmals aus zwei Zonen, dem Außenstreifen und dem Innenstreifen. Die kleinste funktionelle Einheit der Niere

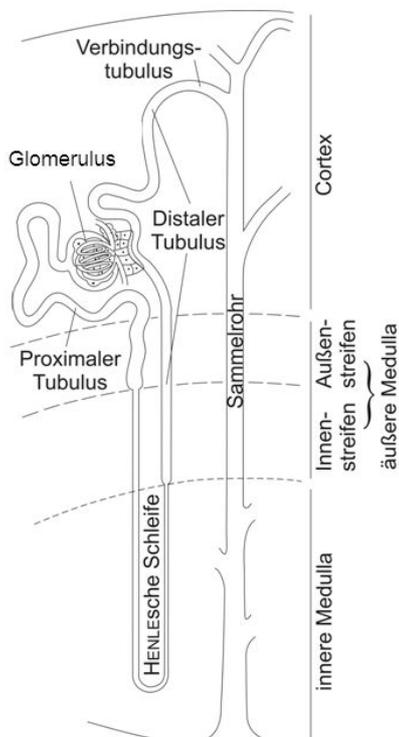


Abb. 1: Schema eines Säugernephrons: Lage der Segmente in den Nierenzonen

ist ein Nephron, wovon jeweils 1.000.000 pro Niere im Menschen vorkommen (KRIZ 2003). Das Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen und einem Nierentubulus, der in einzelne Abschnitte unterteilt wird (KRIZ & BANKIR 1988). Der proximale Tubulus (*proximal tubule*, PT), schließt sich an das Nierenkörperchen an und enthält einen gewundenen Teil (*proximal convoluted tubule*, PCT) und einen geraden Teil (*proximal straight tubule*, PST). An den proximalen Tubulus schließt sich der intermediäre Tubulus an, der aus einem dünnen absteigenden Schleifenschenkel (*descending thin limb*, DTL) und einem dünnen aufsteigenden Schleifenschenkel (*ascending thin limb*, ATL) besteht. Der intermediäre Tubulus geht in den distalen Tubulus über, der aus dem dicken aufsteigenden Schleifenschenkel (*thick ascending limb*, TAL) und

dem distalen Konvolut (*distal convoluted tubule*, DCT) besteht. Im DCT kann das frühdistale und das spätdistale Konvolut (DCT1 und DCT2) unterschieden werden (BACHMANN et al. 1999, SCHMITT et al. 1999). Schließlich mündet der distale Tubulus über einen Verbindungstubulus (*connecting tubule*, CNT) in das Sammelrohr (*collecting duct*, CD), über welches der Harn nach außen abgeführt wird. Das Sammelrohr kann in einen kortikalen und einen medullären Abschnitt unterteilt werden (*cortical collecting duct*, CCD, *medullary collecting duct*, MCD). Die haarnadelförmige HENLESche Schleife besteht aus PST, DTL, ATL und TAL.

Dem Nierenkörperchen wird das Blut durch eine afferente Arteriole zugeführt, welche sich in ein Kapillarknäuel aufspaltet. Dieses ragt in eine Aussackung des Tubulus, die BOWMANSche Kapsel, hinein. Das Kapillarknäuel vereinigt sich wieder zur efferenten Arteriole, die das Blut abführt. Das Kapillarknäuel und die viszerale Epithelzellen der BOWMANSchen Kapsel, die Podozyten, bilden den Glomerulus. Nach Lage des Eintritts der Kapillaren oder des Anschlusses zum Tubulus werden Gefäß- und Harnpol unterschieden. Der Primärharn, das Ultrafiltrat der Niere, welches aus dem Blutplasma durch Filtration abgepresst wird, hat die gleiche Zusammensetzung an niedermolekularen

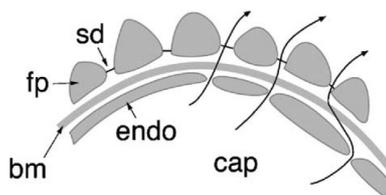


Abb. 2: Glomeruläre Filtrationsbarriere: Gefäßkapillare (cap), Endothelzelle (endo), glomeruläre Basalmembran (bm), Fußfortsatz eines Podocyten (fp), Schlitzdiaphragma (sd) (KRAMER-ZUCKER et al. 2005)

Stoffen wie das Blutplasma. Die größten- und ladungsselektive glomeruläre Filtrationsbarriere (Übersicht in JARAD & MINER 2009) hält große Moleküle von $> 44 \text{ \AA}$ vollständig im Blutplasma zurück (CHANG et al. 1975a).

Das Serumprotein Albumin mit einem Molekulargewicht von 66 kDa (CARTER et al. 1989) und einem effektivem Radius von 36 \AA wird nur in sehr geringen Mengen filtriert (CHANG et al. 1975b). Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht auf der Blutseite aus einer Schicht von fenestriertem Kapillarendothel mit einer Porengröße von 50-100 nm, der glomerulären Basalmembran (GBM) und auf der Harnseite aus einer Schicht viszeraler Epithelzellen der BOWMANSchen Kapsel, den Podozyten. Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen fingerartig ineinander und bilden Filtrationsschlitze, die 5-20 nm breit sind. Die zwischen den Epithelien liegende GBM besteht vor allem aus negativ geladenen Proteinen. Die Filtrationsschlitze werden von einer Schlitzmembran überspannt (KRIZ 2003).

Nach Übertritt der glomerulären Filtrationsbarriere können entlang des Epithels der Nephrone und des Epithels der Sammelrohre Wasser, Salze, geringfügig filtrierte

Plasmaprotein wie Albumin und andere energiereiche Ressourcen wie Zucker und Aminosäuren wieder reabsorbiert und dem Körper zurückgeführt werden. Die Volumenregulation umfasst Einstellungen des Salzhaushalts des Körpers. Elektrolyte können nach Bedarf reabsorbiert oder sezerniert werden. Die Osmoregulation beinhaltet die Einstellung des Wasserhaushaltes. Erhalt oder Ausscheidung von Wasser sind so reguliert, dass es nicht aktiv transportiert wird. Vielmehr erfolgt aufgrund eines aufgebauten Konzentrationsgradienten ein passiver Fluss ins Interstitium oder ins Tubuluslumen, je nachdem, ob hyperosmotischer oder hypoosmotischer Harn ausgeschieden werden soll. Weitere Substanzen wie Abfallstoffe, z.B. Harnstoff, oder andere Toxine, Medikamente oder Xenobiotika, können über die Tubuluszellen in den Harn sezerniert werden. Aufgrund einer gleichbleibenden Konzentration bestimmter Stoffe, die nur filtriert, jedoch weder resorbiert noch sezerniert werden, sind Berechnungen der Leistungsfähigkeit der Niere möglich (*Kreatinin-Clearance*) (KRIZ 2003).

1.1.1 Regulationsmechanismen der Niere

Nierenfunktion und systemisches Volumen können bei Veränderung des inneren Milieus durch zwei wichtige Regelemente verändert werden. Zum einen wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) durch den tubuloglomerulären *feedback*-Mechanismus (TGF) reguliert und zum anderen kann die Niere das systemische Volumen durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) verändern.

Dafür wichtig ist der juxtaglomeruläre Apparat. Dieser besteht aus (1) der *Macula densa* (MD), einer Platte aus spezialisierten, großkernigen und dicht nebeneinander liegenden Zellen im TAL, die in Verbindung zum Glomerulus stehen, (2) dem extraglomerulären Mesangium, welches im Zwickel zwischen *Vas afferens*, der afferenten, und *Vas efferens*, der efferenten Arteriole des Glomerulus liegt, sowie (3) den granulierten Zellen der afferenten Arteriole, die die Protease Renin sezernieren und sympathisch innerviert sind (KRIZ 2003).

Der TGF ist eine negative Rückkopplungsschleife, die den NaCl-Transport zum distalen Nephron in engen Grenzen hält. Dabei steht die tubuläre Harnkonzentrierung am Ende des TAL in funktioneller Beziehung zum Tonus der afferenten glomerulären Arteriole. Eine Zunahme der NaCl-Konzentration an der apikalen Seite der MD-Zellen führt zu einem erhöhten transzellulären NaCl-Transport und zu ihrer metabolischen Aktivierung

(Übersicht in SCHNERMANN & BRIGGS 2008). Der Transport wird apikal durch den Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter Isoform 2 (NKCC2) mit Hilfe des Kaliumkanals des äußeren Nierenmarks (*renal outer medullary potassium channel*, ROMK) und basolateral durch die α -Untereinheit der Natrium-Kalium-ATPase (α -Na,K-ATPase) vermittelt und ist gekoppelt an die ATP-Freisetzung aus den Mitochondrien der MD-Zellen und an dessen Dephosphorylierung zu Adenosin mithilfe von ecto-5'-Nukleotidase. Daraufhin bewirkt Adenosin die Aktivierung des A1 Adenosinrezeptors der afferenten glomerulären Arteriole und bewirkt eine Konstriktion. Folglich sinken Filtrationsdruck und GFR. Dabei spielt Angiotensin II, das an den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 der afferenten glomerulären Arteriole bindet, eine wichtige Rolle als Kofaktor der gefäßverengenden Wirkungen des Adenosins. Parakrine Faktoren wie NO, die von der in den MD-Zellen exprimierten neuronalen NO-Synthase gebildet wird, modulieren den TGF (Übersicht in SCHNERMANN & BRIGGS 2008, WRIGHT et al. 1974, MUNDEL et al. 1992, SUN et al. 2001, VALLON et al. 2001, LORENZ et al. 2002, CASTROP et al. 2004, LAI et al. 2006, LORENZ et al. 2006).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist eine Hormon- und Enzymkaskade, die das extrazelluläre Volumen, den Natrium- und Wasserhaushalt und den Blutdruck reguliert (Übersicht in BREWSTER & PERAZELLA 2004). Bei Minderdurchblutung des *Vas afferens* fällt die GFR ab, so dass die Natriumchlorid-Konzentration an der MD sinkt. Es erfolgt eine Aktivierung der Barorezeptoren, woraufhin die granulierten Zellen der afferenten Arteriolenwand des Glomerulus die Protease Renin in den Blutkreislauf sezernieren. Durch negative Rückkopplung wird die Reninfreisetzung durch erhöhten Angiotensin II- und Aldosterongehalt gehemmt (SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2007). Die Reninsekretion kann ebenfalls aufgrund einer sympathischen Aktivität erfolgen (Übersicht in TORRETTI 1982). Man kann ein zirkulatorisches RAAS von einem Gewebe-RAAS unterscheiden. Im zirkulatorischen RAAS wirkt Renin im Blutkreislauf, indem es von dem in der Leber synthetisierten und sezernierten Angiotensinogen das biologisch inaktive Angiotensin I abspaltet. Dieses wird wiederum durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (*angiotensin converting enzyme*, ACE) in Angiotensin II umgewandelt. ACE wird in den Endothelzellen der Lunge und der Blutgefäße und den Zellmembranen der Nieren, des Herzens und des Gehirns gebildet (Übersicht in BREWSTER & PERAZELLA 2004, JOHNSTON 1992). Daneben inaktiviert ACE auch Bradykinin und reduziert somit die Serumkonzentration endogener Vasodilatoren (Übersicht in BREWSTER & PERAZELLA 2004). Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch. Beim Gewe-

be-RAAS läuft diese Kaskade in einzelnen Organen ab. Dabei kann auch ohne systemisches Angiotensin I aus dem Kreislauf Angiotensin II gebildet werden (Übersicht in BREWSTER & PERAZELLA 2004, WEIR & DZAU 1999). Die Aktivierung von Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 stimuliert die Synthese von Aldosteron in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde, welches dann an Mineralokortikoid-Rezeptoren in den Hauptzellen des Sammelrohrs bindet und dort eine Natriumretention bewirkt (Übersicht in BREWSTER & PERAZELLA 2004, LARAGH et al. 1960, GARTY 1992).

1.2 Wichtige Transportproteine und Wasserkanäle für den epithelialen Natrium- und Wassertransport in der Niere

Natrium wird frei filtriert. Für alle Transportprozesse sind in den apikalen und basolateralen Membranen des Tubulusepithels entlang der unterschiedlichen Tubulussegmente des Nephrons (PT [PCT, PST], DTL, ATL, TAL, DCT) und der Segmente des Sammelrohrsystems (CNT, CD [CCD, MCD]) verschiedene Transportproteine und Ionenkanäle exprimiert, die die Resorption von Wasser und Natrium bewerkstelligen.

Der transzelluläre Wassertransport in der Niere erfolgt über Wasserkanäle, den Aquaporinen (AQP), die für die Harnkonzentrierung von wichtiger Bedeutung sind. Die Isoform AQP1 wird im PT und im DTL apikal exprimiert, wo sie hauptsächlich für die Wasserresorption des proximalen Nephrons verantwortlich ist. Eine weitere Isoform ist AQP2, die in den Hauptzellen des CNT und CD exprimiert wird. Die Regulation der Umverteilung aus subapikalen Vesikeln in die apikale Plasmamembran (PM) erfolgt hauptsächlich durch Vasopressin, das antidiuretische Hormon, welches an seinen basolateralen Rezeptor bindet und über Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht. Anschließend aktiviert cAMP die Proteinkinase A, welche intrazelluläres AQP2 phosphoryliert, woraufhin AQP2 in die PM inseriert wird (Übersicht in MARPLES et al. 1999). AQP2-Mutationen rufen einige Formen des nephrogenen Diabetes insipidus hervor (AGRE 1998). Basolaterale, konstitutiv exprimierte Aquaporine in CNT und CD sind AQP3 und AQP4 (Übersicht in MARPLES et al. 1999).

Die Na,K-ATPase wird basolateral entlang des Nephrons und Sammelrohrsystems exprimiert (MCDONOUGH et al. 1994). Sie bewirkt einen Transport von drei Natriumio-

nen von intra- nach extrazellulär mit Gegentransport von zwei Kaliumionen von extrazellulär nach intrazellulär unter ATP-Verbrauch. Dadurch wird ein Natriumkonzentrationsgradient aufgebaut, der die treibende Kraft für den aktiven Natriumtransport darstellt (SKOU 2004).

Über 60 % der Reabsorption des filtrierten Natriums findet im PT statt. Der Natrium-Wasserstoff-Austauscher Isoform 3 (*sodium hydrogen exchanger isoform 3*, NHE3) wird in der apikalen, durch Mikrovilli stark vergrößerten Bürstensaummembran (*brush border membrane*, BBM) des PCT und apikal im TAL exprimiert. Im Gegenzug zur Aufnahme von Natriumionen werden Protonen in das Tubuluslumen sezerniert. Im PCT vermittelt NHE3 die Aufnahme von NaCl und NaHCO₃, im TAL die von NaHCO₃ (BIEMESDERFER et al. 1993, AMEMIYA et al. 1995, LORENZ et al. 1999). Die Bedeutung von NHE3 für die proximale Natrium-Resorption und den Säure-Basen-Haushalt wird deutlich an NHE3-*knockout*-Mäusen, die eine Hypovolämie, einen verminderten Blutdruck und eine leichte Azidose zeigen (SCHULTHEIS et al. 1998). Auch der Typ IIa Natrium-Phosphat-Kotransporter (*type IIa sodium-phosphate cotransporter*, NaPi-IIa) dient der Natriumresorption, ist aber vor allem für die Resorption von 60-70 % des filtrierten anorganischen Phosphats verantwortlich. Er wird in der BBM und in subapikalen Vesikeln des PCT und PST exprimiert (CUSTER et al. 1994, BECK et al. 1998).

Im TAL werden ca. 23 % des Natriums reabsorbiert. Dort wird, einschließlich der MD-Zellen, der NKCC2 zusammen mit ROMK exprimiert. NKCC2 ist für die Harnkonzentrierung essentiell und kann nach Bedarf ein Natriumion, ein Kaliumion und zwei Chloridionen zugleich reabsorbieren, wobei über ROMK ein Kaliumion wieder aus der Zelle ins Tubuluslumen abfließt, welches für die weitere Aufnahme von den für NKCC2 spezifischen Ionen entscheidend ist. Die Hemmung von NKCC2 ist durch die Schleifendiuretika Furosemid und Bumetanid möglich, was Hypokalämie und Alkalose zur Folge haben kann. Dies sind auch Symptome des BARTTER-Syndroms, hervorgerufen durch *loss-of-function*-Mutationen von NKCC2 und ROMK, sowie des assoziierten Kanals ClC-Kb und der akzessorischen Chloridkanaluntereinheit Barttin (STARREMANS et al. 2003).

Die hormonelle Feineinstellung der Natriumresorption erfolgt im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (DCT, CNT, CCD), wo das restliche Natrium resorbiert wird. Im DCT wird der Natrium-Chlorid-Kotransporter (*sodium chloride cotransporter*, NCC) exprimiert (SCHMITT et al. 1999). Er ist durch das Diuretikum Thiazid hemmbar, wobei es zum Verlust von Kalium kommt. Eine *loss-of-function*-Mutation des NCC, das

GITELMAN-Syndrom, weist eine Alkalose, Hypomagnesiämie, Hypokalzurie und leichten Salzverlust auf (MORRIS et al. 2006). Die Expression des Epithelialen Natriumkanals (*epithelial sodium channel*, ENaC) beginnt im DCT2, wo er mit NCC kolokalisiert ist (MENETON et al. 2004). Der größte Anteil der ENaC-Untereinheiten wird in den Verbindungstubuluszellen des CNT und in den Hauptzellen des CCD und des MCD exprimiert (HAGER et al. 2001). Auf diesen Transporter soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2.1 Regulation des Epithelialen Natriumkanals

Über die Expression, Funktion und Regulation des ENaC wurde schon übersichtlich berichtet (GARTY & PALMER 1997, BHALLA & HALLOWS 2008, LOFFING & KORBMACHER 2009). Der ENaC wird, neben seiner Lokalisation im distalen Nephron, in der apikalen Membran vieler Epithelien exprimiert: in der Harnblase, im distalen Kolon, in der Lunge, in Schweiß- und Speicheldrüsen, in den Geschmackssinneszellen für Salz, erregbaren Neuronen und mechanosensorischen Zellen (GARTY & PALMER 1997). Molekularstrukturell ist ENaC ein Heteromultimer aus drei verschiedenen Untereinheiten, α , β und γ , die untereinander eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz-Identität von 30 bis 40 % zeigen (CANESSA et al. 1994). In der Vergangenheit wurde eine stöchiometrische Zusammensetzung aus vier (FIRSOV et al. 1998, KOSARI et al. 1998, DIJKINK et al. 2002, ANATHARAM et al. 2007), acht oder neun Untereinheiten (SNYDER et al. 1998, ESKANDARI et al. 1999) angenommen, jedoch zeigte die Kristallstrukturanalyse des verwandten Kanals ASIC1 Hinweise für einen heterotrimeren Aufbau (JASTI et al. 2007). Alle drei Untereinheiten enthalten jeweils eine große, extrazelluläre Schleife und zwei Transmembrandomänen, M1 und M2, wobei M2 vermutlich an der Kanalöffnung beteiligt ist (KELLENBERGER & SCHILD 2002). Ihre kurzen amino- und carboxyterminalen Enden reichen ins Zytoplasma hinein. Durch den ENaC vermittelter Natriumtransport ist durch das Diuretikum Amilorid hemmbar (GARTY & PALMER 1997). Alle drei Untereinheiten des ENaC weisen Amilorid-Bindestellen auf (KELLENBERGER & SCHILD 2002). Im Gegensatz zu Bumetanid bewirkt Amilorid, dass kein Kalium mit ausgeschwemmt wird (Kaliumsparendes Diuretikum). Neben den drei bekannten Untereinheiten wurde noch eine vierte δ -Untereinheit aus einer humanen NierencDNA-Bank geklont, die der α -Untereinheit funktionell ähnelt und vorrangig im Gehirn, aber auch schwach in der Niere exprimiert wird (WALDMANN et al. 1995). Jedoch

ist derzeit noch unklar, ob die δ -Untereinheit für den transepithelialen Transport eine bedeutende Rolle spielt.

Die physiologische Regulation des ENaC ist durch eine Vielzahl von Faktoren möglich. Dies können Hormone wie Aldosteron, Angiotensin II, Vasopressin, Insulin, *insulin like growth factor 1* sein. Intra- oder extrazelluläre Proteasen, intra- oder extrazelluläre Ionenkonzentrationen, Osmolarität, die tubuläre Flussrate oder Kinasen, sowie mit der intrazellulären Umverteilung assoziierte, interagierende Proteine wie Ubiquitinligasen, deubiquitinierende Proteasen oder Rab-Proteine spielen ebenfalls eine Rolle (Übersicht in LOFFING & KORBMACHER 2009).

Aldosteron ist der wesentliche hormonelle Regulator des ENaC-vermittelten Natriumtransports und wirkt auf das seit neuerem so bezeichnete aldosteronsensitive Nephron (ASDN), welches DCT2, CNT sowie CCD und MCD umfasst (LOFFING et al. 2001). Das ASDN ist durch eine hohe Expression des zytoplasmatischen Mineralokortikoidrezeptors und der 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 charakterisiert (BACHMANN et al. 1999, LOFFING et al. 2001). Nach Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor wandert dieser Komplex in den Zellkern und induziert oder vermindert die Expression Na^+ -transportierender Proteine wie ENaC und $\text{Na}_2\text{K-ATPase}$ und von den Na^+ -Transport regulierenden Genen. Erhöhte Plasmaaldosteronkonzentrationen führen zur Umverteilung von ENaC aus intrazellulären Vesikeln zur apikalen Zellmembran (DIJKINK et al. 1999, MASILAMANI et al. 1999, LOFFING et al. 2001, LOFFING & KORBMACHER 2009). Ähnliche, durch Glukokortikoide hervorgerufene Effekte werden durch die glukokortikoidinaktivierende Aktion der 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (HSD11B) verhindert (EDWARDS et al. 1988, FUNDER et al. 1988).

Vasopressin ist ebenfalls ein wichtiges Hormon, das den ENaC über die Bindung an den Vasopressinrezeptor aktiviert. Die nachfolgend aktivierte Adenylatzyklase synthetisiert den *second messenger* cAMP und aktiviert die Proteinkinase A, welche zu einer erhöhten Umverteilung von ENaC von intrazellulär mit einem erhöhten Einbau in die Zellmembran führt (LOFFING & KORBMACHER 2009, BUTTERWORTH et al. 2005).

Auch die intra- oder extrazelluläre Natriumkonzentration kann den ENaC regulieren. Kurzfristige Veränderungen der Kanalaktivität werden durch Veränderung der extrazellulären Natriumkonzentration erreicht, was man als Natrium-Selbstinhibition bezeichnet (FUCHS et al. 1977). Dieser Effekt ist temperaturabhängig und wird durch extrazellulä-

res Trypsin aufgehoben (CHRAÏBI & HORISBERGER 2002). Die so genannte *feedback*-Hemmung wird durch die intrazelluläre Natriumkonzentration bewirkt und führt zu langfristigeren Veränderungen der ENaC-Aktivität (MACROBBIE & USSING 1961). Dabei wird die ENaC-Aktivität bei zunehmendem Natriumeinstrom und erhöhter intrazellulärer Natriumkonzentration indirekt gehemmt (ABRIEL et al. 1999).

Die Bedeutung des ENaC für die Natriumhomöostase wird deutlich an seiner pathophysiologischen Rolle bei Mutationen der ENaC-Untereinheiten. Beim LIDDLE-Syndrom oder dem Pseudohyperaldosteronismus tritt eine starke Hypertonie und Hypokaliämie bei niedriger Aldosteronsekretion auf (LIDDLE et al. 1963). Die Ursachen sind autosomal dominant vererbbare Mutationen bzw. Deletionen des C-Terminus der β - und γ ENaC-Untereinheit (SHIMKETS et al. 1994, HANSSON et al. 1995a, HANSSON et al. 1995b, SCHILD et al. 1995). Diese *gain-of-function*-Mutationen bewirken eine konstitutive ENaC-Aktivität, was die Natrium-*feedback*-Hemmung aufhebt und zu einer gesteigerten Natriumretention führt (KELLENBERGER et al. 1998). Die Folgen sind Volumenexpansion, Hypokalämie und Alkalose. *Loss-of-function*-Mutationen mit verminderter ENaC-Funktion bewirken den autosomal oder rezessiv vererbaren Pseudohypoaldosteronismus Typ I (CHANG et al. 1996). Dort sind N-terminale Loci der α - und β ENaC-Untereinheit oder Loci in der extrazellulären Schleife der α - Untereinheit mutiert. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch vermehrte Salzausscheidung, Mineralkortikoidresistenz, Dehydratation, Hyponatriämie, Hypotonie, Hyperkalämie und metabolische Azidose trotz normaler GFR und normaler Funktion der Nebennieren (CHEEK & PERRY 1958, DILLON et al. 1980, CHANG et al. 1996).

1.3 Nierenschäden, Proteinurie und Volumendysregulation

1.3.1 Nierenschäden und Bluthochdruck

Nephropathien sind weitverbreitet. 2006 gab es 66.508 Dialysepatienten, 8.473 warteten auf eine Spenderniere und 2.776 bekamen eine neue Spenderniere. Im Jahre 2006 waren 13 % von 6.863 Patienten bei Therapiebeginn an einer Glomerulonephritis erkrankt (FREI & SCHÖBER-HALSTENBERG 2008). Glomerulonephritiden (GN) sind entzündliche glomeruläre Erkrankungen der Niere. Neben primären glomerulären Erkrankungen mit unbekannter Ursache können GN sekundär als Folge von Infektionen, Medikamenten-

einwirkungen oder Systemerkrankungen entstehen (HALLER & GROSS 2003). Ein Bluthochdruck tritt zu 90 % als primäre, essentielle Hypertonie und zu 10 % als sekundäre, renovaskuläre Hypertonie mit Veränderungen der Nierenarterien und Aktivierung des RAAS auf. Die Niere ist an der Entstehung beider Formen beteiligt (HOLLENBERG & ADAMS 1976). Eine Hypertonie entsteht nicht nur zum Teil durch die Niere bedingt, sie kann diese auch in Rückwirkung schädigen. Mutationen einzelner Gene im distalen Tubulus der Niere zeigen in eindrucksvoller Weise den Zusammenhang zwischen Natriumaufnahme und pathologisch verändertem Blutdruck (LUFT 2003, VEHASKARI 2009).

1.3.2 Proteinurie und Ödembildung

Aufgrund der Läsion der Glomeruli bei GN entsteht eine Proteinurie, das Erscheinen von Serumproteinen wie Albumin im Urin. Unter normalen Bedingungen verhindert die permselektive glomeruläre Filtrationsbarriere einen Verlust der Serumproteine aus dem Blutkreislauf (WALZ 2003). Bei Proteinurie gelangen sie jedoch in den proximalen Tubulus und werden dort durch rezeptorvermittelte Endozytose (*receptor mediated endocytosis*, RME) mithilfe der Multiliganden-Rezeptoren Megalin und Cubilin wieder aufgenommen. Daraufhin erfolgt der Transport der Proteine in die Lysosomen, Abbau und schließlich die Abgabe der Abbauprodukte ins peritubuläre Blut (CHRISTENSEN & BIRN 2002). Eine Proteinurie mit nephrotischem Ausmaß führt zur Sättigung der Multiliganden-Rezeptoren und übersteigt die Wiederaufnahme- und Abbaukapazität der proximalen Tubuluszellen, die eine Proteinüberladung erfahren (ZOJA et al. 2004). Nachfolgend treten renale Natrium- und Wasserretention, Bluthochdruck, sowie interstitielle Ödeme auf, die hinderliche Einschränkungen der Bewegung und des Lidschlusses für den Patienten bedeuten (DOUCET et al. 2007). Die möglichen Gründe dieser Funktionsstörungen wurden bisher nur zum Teil aufgeklärt. Zur Entstehung von Ödemen gibt es mehrere Vorstellungen. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Volumenexpansion beinhalten renale Natriumretention und Veränderungen des transkapillären Flüssigkeitstransportes (DOUCET et al. 2007). Ein Erklärungsmodell hierfür ist die Volumenmangel-Hypothese (*underfill hypothesis*). Danach führt der Albumin- und Proteinverlust durch den Urin zur Hypovolämie, was eine sekundäre Natriumretention zur Folge hat: die Abnahme des kolloidosmotischen Drucks in den Kapillaren gegenüber dem des Interstitiums erleichtert die Transsudation von Flüssigkeit aus den Kapillaren, die sich im Interstitium ansammelt. Somit nimmt das effektive Blutvolumen ab. Über sympathische

Aktivität, RAAS-System und das Antidiuretische Hormon erfolgt eine systemische Gegenregulation mit Salz- und Wasserretention, um die Gewebepерfusion zu gewährleisten (EPSTEIN 1952, WALZ 2003, KIM et al. 2004). Jedoch können Fehlfunktionen der Volumenregulation bei nephrotischen Patienten auch ohne einhergehende Veränderungen des Blutdrucks und der RAAS-Effekte auftreten (LOURDEL et al. 2005, AUDIGÉ et al. 2003), was einer anderen Erklärung bedarf.

Daher wurde zum anderen die Volumenüberschuss-Hypothese (*overflow hypothesis*) diskutiert, welche besagt, dass durch eine Nierenerkrankung eine primäre Natriumretention *per se* zur Volumenretention führt (HRICIK et al. 1998, ORTH & RITZ 1998). Der Blutkreislauf wird überfüllt (*circulatory overfilling*), wobei eine kritische Überschreitung des effektiven Filtrationsdrucks die lymphatische Kompensationskapazität überfordert. Durch vermehrten Plasmawasserstrom in das Interstitium entstehen Ödeme (WALZ et al. 2003). Dazu gibt es die Beobachtung, dass eine kompensatorische Natriumausscheidung im Sammelrohr durch das atriale natriuretische Peptid (ANP), beim nephrotischen Syndrom verhindert wird (VALENTIN et al. 1998). In unserer Arbeitsgruppe wurde in zwei proteinurischen Rattenmodellen (PAN und anti-Thy 1-GN) gezeigt, dass eine verminderte Expression der Typ II Transmembran-Serinprotease Corin in der Medulla, welche pro-ANP zu aktivem ANP konvertiert (YAN et al. 2000), zur Natriumretention beiträgt (POLZIN et al. 2010).

1.3.3 Lokalisation der Natriumretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen

Entlang des Nierentubulus stellen verschiedene, auf vielfache Weise regulierbare Transporter und Kanäle potentielle Lokalisationen für die Natriumretention unter proteinurischen Bedingungen dar. Der proximale Tubulus wurde bereits daraufhin untersucht (BESSE-ESCHMANN et al. 2002, BACHMANN et al. 2004, GEKLE 2005, ABBATE et al. 2006). Eine Proteinüberladung kann seine Struktur beeinträchtigen, indem zytoskeletale Veränderungen verursacht, Lipide angereichert und Entzündungsfaktoren induziert werden können. In der Folge kann das *trafficking* der Transporter und Kanäle beeinflusst werden (KIM et al. 2004, MOTOYOSHI et al. 2008, GADAU et al. 2009). Die NHE3-abhängige Natriumreabsorption und lysosomale Ansäuerung (BESSE-ESCHMANN et al. 2002, KLISIC et al. 2003, KIM et al. 2004), sowie koexprimierte Transportproteine wie der NaPi-IIa und AQP1 können betroffen sein (GADAU et al. 2009).

Distal kann die Regulation des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporters 2 (NKCC2) der dicken aufsteigenden HENLESchen Schleifen (TAL) ebenfalls beeinträchtigt werden (KIM et al. 2004), jedoch ist die distale Hauptlokalisation der Retention den Sammelrohren zugeschrieben worden (ICHIKAWA et al. 1983, DESCHÊNES et al. 2001), und neuere Forschung hat sich auf die Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in einer RAAS-unabhängigen Weise konzentriert (AUDIGÉ et al. 2003, LOURDEL et al. 2005, KIM et al. 2006). Neue Perspektiven haben sich zudem aus Beobachtungen ergeben, dass ENaC-Untereinheiten durch Proteasen geschnitten werden, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht und die Natrium-Selbstinhibition aufgehoben werden kann (CHRAÏBI & HORISBERGER 2002, HUGHEY et al. 2004, SHENG et al. 2006, HARRIS et al. 2007, PASSERO et al. 2008, ROSSIER & STUTTS 2009, SVENNINGSSEN et al. 2009).

1.4 Die anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis

Eine anti-glomeruläre-Basalmembran-Glomerulonephritis (anti-GBM-GN) stellt eine Unterform der rasch progredienten GN dar, bei der nach Ruptur der glomerulären Kapillaren zelluläre und humorale Inflammationsmediatoren in die BOWMANSchen Kapsel gelangen. Diese bewirken eine starke glomeruläre Schädigung, welche sich klinisch in einer schweren GN mit raschem Nierenfunktionsverlust manifestiert (JENNETTE & THOMAS 2001). Die anti-GBM-GN wird durch gegen die $\alpha 3$ -Kette des Typ IV-Kollagens gerichtete Autoantikörper hervorgerufen (HELLMARK et al. 1994, KALLURI et al. 1995). Bei der Hälfte der Patienten mit einer anti-GBM-GN tritt eine zusätzlich eine pulmonale Hämorrhagie auf, dann spricht man speziell vom GOODPASTURE-Syndrom (JENNETTE & THOMAS 2001).

Die anti-GBM-GN-Modell der Maus wurde in letzter Zeit auf die Entstehung zellulärer Halbmonde in den Glomeruli untersucht, die ein charakteristisches Merkmal für eine rasch progrediente GN darstellt (LE HIR et al. 2001, MOELLER et al. 2004). Zwei Tage nach Injektion des anti-GBM Antikörpers tritt eine Proteinurie auf. Ab Tag drei sind endokapillär im Glomerulus Veränderungen sichtbar, wobei die Podozyten noch intakt sind. Nach sechs Tagen gibt es verschiedene Veränderungen der Glomeruli, wie die Abflachung der Podozytenfußfortsätze, luminale Protrusionen der Podozyten (mikrovillöse Transformation) und einige zelluläre Halbmonde. Nach zehn Tagen sind tiefgrei-

fende Veränderungen in fast allen Glomeruli zu sehen, von denen etwa 40 % Halbmonde aufweisen. Die Podozyten bilden Brücken zwischen dem Kapillarknäuel und der Wand der Bowmanschen Kapsel, welche nach drei Tagen vereinzelt, nach sechs und zehn Tagen regelmäßig zu finden sind (LE HIR et al. 2001). Die Podozyten bilden einen wesentlichen Bestandteil entstehender Halbmonde, verlieren dabei jedoch ihren ursprünglichen Phänotyp (MOELLER et al. 2004). Andere Untersuchungen am anti-GBM-GN-Tiermodell zeigten eine Natriumretention sowie eine Proteinurie (SIMON et al. 1989, LE HIR 2004, THEILIG et al. 2007).

1.5 Die konditionelle partielle Megalin-*knockout*-Maus

Eine niedermolekulare Proteinurie tritt in *Megalin*^(-/-)-Mäusen mit einer verminderten RME auf (LEHESTE et al. 1999). Jedoch spielt Megalin auch eine wesentliche Rolle für die zelluläre Aufnahme essentieller Nährstoffe während der Embryonalentwicklung, und ein vollständiger *Megalin-knockout* bedingt eine starke perinatale Lethalität (WILLNOW et al. 1996). Somit ist die Untersuchung älterer Tiere aufgrund ihrer Rarität sehr aufwendig. Daher wurde eine zweite megalindefiziente Maus mit einem konditionellen nierenspezifischen *knockout* entwickelt, der eine Deletion des Membranankers aufweist und durch Kreuzung der transgenen Mäusestämme *Megalin*^{lox/lox} und *apoE*^{Cre} erzeugt wird (LEHESTE et al. 2003). In transgenen (*Megalin*^{lox/lox})-Mäusen ist das Exon, das für den Megalin-Membrananker kodiert, von in gleicher Richtung orientierten *lox P*-sites, welche aus dem Bakteriophagen P1 stammen, umgeben („gefloxt“). Bei (*apoE*^{Cre}) wird das Enzym CreVI Rekombinase (engl.: *causes recombination*), ebenfalls aus dem Bakteriophagen P1, mit Hilfe eines Fragmentes aus der humanen Apolipoprotein E-Promotorregion (5′ humanes apoE) und eines Fragmentes des humanen apoE-Gen-Polyadenylierungssignals (3′ humanes apoE) nur im proximalen Tubulus der Niere exprimiert. Im doppelt transgenen Hybriden (*Megalin*^{lox/lox}; *apoE*^{Cre}) wird dann das *lox P*-site-flankierte Exon des Megalin-Membranankers nierenspezifisch durch die Cre Rekombinase ausgeschnitten. Dieser partielle *knockout* liegt mosaikartig mit einer Rate von 50-70% vor, so dass sowohl im ganzen Nephron als auch in einzelnen Zellen innerhalb bestimmter Nephrone kein funktionstüchtiger Megalin/Cubilin-vermittelter endozytotischer Apparat mehr vorliegt und auch hier eine tubuläre, niedermolekulare Proteinurie verursacht wird (LEHESTE et al. 2003). So treten mitunter im

proximalen Nierentubulus megalindefiziente neben megalinpositiven Zellen auf (BACHMANN et al. 2004), so dass in einer histologischen Analyse die direkte Gegenüberstellung von megalindefizienten und intakten proximalen Tubuli möglich ist.

Die Bewertung des Ausmaßes der Megalindefizienz in den doppelt transgenen Mäusen (*Megalin^{lox/lox}; apoE^{Cre}*) mit verringerter Rückgewinnung aus dem Tubulusharn ist über die Messung des Gehaltes vom Megalinliganden Vitamin D-bindendes Protein (DBP) im Endharn möglich (LEHESTE et al. 2003).

2 Herleitung der Aufgabenstellung der Arbeit

Die Motivation zu dieser Arbeit entstand aus der Frage nach möglichen tubulären Ursachen und Mechanismen der anti-GBM-GN mit Proteinurie unter nephrotischem Niveau, die zu Fehlfunktionen der Natrium- und Volumenregulation führen. Weiterhin stand die Frage nach der Lokalisation der Natriumretention in einem bestimmten Tubulussegment. Es sollten die Auswirkungen einer glomerulären Proteinurie auf die Volumenregulation in einem nephritischen Mausmodell untersucht werden. Dabei sollte auch die Rolle der proximal-tubulären Resorption mit in Betracht gezogen werden. Dafür wurde die anti-GBM-GN in Mäusen mit einem nierenspezifischen Megalin-teil-*knockout* induziert. Das partielle Fehlen (50 bis 70 %) eines funktionstüchtigen, Megalin/Cubilin-vermittelten endozytotischen Apparates in diesen megalindefizienten Mäusen verursacht zusätzlich eine niedermolekulare Proteinurie (LEHESTE et al. 2003, THEILIG et al. 2007).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Suche nach Veränderungen der Expression wesentlicher Natriumtransporter und Wasserkanäle entlang des Nephronepithels mithilfe proteinbiochemischer und molekularbiologischer Methoden.

Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

- (1) Im proximalen Tubulus werden filtrierte Serumkomponenten endozytiert, die bei Überforderung der Resorptionskapazität durch pathologische Proteinurie nicht mehr aufgenommen werden können und die Expression und die Aktivität lokaler und nachgelagerter tubulärer Transporter und Kanäle beeinflussen können.
- (2) Die intrazelluläre Umverteilung und die Oberflächenexpression wesentlicher, an der Volumenregulation beteiligter, tubulärer Transportproteine sind bei der anti-GBM-GN derart verändert, dass sie eine Volumenretention bewirken.

Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe erstmalig zeigen, dass bei einer akuten GN mit Proteinurie, die zu einer Natriumretention führt, vermehrt Spaltprodukte der α - und der γ -Untereinheit des ENaC auftreten (GADAU et al. 2009). Bereits in *in vitro*-Versuchen wurde gezeigt, dass proteolytische Spaltung von α - und γ ENaC die Aktivität des Kanals erhöht (HUGHEY et al. 2004, BRUNS et al. 2007, HARRIS et al. 2007). Daher lag es nahe, das anti-GBM-Mausmodell ebenfalls auf eine erhöhte Aktivität des ENaC hin zu untersuchen.

Als ein weiteres Ziel der Arbeit sollten auch Schnittstellen in künstlichen Peptiden aus α - und γ ENaC als Hinweis auf zugrunde liegende, bei Proteinurie in den Tubulusharn gefilterte Plasmaproteasen, identifiziert werden.

3 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden, soweit nicht anders angegeben, am Institut für Vegetative Anatomie der Charité in Berlin-Mitte durchgeführt.

3.1 Lösungen, Puffer und Medien

ABTS-Stammlösung: 100 mg ABTS (Diammonium-2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin]-6-sulfonsäure) in 10 ml Inkubationspuffer.

Acridinorangepuffer: 6 μ M Acridinorange, 240 mM Mannitol, 20 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, pH 7,5, eingestellt mit N-Methyl-D-glucamin.

Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer, 5X: 400 mM Tris-Base, 1,042 % Essigsäure (v/v), 10 mM EDTA, 60 % Glycerin (v/v), 0,05 % Bromphenolblau Na-Salz (w/v).

Aufkonzentrierungspuffer: 17,54 mM $NaH_2PO_4 \times 1 H_2O$, 1,96 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, pH 6.

BBM-Suspensionspuffer: 280 mM Mannitol, 5 mM MES, 2 mM $MgCl_2$, pH 5,5, eingestellt mit N-Methyl-D-glucamin.

Beschichtungspuffer: 50 mM Na_2CO_3 , pH 9,5.

Blockierungspuffer: 0,1 M $NaHCO_3$, 0,5 M NaCl, 0,2 M Glycin, pH 8,3.

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

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

ELISA-Waschpuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 3 mM NaN_3 , pH 7,2.

Elutionspuffer I: 200 mM Glycin, 150 mM NaCl, 0,1 % BSA (w/v), pH 2,5.

Elutionspuffer II: 200 mM NaHCO_3 , pH 9.

Fixierlösung: 100 mM Kakodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat, 100 mM Saccharose, 4 % HAES (v/v), 3,24 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3% PFA (v/v), pH 7,4.

Hämalaun nach MAYER: 0,1 % Hämatoxylin (w/v), 0,02 % Natriumiodat (w/v), 5 % Kalialaun (w/v), 5 % Chloralhydrat (w/v), 0,1 % Zitronensäure-Monohydrat (w/v),

Homogenisierungspuffer: 250 mM Saccharose, 10 mM Triethanolamin, pH 7,5.

Inkubationslösung: 9 ml Inkubationspuffer, 1 ml ABTS-Stammlösung, 1 μl H_2O_2 (30%).

Inkubationspuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$, 100 mM Natriumacetat-Trihydrat, pH 4,2.

Isolationspuffer: 150 mM D-Mannitol, 5 mM EGTA, 16 mM HEPES, 10 mM Tris-Base, pH 7,5.

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,3.

Kryoschnitt-Nachfixierlösung, 800 mosm: 100 mM Kakodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat, 600 mM Saccharose, pH 7,4.

LAEMMLI-Puffer, 2X: 95 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % Glycerin (v/v), 5 % 2-Mercaptoethanol (v/v), 0,003 % Bromphenolblau (w/v), pH 6,8.

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

LB-Flüssigmedium: 1 % Bacto-Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 1 % NaCl (w/v).

Matrixlösung: 59,82 % Acetonitril (v/v), 39,88 % H₂O (v/v), 0,3 % TFA (v/v), 500 % umkristallisierte α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (w/v).

MgCl₂-Resuspensionspuffer: 150 mM D-Mannitol, 2,5 mM EGTA, 6 mM Tris-Base, 12 mM MgCl₂ x 6 H₂O, pH 7,5.

Nachbeschichtungslösung: 1 mg/ml Hämoglobin in ELISA-Waschpuffer.

Paraffinschnitt-Nachfixierlösung, 300 mosm: 100 mM Kakodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat, 100 mM Saccharose, 0,02 % Natriumazid (v/v), pH 7,4.

PBS: 137 mM NaCl, 11,409 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,764 mM KH₂PO₄, 2,683 mM KCl, pH 7,4.

PBS/Glycerin: 33 % PBS (v/v), 67 % Glycerin (v/v), pH 8,6.

Peroxidaseblock-Lösung: 90 % Methanol (v/v), 3 % H₂O₂ (v/v).

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

Stopplösung: 15 mM NaN₃ in PBS.

TAE-Puffer, 1X: 40 mM Tris-Base, 0,1042 % Essigsäure (v/v), 1 mM EDTA.

Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, pH 8,3.

Vorspüllösung, 300 mosm: 100 mM Kakodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat, 100 mM Saccharose, 4 % HAES (v/v), pH 7,4.

Zitratpuffer: 1,82 mM Zitronensäure-Monohydrat, 8,194 mM tri-Natriumzitat-Dihydrat, pH 7,5.

Zweitantikörperlösung: 1 mg/ml Hämoglobin in PBS.

3.2 Versuchstiere

Für die physiologischen, molekularbiologischen, proteinchemischen und imminohistochemischen Analysen wurden 49 transgene weibliche Mäuse im Alter zwischen 12 bis 15 Wochen (Prof. Dr. Thomas Willnow, Max Delbrück-Center für Molekulare Medizin in Berlin-Buch) mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 39 g verwendet. Eine Hälfte davon besaß den Genotyp *Megalin^{lox/lox}*, im Folgenden *Cre(-)* genannt, die andere Hälfte war doppelt transgen mit einem konditionellen partiellen *Megalin-knockout* in der Niere (*Megalin^{lox/lox}; apoE^{Cre}*) (LEHESTE et al. 2003) und wird nachfolgend als *Cre(+)* bezeichnet.

Die Versorgung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Futter. Alle Tierversuche erfolgten unter strikter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes unter Kontrolle des Berliner Senats (Reg G 0178/03).

3.2.1 Das anti-GBM-GN-Modell

Allen Mäusen wurde subkutan IgG aus Kaninchen in FREUNDS Adjuvans injiziert. Beide Genotypen wurden jeweils randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Nach sechs Tagen erfolgte bei 10 *Cre(-)*- und 9 *Cre(+)*-Tieren die Auslösung einer GN durch intravenöse Injektion von gegen die GBM der Maus gerichteten Antikörpern (polyklonaler Kaninchenantikörper, freundlichst überlassen von Michel Le Hir, Zürich, Schweiz) (LE HIR et al. 1998). Die unbehandelten Tiere bekamen lediglich PBS als Vehikel gespritzt. Die Tierexperimente wurden bei einer Proteinurie von 10-15 mg/24 h bei den GN-Gruppen und parallel bei den unbehandelten Tieren beendet.

Tab. 1: Einteilung der *Cre(-)* und *Cre(+)*-Mäuse in Gruppen mit oder ohne anti-GBM-GN

ohne Behandlung		mit anti-GBM-GN	
<i>Cre(-)</i>	<i>Cre(+)</i>	<i>Cre(-)</i> /GN	<i>Cre(+)</i> /GN
ohne Proteinurie	konditioneller partieller Megalin- <i>knockout</i> , tubuläre Proteinurie	glomeruläre Proteinurie	konditioneller partieller Megalin- <i>knockout</i> , tubuläre und glomeruläre Proteinurie

3.3 Physiologische Analysen

3.3.1 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessungen an den Mäusen wurden von Dr. Mauricio Sendeski am Institut für Physiologie der Charité, Berlin-Mitte, durchgeführt. Am Ende des Tierexperiments wurden Katheter in die rechte Femoralarterie eingeführt. Blutdruckmessungen wurden 24 h nach Eingriff in wachen, nicht eingespannten Mäusen durchgeführt (STAUSS et al. 1999). Die Tiere wurden während der Zeit der Aufnahme beobachtet. Sobald eine fünfminütige artefaktfreie Messung vorlag, wurde sie beendet.

3.3.2 Analyse von Urin- und Plasmaparametern

Zur Urinanalyse wurden die Mäuse einen Tag vor Auslösung der GN sowie wöchentlich ab dem 12. Tag jeweils 24 h lang einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Die Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid in Serum und Urin wurden über indirekte ionenselektive Elektrodenmessungen ermittelt (Modular Analytics, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Osmolalität wurde mit Hilfe eines Osmometers gemessen (Gonotec, Berlin). *Blood urea nitrogen*- und Kreatininkonzentrationen wurden enzymatisch und durch die kinetische Jaffé-Methode (Modular Analytics, Roche Diagnostics) quantifiziert. Kreatinin-Clearance und fraktionelle Natriumexkretion wurden nach Standardgleichungen berechnet. Die Messung der Gesamtproteinkonzentrationen in Serum und Urin und die Albumin-, Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Serum erfolgte mit standardisierten Autoanalyser-Methoden (Hitachi 747, Hitachi 911, und STA Analyzer, Roche Diagnostics). Die Plasma-Aldosteronmessung der Mäuse wurde von Boye

Jensen (Department of Physiology and Pharmacology, Odense, Dänemark) mit einem kommerziellem Radioimmunassay (Coat-A-Count, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) durchgeführt.

3.4 Perfusionsfixierung, Organentnahme und Gewebeaufbereitung

Am Ende des Tierexperiments wurden die unbehandelten sowie die anti-GBM-GN-Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Nembutal (0,06 mg/g Körpergewicht) anästhesiert (Fagron, Barsbüttel) und laparotomiert. Für molekularbiologische und proteinchemische Analysen wurden von 6-7 Mäusen pro Gruppe die Nieren entnommen, entkapselt, gewogen, schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Später erfolgte mit einem sterilen Skalpell im Kryostaten bei -20 °C Umgebungstemperatur eine Trennung in kortikale und medulläre Anteile. Die aufgetrennten Gewebe wurden mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff feingemahlen und anschließend zur mRNA- bzw. Proteinisolation weiter verarbeitet.

Für die morphologische Analyse wurden die Nieren von 3 Mäusen pro Gruppe perfusionsfixiert. Dazu wurde die *Aorta abdominalis* freipräpariert, aufgeschnitten und ein ausgezogener Polyethylenschlauch eingeführt. Zum Druckausgleich erfolgte die Eröffnung der *Vena cava caudalis*. Die retrograde Perfusion begann mit Vorspüllösung für 30 Sekunden, anschließend erfolgte die Perfusion mit Fixierlösung für 5 min bei konstantem Druck von 180 mmHg. Die Perfusion erfolgte durch Dr. Franziska Theilig. Danach wurden die fixierten Nieren entnommen, halbiert und in Nachfixierlösungen übertragen. Um Gefrierartefakte in Geweben für Kryoschnitte zu vermeiden, wurden für die Kryokonservierung bestimmte Gewebe nach Entnahme über Nacht bei 4 °C in Kryoschnitt-Nachfixierlösung immmergiert, in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Paraffinschnitte bestimmte Gewebe wurden über Nacht bei 4 °C in Fixierlösung stehen gelassen und im Institut für Pathologie der Charité, Berlin-Mitte, eingebettet. Dort wurden die Nieren in Paraffinschnitt-Nachfixierlösung gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (1x 50%, 2x 75 %, 1x 90%, 2x 96%, 3x 100%, für je 1 h). Die Gewebeblöcke wurden über Nacht sowie zweimal für je 1 h bei 40 °C in Zedernholzöl eingelegt, dreimal 2 h bei 58 °C Paraffin-behandelt, eingekapselt, mit Paraffin ausgegossen und bei -20 °C gelagert.

3.5 Molekularbiologische Analysen

3.5.1 mRNA-Extraktion

Die Extraktion der mRNA erfolgte aus in Stickstoff feingemörsertem, kortikalem Nierengewebe (15 µg) mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Mithilfe eines spezialisierten Puffersystems mit hohem Salzgehalt (Guanidinthiocyanat) kann eine erhöhte Ausbeute von mRNA (> 200 Basen) auf eine Membran aus Siliziumdioxid gebunden werden. Zusätzlich erfolgte der Verdau der genomischen DNA (RNase-Free DNase Set, QIAGEN). Alle Zentrifugations- und Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (Tischzentrifuge 2405, Andreas Hettich, Tuttlingen).

Die Homogenisierung der Proben erfolgte in 1:100 mit β-Mercaptoethanol versetztem Gewebelysepuffer RLT unter Zentrifugation durch eine QIAshredder-Säule (QIAGEN) (2 min, 18.000 x g). Im Durchfluss erhaltenes Lysat wurde erneut zentrifugiert (2 min, 18.000 x g) und der resultierende Überstand mit 70%igem Alkohol in gleichen Volumina gemischt. Durch nochmalige Zentrifugation der Proben (15 Sekunden, 9.500 x g) wurde die mRNA auf eine RNeasy *spin column* (QIAGEN) gebunden. Diese wurde nach Auftragen von Waschpuffer RW1 auf die Säule zentrifugiert (15 Sekunden, 9.500 x g). Anschließend erfolgte die Inkubation mit DNase I in Verdünnungspuffer RDD für 15 min. Nach einem nochmaligem Waschschrift mit RW1 erfolgte nach Auftragen des Waschpuffers RPE zur Vorbereitung der Elution eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 9.500 x g. mit anschließendem Trocknen der Säule für 2 min bei 18.000 x g. Zuletzt erfolgte die Elution der mRNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser. Die mRNA-Konzentration wurde von 1:100 in RNase-freiem Wasser verdünnten Proben photometrisch ermittelt (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg).

3.5.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Mit der extrahierten mRNA erfolgte durch reverse Transkription mit Hilfe eines cDNA-Synthese-Kits (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for reverse transcription-PCR, Invitrogen, Karlsruhe) in 20 µl-Ansätzen. Ca. 0,8 µg RNA, 0,5 µg Oligo dT Pri-

mer Mix und 10 mM dNTPs wurden 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden 20 % 5X RT-Puffer, 0,1 mM DTT, 1 µl RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, 40 U/µl) hinzugegeben und der Ansatz 2 min bei 42 °C inkubiert. Reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase (SuperScript™, 50 U/µl) 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C. Die erhaltenen *first strand*-cDNA-Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

Um Qualität und Menge der Maus-cDNA für eine TaqMan-Analyse zu überprüfen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) als unverändertes Referenzgen durchgeführt. Die 25 µl-Ansätze (10 % [v/v] 10X farbiger Reaktionspuffer für MangoTaq® DNA-Polymerase [Bioline, Luckenwalde], 10 mM dNTPs [Bioline, Luckenwalde], 10 µM *Gapdh forward*-Primer [5'-tat ccg ttg tgg atc tga c-3', TIB MOLBIOL, Berlin], 10 µM *Gapdh reverse*-Primer [5'-tgg tcc agg ggt ttc tta c-3', TIB MOLBIOL, Berlin], 50 µM MgCl₂ [Bioline, Luckenwalde], ca. 2,5 µg cDNA, 0,5 µl MangoTaq® DNA-Polymerase [Bioline, Luckenwalde, 5 U/µl]) wurden zu Beginn 5 min bei 94 °C im Thermocycler (Primus 96 plus, MWG-Biotech, Ebersberg) erhitzt. Dann erfolgten in 30 Zyklen je 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Primerhybridisierung bei 58 °C und 30 Sekunden Elongation bei 72 °C. Noch unvollständige DNA-Fragmente wurden 7 min durch finale Elongation bei 72 °C ergänzt. Die PCR-Produkte wurden in 5X Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit 0,008 % (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen. Als Referenz diente eine DNA-Leiter (Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix, Fermentas, St. Leon-Rot) mit Produkten bekannter Basenpaarlängen. Die Elektrophorese lief ca. 30 min bei 90 Volt in 1X TAE-Puffer bis zur ausreichenden Probenauftrennung und zum Erreichen der Lauffront am Ende des Gels. Abschließend wurden die DNA-Banden unter ultraviolettem Licht visualisiert (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

3.5.3 TaqMan® real-time quantitative PCR

Es wurden TaqMan®-Genexpressions-Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zur Analyse der Zielgene *Slc9a3* (für NHE3, Produkt ID Mm01352473_m1), *Slc34a1* (für NaPi-IIa, Produkt ID Mm00441450_m1), *Aqp1* (Produkt ID Mm00431834_m1) und des Referenzgens *Gapdh* (Produkt ID Mm03302249_g1) ver-

wendet. Alle Proben wurden in 15 µl-Triplets auf eine auf einem Eisblock (-20 °C) gekühlte 96-Well-Platte aufgetragen (50 % 2X FAST Universal PCR Master Mix, 5 % [v/v] 20X Gene Expression Assay Mix für *Slc9a3/Slc34a1/Aqp1*, 5 % [v/v] 20X Gene Expression Assay Mix für *Gapdh*, ca. 0,1 µg cDNA) und mit Klebefolie verschlossen. Die Proben wurden in 45 Zyklen mit 3 Sekunden Denaturierung bei 95 °C und 30 Sekunden Primerhybridisierung und Elongation bei 60 °C vervielfältigt (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Die Gensonden waren neben den Reporterfluoreszenzfarbstoffen FAM (6-Carboxyfluorescein für *Slc9a3/Slc34a1/Aqp1*, Emission bei 518 nm [grün]) und VIC (geschützter Markenfarbstoff von Applied Biosystems für *Gapdh*, Emission bei 550 nm [grün]) auch mit einem Quencher, TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin, Emission bei 582 nm [gelb]), markiert. Als passiver Referenzfarbstoff diente ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin, Emission bei 602 nm [orange]) zum Herausmitteln eventueller Pipettierfehler. Nach Anregung bei 488 nm (blau) erfolgte am Ende jedes Zyklus die Messung der zunehmenden Fluoreszenz mit Hilfe der Applied Biosystems Sequence Detection Software. Für Referenz- und Zielgen wurden pro Probe *crossing point* (Ct)-Werte ermittelt. Sie geben denjenigen PCR-Zyklus an, bei dem eine definierte Fluoreszenzschwelle in der exponentiellen Phase der cDNA-Synthese überschritten wird. Datenquantifizierung und Auswertung erfolgten mit Hilfe von Applied Biosystems Sequence Detection Software und Microsoft Excel unter Verwendung der ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)-Methode (PFAFFL 2004).

3.6 Proteinchemische Analysen

3.6.1 Zellfraktionierung

In flüssigem Stickstoff feingemörsertes kortikales Mäusenierengewebe wurde in 15 ml Isolationspuffer, medulläres Mäusenierengewebe wurde in 0,5 ml Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitor (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, 1 Tablette/50 ml) aufgenommen und Ultraschall-homogenisiert (Sonocator UW 70, Bandelin electronic, Berlin).

Aus dem kortikalem Nierengewebe wurde die BBM-Fraktion und aus kortikalem und medullärem Nierengewebe die PM-Fraktion gewonnen. Die Zellfraktionierungen erfolgten durch bis zu vier Zentrifugationsschritte, bei denen mehrfach Überstände (Ü1-

Ü4) und Pellets (P1-P4) voneinander getrennt wurden. Alle Zentrifugationsschritte bis 18.000 x g erfolgten bei 4 °C (Tischzentrifuge 2405, Andreas Hettich, Tuttlingen), Ultrazentrifugationen bei 4 °C mit der Ultrazentrifuge 1 (Optima L-100 XP, Rotor Type 70 Ti, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) oder Ultrazentrifuge 2 (J2-H8, Rotor JA-20, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). Resuspensionsschritte erfolgten mit dem Ultraschall-Homogenisator (Sonocator UW 70).

Die Präparation der BBM-Fraktion aus kortikalem Nierengewebe der Maus wurde unter Anwendung einer zweistufigen Magnesium-Präzipitationstechnik und Differentialzentrifugation durchgeführt (nach BIBER et al. 1981). Von in Isolationspuffer gelöstem Kortexhomogenat der Mäuse wurde 1 ml für die Isolierung der kortikalen PM-Fraktion abgenommen. Zum übrigen Ansatz wurden 10 ml einer wässrigen MgCl₂-Lösung (4 °C) bis zu einer Konzentration von 12 mM gegeben. Nach 15 min auf Eis erfolgte die erste Zentrifugation (1.000 x g, 15 min). Ü1 wurde abgenommen und P1 (Präzipitat mit Zellkernen) verworfen. Im zweiten Zentrifugationsschritt wurde Ü1 ultrazentrifugiert (40 min, 40.000 x g, Ultrazentrifuge 2). Ü2 wurde verworfen, P2 in 10 ml 12 mM MgCl₂-Resuspensionspuffer homogenisiert und für 15 min auf Eis belassen. Danach erfolgte die dritte Zentrifugation (1.000 x g, 15 min). P3 (Präzipitat) wurde verworfen und Ü3 ultrazentrifugiert (30.000 x g, 40 min, Ultrazentrifuge 2). Ü4 wurde verworfen und P4, die aufgereinigte BBM-Fraktion, in 200 µl MgCl₂-freien Isolationspuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Die abgenommenen 1 ml der Kortexhomogenate und die 0,5 ml Medullahomogenate der Mäuse wurden zentrifugiert (10 min, 1000 x g) und P1 (Zellkerne) verworfen. Ü1 wurde einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen (30 min, 18.000 x g). P2, die PM-Fraktion, wurde in 50 µl Isolationspuffer aufgenommen, resuspendiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Gesamtzellhomogenate und Zellfraktionen wurden mit einem kolorimetrischen Proteinassay auf Grundlage der Biuret-Reaktion und mit Hilfe von Bicinchoninsäure (Micro BCA Protein Assay reagent Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt. Nach Inkubation von 1:10 verdünnten Proben mit den Reagenzien bei

60 °C für 10 min und nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der Extinktion aller Proben bei 560 nm mit einem Mikroplatten-Photometer (Expert 96, DEELUX, Gödenstorf). Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit Hilfe einer linearen Verdünnungsreihe von BSA (Micro BCA Protein Assay reagent Kit, 0 - 2 µg/µl). Zur nochmaligen Kontrolle der ermittelten Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit 5 µg der Proben mit der linearen BSA-Verdünnungsreihe eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting

Nach Zugabe von 2X LAEMMLI-Puffer wurden die Proteine aus den Gesamtzellhomogenaten und Zellfraktionen sowie die Proteine aus dem Mausurin 3 min bei 96 °C gelöst. SDS-PAGE wurde mit 8-12 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Molekülmasse wurde mit einem Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit Produkten bekannter Größe bestimmt. Verwendet wurden weiterhin Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Hercules, CA, USA) und Elektrophoresepuffer. Der elektrophoretische Proteintransfer vom Gel auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte im *tank-sandwich*-System (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Hercules, CA, USA) mit Transferpuffer unter Kühlung des gesamten Systems. Gleichmäßigkeit des Ladens und des Blottens der Proteine wurde durch Anfärbung der Membranen mit 0,1 % (w/v) Ponceau-Rot überprüft. Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 5 % Magermilchpulver in PBS für 30 min. Danach wurden die Membranen mit Primärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 4 °C über Nacht. Die Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (1:3000) erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Immunreaktive Banden wurden mit Hilfe von Chemilumineszenz unter Verwendung eines *enhanced chemiluminescence kit* (Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg) detektiert. Nach einminütigem Benetzen der Membranen mit Luminolreagenz erfolgte in einer Dunkelkammer die Inkubation mit Autoradiographiefilmen (Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film, GE Healthcare) sowie Belichtung und Entwicklung der Filme. Zur densitometrischen Auswertung der resultierenden Banden wurden die Filme bei

600 dpi eingescannt und analysiert (Bio-Profil Bio1D, Vilber Lourmat Biotechnology, Marne-la-Vallée, Frankreich).

3.6.4 NHE-Aktivitätsmessung

Die NHE-Aktivitätsmessung wurde von Herrn Carsten Wagner am Institut für Physiologie in Zürich durchgeführt. Die NHE-Aktivität wurde als pH-Wert-Änderung in BBM-Vesikeln mit Hilfe der Acridinorange-Fluoreszenzlöschungs-Methode (nach BOBULESCU et al. 2008 und CASSANO et al. 1984) gemessen. Renale kortikale BBM-Vesikel wurden mit Hilfe der zweistufigen Magnesium-Präzipitationstechnik und Differentialzentrifugation isoliert (nach BIBER et al. 1981) und in BBM-Suspensionspuffer gelöst. Eine auf 25 °C beheizte Küvette wurde mit 2 ml Acridinorange-puffer gefüllt. Acridinorange wurde bei 493 nm angeregt und die Emission der Fluoreszenz bei 530 nm mit einem Spektralfluorimeter (RF-5000, Shimadzu, Duisburg) detektiert. Das Experiment begann mit einer Injektion von 30 µl in BBM-Suspensionspuffer gelösten Vesikeln in die 2 ml Acridinorange-puffer, was eine rasche Löschung der Fluoreszenz bewirkte. Nach 60 Sekunden Äquilibration wurden 80 µl 2 M Natriumgluconat hinzugegeben. Die NHE-Aktivität wurde über die anfängliche Zunahmerate der Fluoreszenz nach Zugabe von Na⁺ zur Küvette ermittelt. Alle Messungen wurden mindestens im Doppelansatz mit BBM-Vesikeln aus zwei Tieren pro Einzelmessung durchgeführt und zwei- bis viermal wiederholt. Die Isoform NHE3 wurde spezifisch mit 100 µM des NHE3-spezifischen Inhibitors 5-(N-Ethyl-N'-isopropyl)-amilorid (EIPA) geblockt.

3.7 Morphologische Techniken

3.7.1 Immunhistochemie

Auf Objektträger aufgezogene Paraffinschnitte (4 µm) wurden in Xylol entparaffiniert und danach in aufsteigender Ethanolreihe rehydriert. Anschließend erfolgte eine Antigenmaskierung durch 6-minütige Hitzebehandlung in Zitratpuffer und kurzes Abkühlen in PBS. Kryoschnitte (5 µm) wurden ebenfalls auf Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet, 30 min in 0,5 % [v/v] Triton X-100 inkubiert und gründlich in PBS ge-

waschen. Wurde als Sekundärantikörper HRP-gekoppelter Antikörper benutzt, erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte mit Peroxidaseblock-Lösung und anschließender Waschung in PBS. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden alle Schnitte für 30 min mit 5 % (w/v) Magermilch in PBS bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler, anschließend über Nacht bei 4 °C. Nach Waschen der Schnitte in PBS wurden sie 30 min entweder mit HRP- (DAKO, Hamburg) (1:75) oder Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (Dianova, Hamburg) (1:250) überschichtet. Nach nochmaligem Waschen der Schnitte in PBS erfolgte die Entwicklung eines enzymatischen Signals mit 0,1% DAB (Kem-EN-Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark) und 0,02 % H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in PBS. Bei HRP/Cy3-Doppelfärbungen erfolgten zunächst die Inkubationen mit Primär- und HRP-Sekundärantikörpern und Signalentwicklung, dann die Inkubationen mit zweiten Primär- und Cy3-Sekundärantikörpern. Die Spezifität der Doppelfärbungen wurde durch Parallelinkubation von Folgeschnitten überprüft, wobei jeder nur mit einem einzigen Antikörpertyp inkubiert wurde. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun nach MAYER ca. 5 Sekunden gegengefärbt, die Gewebsschnitte anschließend 5 min mit kaltem, fließenden Leitungswasser gebläut und in PBS/Glycerin eingedeckelt. Analyse und Fotografie erfolgte mit einem Leica DMRB Mikroskop (Leica, Wetzlar) mit Fluoreszenzlampe (ebq 100, Nikon, Düsseldorf), digitaler Kamera (PT slider SPOT, Visitron Systems, Puchheim) und MetaView-Software (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA).

3.7.2 Verwendete Antikörper

Folgende zuvor gut charakterisierte Primärantikörper für Immunoblotting und Immunhistochemie wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet: polyklonale Meerschweinchenantikörper gegen Megalin (gegen eine C-terminale Peptidsequenz, Pineda Antikörperservice, Berlin), polyklonale Kaninchenantikörper gegen AQP1 (BD Biosciences, Heidelberg), polyklonale Kaninchenantikörper gegen NaPi IIa (gegen eine N-terminale Peptidsequenz, Pineda Antikörperservice, Berlin, Serum und affinitätsgereinigt), monoklonale Mausantikörper gegen NHE3 (Chemicon, Temecula, CA, USA), polyklonale Kaninchenantikörper gegen NHE3 (Biotrend, Köln), polyklonale Kaninchenantikörper gegen AQP2 (Gabe von Dr. Enno Klußmann, Berlin), polyklonale Kaninchenantikörper gegen phospho-NKCC2 (Peptid-Antikörper, Pineda Antikörperser-

vice, Berlin), polyklonale Meerschweinchenantikörper gegen NKCC2 (gegen eine N-terminale Peptidsequenz, Pineda Antikörperservice, Berlin), monoklonale Mausantikörper gegen α Na,K-ATPase (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), monoklonale Mausantikörper gegen β -Actin (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen), polyklonale Kaninchenantikörper gegen Vitamin-D-bindendes Protein (freundlichsten überlassen von Prof. Dr. Thomas Willnow, Berlin), monoklonale Mausantikörper gegen Renin (freundlichsten überlassen von Prof. Dr. Armin Kurtz, Regensburg) und polyklonale Kaninchenantikörper gegen COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, affinitätsgereinigt). Serum- und affinitätsgereinigte polyklonale Kaninchenantikörper gegen ein N-terminales Glutathion-S-Transferase (GST)- α ENaC-Fusionsprotein und gegen C-terminale GST- β ENaC- und GST- γ ENaC-Fusionsproteine wurden in Kooperation mit Pineda Antikörperservice, Berlin, im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt.

Als HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (Dako, Hamburg) dienten polyklonale Ziegenantikörper gegen Maus IgG, polyklonale Kaninchenantikörper gegen Meerschweinchen IgG und polyklonale Schweineantikörper gegen Kaninchen IgG. Cy3-fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) waren polyklonale Eselantikörper gegen Meerschweinchen IgG und polyklonale Eselantikörper gegen Kaninchen IgG. Zum Nachweis von COX-2 wurde ein Amplifikationskit mit biotinyliertem Antikörper gegen Kaninchen IgG und Streptavidin-Peroxidase benutzt (Catalyzed Signal Amplification System, Dako, Hamburg).

3.7.3 Quantifizierung des COX-2 und Renin-Gehaltes

Immunhistochemische Signale wurden semiquantitativ am Leica DMRB Mikroskop mit 20- und 40-fachem Objektiv ausgewertet, um die COX-2 bzw. Reninexpression zu untersuchen. Es wurden die Mittelwerte reninpositiver Signale oder COX-2-positiver MD-Zellen am juxtaglomerulären Apparat innerhalb eines Bereichs von durchschnittlich 100 bis 150 angeschnittenen Glomeruli bestimmt (THEILIG et al. 2002).

3.8 Datenquantifizierung und statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS for Windows, Version 12.0. Die quantifizierten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Zur Berechnung potentieller Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig) verwendet. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ angesehen. Ein Stern (*) zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen *Cre(+)* und *Cre(-)*-Mäusen an, eine Raute (#) zwischen un-behandelten und an GN erkrankten Mäusen.

3.9 Produktion von Antikörpern gegen den epithelialen Natriumkanal

3.9.1 Expression rekombinanter GST-ENaC-Fusionsproteine in *E. coli*

Unter Verwendung des bakteriellen Expressionsvektors pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurden drei verschiedene GST-Fusionsproteine hergestellt. Diese enthielten das komplette aminoternale Ende aus der α -Untereinheit des ENaC (NCBI Referenzsequenz NP_035454.1) mit der Aminosäuresequenz 1-78 oder das vollständige carboxyterminale Ende aus β - (NP_035455.1) bzw. aus γ ENaC (NP_035456.1) mit den Aminosäuresequenzen 557- 638 (82 Aminosäuren) bzw. 576- 655 (80 Aminosäuren). In den Überhängen der synthetisierten Primer (α ENaC: 5'-gat gaa ttc atg ctg gac cac acc aga g-3', 5'-gat gcg gcc gcg cgg tgg aac tcg atc agt-3'; β ENaC: 5'-gat gaa ttc tgc aaa ggc ctg cgc agg-3', 5'-gat gcg gcc gcg atg gcc tcc acc tca ct-3'; γ ENaC: 5'-gat gaa ttc aag gat tgg tgg gcc cgt a-3', 5'-gat gcg gcc get tag aac tca ttg gtc aac tga-3', Metabion, Martinsried) für die 234, 246 bzw. 243 bp großen Fragmente waren EcoRI- (G↓AATTC) und NotI- (GC↓GGCCGC) Schnittstellen kodiert. 3 μ g cDNA einer Wildtyp-Mausniere wurde für eine 50 μ l-PCR-Reaktion mit 10 % (v/v) 10X PCR-Puffer, 15 mM MgCl₂, 10 mM dNTP-Mix, je 10 μ M der *forward*- und *reverse*-Primer und 0,4 μ l AmpliTaq[®]DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 5 U/ μ l) verwendet. Amplifikation der Fragmente erfolgte im Thermocycler (Primus 96 plus, MWG-Biotech, Ebersberg) in 35 Zyklen mit folgendem Programm: 5 min Initialzyklus bei 94 °C, je 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, je 45 Sekunden

Primerhybridisierung bei 58 °C, je 45 Sekunden Elongation bei 72 °C und abschließend 7 min terminale Elongation bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden zur visuellen Größenkontrolle auf ein 1,5%iges Agarosegel mit 0,008 % (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen, unter ultraviolettem Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim). Der Restriktionsverdau zur Linearisierung des Vektors und Erzeugung von *sticky ends* in allen Fragmenten erfolgte über Nacht bei 37 °C mit 10 % (v/v) 10X Restriktionspuffer „Orange“ und 10 U/μl der Restriktionsendonukleasen EcoRI und NotI (Fermentas, St. Leon-Rot). Nach Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel und Aufreinigung der Fragmente (High Pure PCR Template Preparation Kit) erfolgte die Ligation zum jeweiligen Plasmid mit Hilfe von 10 % (v/v) 10X DNA-Ligasepuffer und 1 μl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, 400 U/μl) in jeweils 12 μl-Ansätzen für 4,5 h bei Raumtemperatur. Mit den erhaltenen Plasmiden erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli* (XL-1 Blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf Eis. Nach einer Stunde wurden die Bakterien auf mit 50 μg/ml Ampicillin versetzten LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Überlebende Bakterienklone hatten aufgrund erfolgreich integrierter Plasmide eine Ampicillinresistenz erworben. Diese wurden in LB-Flüssigmedium mit 50 μg/ml Ampicillin 16 h bei 37 °C vermehrt, ihre Plasmide isoliert (NucleoSpin® Plasmid Kit, Macherey-Nagel, Düren) und durch direkte DNA-Sequenzierung verifiziert (Dr. Martin Meixner GmbH, Berlin). Die Transformation auf Proteinexpression spezialisierter kompetenter *E. coli* (BL21, Stratagene) erfolgte mit fehlerfreien Plasmiden auf Eis und mit anschließendem Hitzeschock (42 °C, 90 sek). Nach kurzem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe von eisgekühltem SOC-Medium. Die Bakterien regenerierten 50 min bei 37 °C, wurden auf LB-Agar (50 μg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Überlebende Klone wurden in ampicillinhaltigem LB-Flüssigmedium bis zu einer optimalen optischen Dichte (ca. 0,5 bei 600 nm) vermehrt, und zur Expression der rekombinanten GST-Fusionsproteine das LacI-Operon mit 0,1 mM IPTG (Fermentas, St. Leon-Rot) aktiviert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Bakterien 10 min bei 4 °C und 10.000 x g abzentrifugiert und die Pellets bei -20 °C eingefroren.

3.9.2 Isolation und Aufreinigung der rekombinanten GST-ENaC-Fusionsproteine

Zur Isolation der rekombinanten Proteine wurden die Bakterienpellets bei 4 °C in PBS gelöst, mit 2 mM EDTA (Serva, Heidelberg) und 1 mM PMSF (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und die Bakterien unter Ultraschall aufgeschlossen. Die Homogenate wurden mit 1 % (v/v) Triton X-100 versetzt, 1 Stunde bei 4 °C inkubiert und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Überstände mit den herausgelösten Proteinen wurden affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Agarose-Säule (Sigma-Aldrich, München) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und mit 10 mM Glutathion eluiert. Erhaltene Eluate wurden über Nacht in PBS dialysiert. Für β ENaC erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt durch Elektroelution. Dafür wurde das Protein auf 10%ige Acrylamidgele geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie-Blau-gefärbt. Die spezifische Bande wurde ausgeschnitten und zerkleinert, in Elektroelutionspuffer über Nacht bei 100 Volt und 4 °C in einer Biotrap[®]-Kammer (Schleicher & Schuell, Dassel) eluiert und nochmals über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Micro BCA Protein Assay reagent Kit (Pierce) und einer linearen Verdünnungsreihe aus zugehörigem BSA (0 - 2 μ g/ μ l). Zur visuellen Größenkontrolle wurden 10 μ l der Proteinlösungen auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel geladen und nach SDS-PAGE mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt.

3.9.3 Antiseren aus Kaninchen und Affinitätsreinigung

Die mithilfe des pGEX-Expressionssystems hergestellten GST-ENaC-Fusionsproteine wurden an Pineda Antikörperservice, Berlin, übergeben und zur Immunisierung von 4 bis 5 Monate alten *New Zealand White* Kaninchen nach Standardprotokollen (HARLOW & LANE 1988) verwendet. Für jede Untereinheit wurden jeweils zwei Tiere verwendet. Eine Grundimmunisierung pro Tier erfolgte intradermal mit 80-160 μ g Protein. Am 60. und 90. Tag nach Immunisierung wurden Auffrischimpfungen mit jeweils der gleichen Menge Protein vorgenommen, am 120. Tag nach Immunisierung erfolgten Ausbluten der Tiere und Dekomplementierung der Seren. Zuvor entnommene Präimmunsereen wurden bei uns ausgetestet und zeigten keinerlei Kreuzreaktionen mit Nierenschnitten aus der Maus.

Die Affinitätsreinigung erhaltener Antiseren erfolgte in Zusammenarbeit mit Semanur Ünsal aus der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie and Molekulare Neuroanatomie

vom Institut für Integrative Anatomie der Charité, Berlin Mitte. 6 x 8 cm Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit je GST- α -, - β - oder - γ ENaC-Protein als spezifische Antigene (360-480 μ g in PBS) beladen. Nach Waschen wurden die freien Bindungsstellen mit 5 % (v/v) NGS in PBS 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Kaninchenseren vom 120. Immunisierungstag wurden 1:100 bis 1:200 in 5 % NGS in PBS verdünnt und mit den Nitrozellulosemembranen 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entnahme der Seren und Waschen der Membranen mit PBS erfolgte für 30 min die Elution mit Elutionspuffer I. Nach Elution wurden die aufgereinigten Antikörper über Nacht in Aufkonzentrierungspuffer dialysiert und am Folgetag durch Ionenaustausch-Chromatographie aufkonzentriert. Das Dialysat wurde mit einer Schlauchpumpe (Minipuls 3, Abimed, Langenfeld) bei einer Geschwindigkeit von 7 ml/h auf eine mit Aufkonzentrierungspuffer äquilibrierte SP-Sepharose Fast Flow-Säule (GE Healthcare Europe, Freiburg) geladen und bei gleicher Geschwindigkeit mit Elutionspuffer II in mehreren Fraktionen von der Säule eluiert.

Mithilfe des indirekten ELISA-Tests (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) wurden in den Eluaten die aktiven, antikörperhaltigen Fraktionen detektiert. Dafür wurden die rekombinanten GST- α -, - β - bzw. - γ ENaC-Fusionsproteine mit Konzentrationen von jeweils 20, 60 bzw. 60 μ g/ μ l in Beschichtungspuffer verdünnt, auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und über Nacht stehen gelassen. Als Standard wurde auf der Platte Kaninchen IgG in den Konzentrationen 1, 5 und 20 μ g/ml mitgeführt. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in Doppelansätzen. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine 60minütige Inkubation der 96-Well-Platte mit Nachbeschichtungslösung, um alle restlichen Bindungskapazitäten auf dem Untergrund abzusättigen. Danach wurde die Platte dreimal mit ELISA-Waschpuffer gespült und anschließend für 2 h mit in Nachbeschichtungslösung verdünntem Primärantikörper inkubiert (1:100 anti- α ENaC, 1:200 anti- β ENaC und 1:100 anti- γ ENaC). Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers der Peroxidase-gekoppelte Ziegenantikörper gegen Kaninchen (P-GaR, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:1000 in Zweitantikörperlösung aufgetragen und 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurde die Inkubationslösung hinzugegeben und die Peroxidaseaktivität nach 5 min mit Stopplösung beendet. Anschließend erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der Extinktion der Standards und der Eluatsfraktionen bei 405 nm (Expert 96, DEELUX, Gödenstorf).

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt, gegen PBS dialysiert, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Austestung der gewonnenen Antiseren erfolgte im Western Blot mit Maus-PM-Fractionen unter Peptidblockade mit den produzierten GST-ENaC-Fusionsproteinen.

3.10 Suche nach enzymatischen Schnittstellen in künstlichen Maus- α - und γ ENaC-Peptiden

Es sollte nach Hinweisen für spezifische Schnittstellen in den extrazellulären Schleifen der α - und γ ENaC-Untereinheit gesucht werden. Dafür erfolgte in Kooperation mit Prof. Hartmut Schlüter, am Institut für Biochemie der Charité, Berlin-Mitte, eine massenspektrometrische Analyse. Künstliche Peptide wurden mit auf aktivierten Affinitätsbeads immobilisiertem Sammelurin aus Mäusen mit einer niedermolekularen Proteinurie inkubiert und danach mit Hilfe der MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert (SCHLÜTER et al. 2003).

3.10.1 Inkubation der künstlichen Peptide mit immobilisiertem Sammelurin

ENaC wird durch proteolytische Spaltung extrazellulärer Domänen der α - und γ ENaC-Untereinheit aktiviert (HUGHEY et al. 2004, BRUNS et al. 2007). Um Schnittstellen für die in den Urin gefilterten Plasmaproteasen zu lokalisieren, wurden 9 bzw. 7 künstliche sequenzüberlappende Peptide mit je 25-26 Aminosäuren (AS), die Abschnitten aus der extrazellulären Schleife nahe des N-Terminus der α - bzw. γ ENaC-Untereinheit entsprachen, synthetisiert (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Diese wurden mit auf Affinitätsbeads immobilisiertem Sammelurin aus Mäusen inkubiert. Vollständige und gespaltene Peptide wurden mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektiert und mithilfe öffentlich verfügbarer Proteomik-Datenbanken und Software (MEROPS <http://merops.sanger.ac.uk>, RAWLINGS et al. 2010, ExPASy Proteomics tool Peptide cutter http://web.expasy.org/peptide_cutter/) nach bekannten Schnittstellen gesucht.

Tab. 2: Abschnitten der extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC entsprechende, synthetische Peptide.

α ENaC		γ ENaC	
AS-Positionen	AS-Sequenz	AS-Positionen	AS-Sequenz
S191-L215	ssytrqagrrrrstrdlrgalphpl	K91-T115	kldfpavticninpykysavsdlit
R217-N241	rlrtppppnparsarsasssvrdnn	S108-K132	savsdlitldidsetkqallslygvk
A301-H325	algsfiftcrfnqapcnqanysqfh	L125-R149	llslygvkdvidstprkreagsmr
N317-S341	nqanysqfhhpmgncytfnknns	R142-L166	rreagsmrstwegtpprflnipll
F335-L359	fnnknnsnlwmssmpgvnnglsitl	F159-R183	flnipllvfnenekgardfftgr
N352-R377	nnglsitlrteqndfipllstvtgar	A176-H200	ardfftgrkrkisgkiihkasnmh
L370-F394	lstvtgarvmvhgqdepafmddggf	H193-T217	hkasnmhvheskklvgfqlcsndt
A387-L411	afmddggfnvrpgvetsismrkeal		
I404-V428	ismrkealdslggnygdctengsdv		

Es wurden künstliche Peptide (25-26-mere), die Abschnitten aus den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC entsprachen, verwendet, um spezifische Schnittstellen zu charakterisieren, die durch Inkubation mit Urin aus Mäusen mit defizienter rezeptorvermittelter Endozytose (RME) entstehen können.

Nephrotischer Urin enthält gefilterte Plasmaproteasen, die den ENaC schneiden können (SVENNINGSSEN et al. 2009). Da hohe Mengen an anderen Proteinen die Effektivität der Plasmaproteasen beeinträchtigen können, wurde Urin aus Megalin-teildefizienten Mäusen verwendet, die eine niedermolekulare Proteinurie aufweisen (LEHESTE et al. 2003). Es wurde davon ausgegangen, dass hier die Konzentration filtrierter Plasmaproteasen relativ zum Gesamtprotein höher ist als in nephrotischem Urin. Dafür wurden 17 weibliche *Cre(+)*-Mäuse (Prof. Dr. Thomas Willnow, MDC Berlin-Buch) im Alter zwischen 4 und 8 Monaten über Nacht in Edelstahl-Stoffwechselkäfige (12,5 x 7 11,5 cm, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland) gesetzt, der Urin auf Eis aufgefangen, gesammelt und Zelltrümmer und Kristalle für 5 min bei 4500 x g und 4 °C abzentrifugiert (Heraeus® Labofuge® 400R, Fisher Scientific, Schwerte). Bromcyan-aktivierte Sepharosebeads mit 6 % Agarose (GE Healthcare, Freiburg) wurden für 30 min in 1 mM HCl gequollen, in *A. dest.* gewaschen, in Kopplungspuffer äquilibriert und in zwei Aliquots aufgeteilt. Zu einem Aliquot wurde der Mausurin (pH auf 8,3 eingestellt) gegeben, das andere Aliquot als Kontrollansatz entsprechend mit Kopplungspuffer aufgefüllt und beide Ansätze 2 h waagrecht auf einem Rotor bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Überstände wurden die Beads dreimal in *A. dest.* gewaschen und in je 200 μ l Blockierungspuffer äquilibriert. Nach Zugabe von je nochmals 1250 μ l Blockierungspuffer wurden beide Beadansätze 2 h waagrecht auf Rotor bei

Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Kontroll- und Urinansatz wurden je dreimal mit *A. dest.* gewaschen und in je 16 Aliquots à 30 µl aufgeteilt. Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 3,3 mM in HPLC-reinem *A. dest.* gelöst und zu den Beadansätzen bei einer Endkonzentration der Peptide von 100 µM gegeben. In den ersten viereinhalb Stunden erfolgte eine Inkubation bei 4 °C, danach bei Raumtemperatur. Probenentnahmen von 1 µl des gemischten Überstandes je Probe und Überführung in 9 µl 0,2%ige Ameisensäure erfolgten nach 0,5 h, 2,5 h, 6 h und 10 h. Ebenso wurden vollständige Peptide in einer Konzentration von 10 µM in HPLC-reinem Wasser gelöst. Die überführten Proben und gelösten vollständigen Peptide wurden bei -20 °C eingefroren.

3.10.2 Massenspektrometrische Analyse der Peptide (MALDI-TOF)

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden 0,4 µl Probenlösung mit 0,8 µl Matrixlösung gemischt und auf eine 144-Microtiter-Well Format Stahlplatte (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) aufgetragen. Eine externe Kalibrierung der Probenplatte erfolgte mit Standardpeptidgemisch (4700 Proteomics Analyzer Mass Standard Kit, Applied Biosystems) auf 6 Kalibrierungspunkten. Massenspektrometrie-Spektren wurden im positiven Reflektormodus in einem Bereich des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses von 800-4000 m/z an einem MALDI-TOF/TOF Instrument (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) mit einem 200 Hz Nd-YAG Laser (355 nm) aufgenommen. Es wurden 40 aufeinanderfolgende Laserschüsse auf 25 verschiedenen Positionen des Probenspots auf der Stahlplatte akkumuliert.

Die Analyse der Massenspektrometrie-Daten erfolgte mit Hilfe der Data Explorer 4.8 Software (Applied Biosystems). Mit Hilfe des ExpASY Proteomics Server erfolgte unter http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html die Berechnung des vollständigen Peptids sowie jedes theoretisch möglichen monoisotopischen, einfach geladenen Peptidfragments mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis von > 800 m/z. In den Urinansätzen gegenüber den Kontrollansätzen stark aufgetretene Peaks monoisotopischer, einfach geladener Teilchen wurden den Werten der theoretisch möglichen Peptidfragmente zugeordnet. Dabei betrug die Abweichung Δ zwischen dem Masse-zu-Ladung-Verhältnisses eines gemessenen Peaks (m_{gemessen}) und dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis eines theoretisch möglichen Peptidfragments ($m_{\text{theoretisch}}$) unter 100 *parts per million*:

$$\Delta = (m_{\text{theoretisch}} - m_{\text{gemessen}}) / m_{\text{gemessen}} * 1.000.000.$$

Peaks, die in den Kontrollansätzen und in den Urinansätzen auftraten, gingen nicht in die Auswertung ein.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und physiologische Parameter

Kontrollmäuse (*Cre*^{-/-}) und megalindefiziente Mäuse (*Cre*^{+/+}) sowie Kontrollmäuse mit GN (*Cre*^{-/-}/GN) und megalindefiziente Mäuse mit GN (*Cre*^{+/+}/GN) wurden miteinander verglichen. Klinische Parameter und Nierenfunktionsparameter sind in Tab. 3 dargestellt.

Cre⁽⁺⁾-Mäuse hatten eine signifikant erhöhte Proteinausscheidung im Urin aufgrund der bei diesem Genotyp schon bekannten niedermolekularen Proteinurie (LEHESTE et al. 2003). Die Injektion eines nephritogenen Antikörpers (Abb. 3) rief eine GN mit einer erheblichen Proteinurie hervor, wie schon zuvor nachgewiesen wurde (BERNARD et al. 1978, LE HIR 2004).



Abb. 3: anti-GBM-Glomerulonephritis in der Maus: HRP gekoppelter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Sekundärantikörper im Glomerulus

Alle GN-Mäuse wurden zu einem Zeitpunkt getötet, an welchem die Proteinurie die Höhe von 10-15 mg/24 h erreicht hatte. Tubulointerstitielle Veränderungen hatten sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt.

Beide proteinurischen GN-Gruppen waren durch signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks und des Plasmacholesterinspiegels sowie durch eine stark reduzierte fraktionelle Natriumexkretion gekennzeichnet. Das Urinvolumen war leicht erhöht, die Urinosmolarität blieb jedoch unverändert (Tab. 3, Abb. 5).

Tab. 3: Physiologische Parameter

	Cre(-)	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
Allgemeine Parameter:				
Körpergewicht (g)	21,46 ± 1,34	19,93 ± 1,11	27,40 ± 1,85	28,61 ± 2,00
Nierengewicht (g)	0,27 ± 0,05	0,29 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,10
Systolischer Blutdruck	78,20 ± 5,47	90,20 ± 3,55	113,30 ± 3,00 [#]	120,33 ± 6,94 [#]
Trinkmenge (ml)	2,22 ± 0,64	1,54 ± 0,20	1,42 ± 0,18	2,08 ± 0,28
Urinvolumen (ml)	0,87 ± 0,08	0,67 ± 0,19	1,31 ± 0,23	1,23 ± 0,22
Plasmaparameter:				
Na ⁺ (mmol/l)	156,53 ± 1,78	155,95 ± 2,27	153,82 ± 2,05	164,37 ± 6,88
K ⁺ (mmol/l)	6,86 ± 0,93	5,76 ± 0,53	5,93 ± 0,87	6,69 ± 0,55
Cl ⁻ (mmol/l)	120,47 ± 2,29	121,32 ± 3,70	117,10 ± 0,83	121,78 ± 2,17
Protein (g/l)	43,93 ± 2,72	38,32 ± 6,25	44,34 ± 2,14	32,10 ± 6,90
Albumin (g/l)	21,48 ± 1,80	22,74 ± 3,71	21,96 ± 2,07	15,00 ± 2,75
Kreatinin (µmol/l)	9,40 ± 1,29	9,67 ± 2,60	8,00 ± 2,31	9,13 ± 3,20
Cholesterin (g/l)	1,04 ± 0,10	1,04 ± 0,12	1,84 ± 0,10 [#]	1,69 ± 0,21 [#]
Triglyceride (g/l)	0,47 ± 3,45	0,43 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,42 ± 0,08
Harnstoff (mmol/l)	11,39 ± 3,45	9,15 ± 2,99	10,04 ± 3,21	18,33 ± 3,98
Osmolalität (mOsmol/kg H ₂ O)	337,40 ± 4,36	341,40 ± 7,61	336,60 ± 4,62	357,80 ± 5,30
Funktionsparameter:				
Kreatinin-Clearance GFR (µl/min/g Körpergewicht)	10,87 ± 1,33	11,36 ± 1,92	13,60 ± 1,30	12,60 ± 0,87
Fraktionale Na ⁺ - Exkretion (FE%)	0,20 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,12 ± 0,01 [#]	0,15 ± 0,01 [#]
Urinparameter:				
Na ⁺ (µmol/24h)/ g Körpergewicht	3,21 ± 0,48	2,49 ± 0,56	4,49 ± 0,82	4,76 ± 0,68
K ⁺ (µmol/24h)/ g Körpergewicht	4,22 ± 0,51	3,20 ± 0,59	5,95 ± 0,68	7,46 ± 0,95
Cl ⁻ (µmol/24h)/ g Körpergewicht	4,67 ± 0,71	2,80 ± 0,75	5,48 ± 1,20	5,11 ± 0,99
Protein (µg/24h)/ g Körpergewicht	23,70 ± 3,73	63,75 ± 8,47 [*]	423,59 ± 48,67 [#]	464,97 ± 15,79 [#]
Kreatinin (µg/24h)/ g Körpergewicht	0,33 ± 0,16	0,49 ± 0,14	0,25 ± 0,05	0,36 ± 0,16
Osmolalität (mOsmol/kg H ₂ O)	1390 ± 36	1563 ± 326	1610 ± 130	1587 ± 210

Die Messwerte wurden am letzten Tag vor Euthanasierung, Perfusion und Organentnahme erhoben und sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (n ≤ 7). *p < 0,05 (Cre[+] gegen Cre[-]). [#]p < 0,05 (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Um die Einflüsse von Megalin und RME auf die tubuläre Verarbeitung von Proteinen zu beurteilen, wurde die Exkretion von DBP in den Urin ermittelt (Abb. 4). Eine defiziente RME allein führte zu einer niedermolekularen Proteinurie. So war DBP bei Megalindefizienz signifikant erhöht ($9,16 \pm 1,00$ in *Cre[+/-]*- gegen $1,00 \pm 0,32$ in *Cre[-/-]*-Mäusen mit $p < 0,05$). Die Induktion der GN führte zu einem beträchtlichen Anstieg der DBP-Ausscheidung in *Cre(-)/GN*-Mäusen ($7,82 \pm 1,11$ $p < 0,05$), die bei *Cre(+)/GN*-Mäusen noch ausgeprägter war ($13,71 \pm 1,43$ mit $p < 0,05$ gegen *Cre[-/-]* und $p < 0,05$ gegen *Cre[-/-]/GN*).

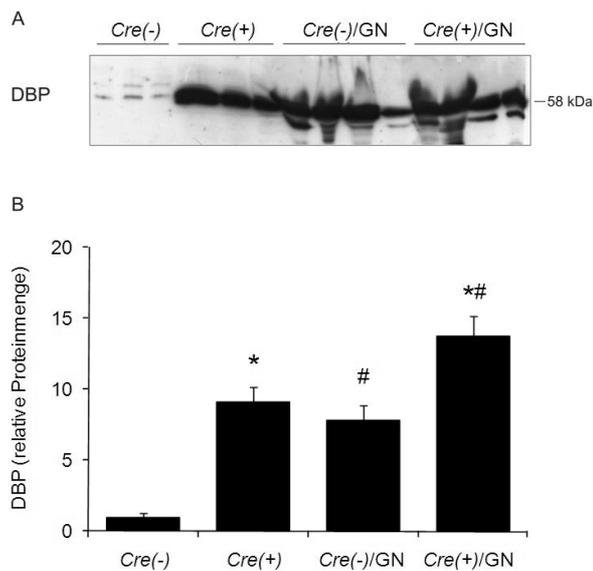


Abb. 4: Ausscheidung des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) im Urin. A: Immunblot. *Cre(+)*-Mäuse zeigen höhere, *Cre(-)/GN*- und *Cre(+)/GN*-Mäuse deutlich erhöhte DBP-Mengen im Vergleich zu den Kontrolltieren. B: Densitometrische Auswertung des Immunblots. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben ($n \leq 7$). *Cre(-)*-Kontrolltiere wurden gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen relativ darauf bezogen. * $p < 0,05$ (*Cre[+/-]* gegen *Cre[-/-]*), # $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Unter Kontrollbedingungen war der systolische Blutdruck in *Cre(+)*-Tieren etwas höher als in *Cre(-)*-Tieren, wobei die Signifikanzschwelle jedoch nicht unterschritten wurde ($90,2 \pm 3,6$ gegen $78,2 \pm 5,5$ mmHg, $p = 0,10$). Die GN-Induktion führte bei beiden Genotypen zu signifikanten Erhöhungen des Blutdrucks, wobei in *Cre(+)*-Tieren die höhere Tendenz erhalten blieb ($113,3 \pm 3,0$ in *Cre[+]/GN* und $120,3 \pm 6,9$ in *Cre[-]/GN*, mit $p = 0,12$, *Cre[+]* gegen *Cre[-]*) und $p < 0,05$, GN gegen unbehandelte Mäuse).

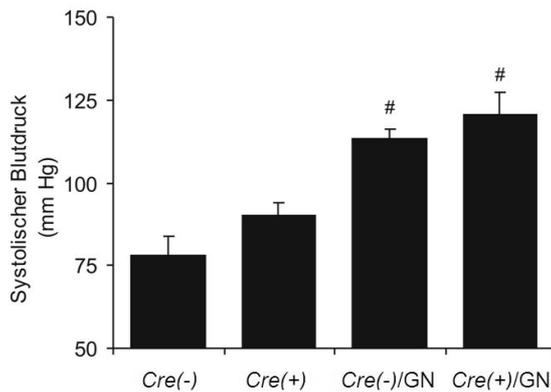


Abb. 5: Messungen des systolischen Blutdrucks. Die Werte waren in den Kontrollmäusen mit GN (*Cre*⁻/*GN*) und in den konditionellen partiellen Megalin-*knockout*-Mäusen mit GN (*Cre*⁺/*GN*) signifikant erhöht. Die entsprechenden numerischen Werte (Mittelwerte ± Standardfehler) sind in Tab. 3 angegeben. #*p* < 0,05 (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Die immunreaktiven histochemischen Signale von COX-2 und Renin im juxtaglomerulären Apparat, bezogen auf die Anzahl der Glomeruli, sowie die Plasma-Aldosteronkonzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 4).

Tab. 4: COX-2 und RAAS-Parameter

	Cre(-)	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
COX-2/ Glomerulus, %	100,00 ± 14,23	80,19 ± 20,91	114,66 ± 7,13	91,98 ± 16,42
Renin/Glomerulus, %	100,00 ± 9,44	93,50 ± 9,13	79,12 ± 6,22	75,21 ± 1,61
Aldosteron (pg/ml)	535,17 ± 175,16	250,73 ± 48,36	248,42 ± 109,80	629,47 ± 145,60

Immunohistochemische Auswertung von Cyclooxygenase-2 (COX-2) (n = 3) und Reninsignalen (n = 3) im Gewebe, relativ zur Anzahl der Glomeruli und radioaktive Messungen der Plasmaaldosteronkonzentration (n = 3). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Weiterhin war die Plasmakonzentration von Cholesterin erhöht und die fraktionelle Natriumexkretion in den GN-Gruppen gegenüber den Kontrollen stark reduziert (jeweils *p* < 0,05, Tab. 3). Um zu prüfen, ob es mögliche tubuläre Ursachen dieser Natriumretention und einen Einfluss der RME auf die Natriumretention gibt, wurden die proximal und distal-tubulären Epithelien auf Veränderungen hin untersucht.

4.2 Analyse von proximal-tubulären Na⁺-Transportern und AQP1

Nebeneinander liegende megalinpositive und megalindefiziente proximale Tubuluszellen wurden unter Kontrollbedingungen und proteinurischen Bedingungen in den gleichen Tubulusabschnitten verglichen. Megalinmangel und damit assoziierte Veränderungen der Zellmorphologie bewirkten keine grundlegenden Veränderungen der immunreaktiven Signale von NHE3 an der Basis der BBM, wohingegen Signale von NaPi-IIa und AQP1 in *Cre(+)*-im Vergleich zu *Cre(-)*-Mäusen apikal in der BBM erhöht waren. Die Induktion einer GN rief ebenso keine Veränderungen proximal-tubulärer immunreaktiver NHE3-Signale hervor und war auch unabhängig von der Megalinexpression. Im Gegensatz dazu waren NaPi-IIa- und AQP1-Signale in der BBM beider GN-Gruppen deutlich verringert. megalinpositive und megalindefiziente Zellen wiesen in *Cre(+)*/GN- im Vergleich zu *Cre(+)*-Mäusen reduzierte Signalintensitäten von NaPi-IIa und AQP1 auf (Abb. 6).

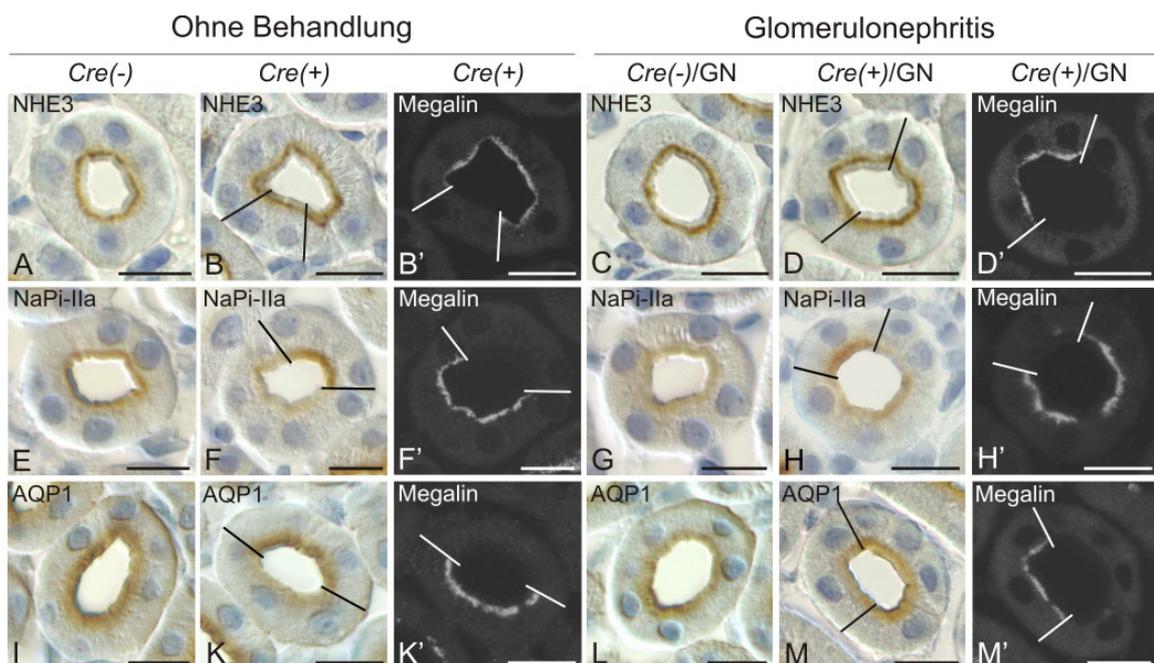


Abb. 6: Immunhistochemische Analyse der proximal-tubulären Transporter NHE3, NaPi-IIa und AQP1. Die zugehörigen Doppelfärbungen von Megalin mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundäntikörper sind mit Apostroph gekennzeichnet (B', D', F', K', M'). Unter Kontrollbedingungen waren keine Änderungen für NHE3 sichtbar, wohingegen NaPi-IIa und AQP1 eine erhöhte Anfärbung der BBM in megalindefizienten Zellen zeigten (A, B, E, F, I, K). In den GN-Gruppen blieben die immunhistochemischen Signale von NHE3 an der Basis der BBM generell unverändert, während die Anfärbung von NaPi-IIa und AQP1 apikal in der BBM schwächer war (C, D, G, H, L, M). Pro Gruppe wurden 3 Mäuse ausgewertet. Kalibrierbalken = 10 µm.

In den Immunblots der BBM-Fraktion waren die Proteinmengen von NaPi-IIa und AQP1, jedoch nicht von NHE3 in *Cre(+)*-höher als in *Cre(-)*-Tieren (Abb. 7, Tab. 5). In beiden GN-Gruppen war die Proteinmenge von NHE3 ebenfalls nicht verändert und unabhängig von der Megalinexpression. Im Gegensatz dazu waren die Proteinmengen von NaPi-IIa und AQP1 unter GN deutlich verringert und zeigten eine Megalin-abhängigkeit (Abb. 7, Tab. 5).

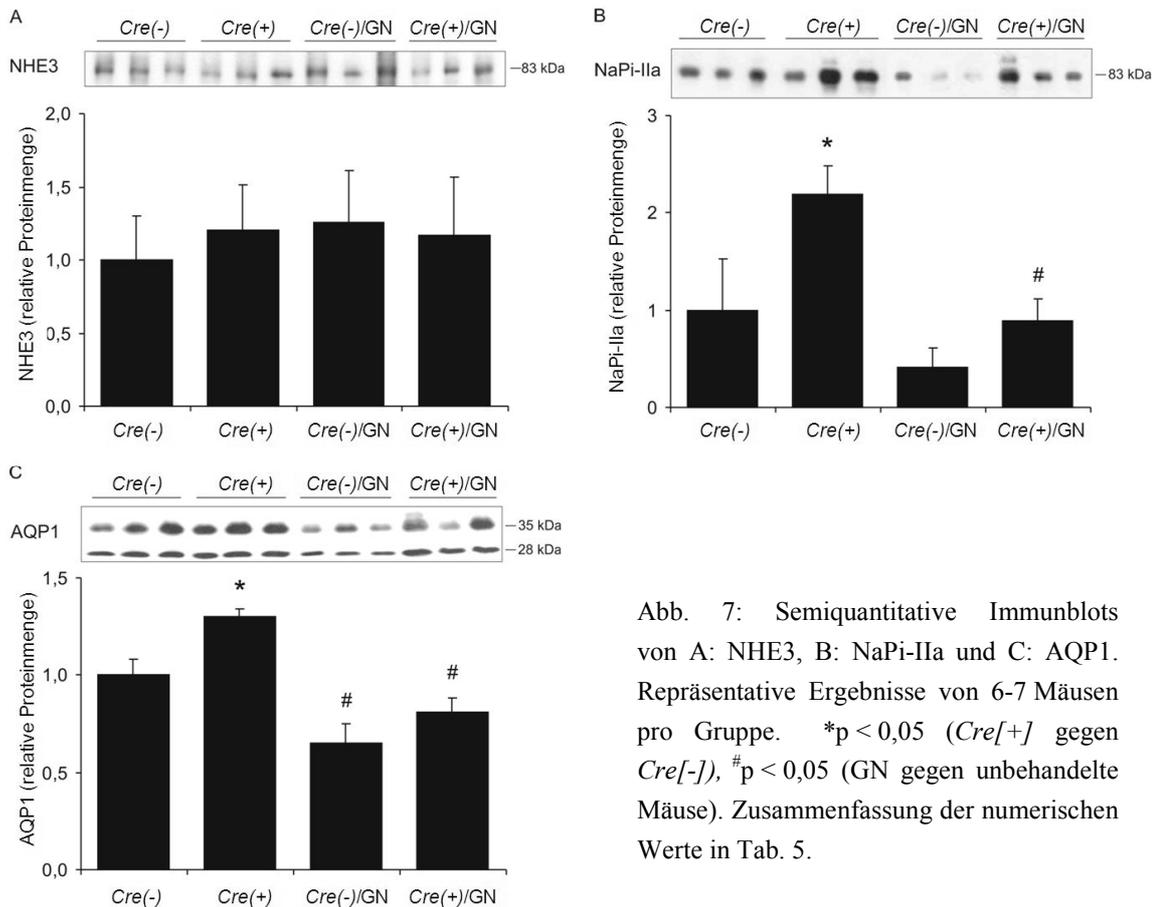


Abb. 7: Semiquantitative Immunblots von A: NHE3, B: NaPi-IIa und C: AQP1. Repräsentative Ergebnisse von 6-7 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ (*Cre[+]* gegen *Cre[-]*), # $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse). Zusammenfassung der numerischen Werte in Tab. 5.

Tab. 5: Numerische Werte semiquantitativer Immunblots der proximal-tubulären Transporter in der BBM

BBM-Fraktion	Berechnete relative Proteinmenge \pm SEM			
	<i>Cre(-)</i>	<i>Cre(+)</i>	<i>Cre(-)/GN</i>	<i>Cre(+)/GN</i>
NHE3	1,00 \pm 0,30	1,20 \pm 0,31	1,26 \pm 0,35	1,17 \pm 0,40
NaPi-IIa	1,00 \pm 0,53	2,19 \pm 0,29*	0,41 \pm 0,20	0,89 \pm 0,23 [#]
AQP1	1,00 \pm 0,08	1,30 \pm 0,04*	0,65 \pm 0,10 [#]	0,81 \pm 0,07 [#]

Die Werte wurden auf β -Actin normalisiert und als Mittelwerte der densitometrischen Intensitäten \pm Standardfehler angegeben ($n \leq 7$). Die Kontrolle *Cre(-)* wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen relativ darauf bezogen. * $p < 0,05$ (*Cre[+]* gegen *Cre[-]*) # $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Der kortikale mRNA-Gehalt aller drei Produkte wies in *Cre(+)*- im Vergleich zu *Cre(-)*-Tieren keine Änderungen auf (Tab. 6). In den GN-Gruppen unterschied sich der mRNA-Gehalt für NHE3 unter GN nicht von den Mäusen ohne GN, und zeigte für NaPi-IIa und AQP1 unter GN eine Abnahme (Tab. 6). Die auf Proteinebene festgestellte Megalinabhängigkeit von NaPi-IIa und AQP1 war auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar.

Tab. 6: *quantitative real-time-PCR* für proximal tubuläre Parameter

	Berechnete relative gesamt-mRNA-Menge \pm SEM			
	<i>Cre(-)</i>	<i>Cre(+)</i>	<i>Cre(-)/GN</i>	<i>Cre(+)/GN</i>
NHE3	1,00 \pm 0,11	0,99 \pm 0,23	0,95 \pm 0,23	1,16 \pm 0,10
NaPi-IIa	1,00 \pm 0,03	1,26 \pm 0,16	0,36 \pm 0,05 [#]	0,48 \pm 0,09 [#]
AQP1	1,00 \pm 0,11	1,05 \pm 0,18	0,35 \pm 0,14 [#]	0,39 \pm 0,07 [#]

Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben ($n \leq 7$). Die Kontrolle *Cre(-)* wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen relativ darauf bezogen. * $p < 0,05$ (*Cre[+]* gegen *Cre[-]*).

Expression und Proteinsynthese von NHE3 wiesen keine Veränderungen auf. Daher wurde die NHE3-Aktivität untersucht. Es wurde die gesamt-NHE-Aktivität als Veränderung des pH-Wertes in den BBM-Vesikeln unter Verwendung der Acridinorange-Quenching-Methode ermittelt. Dabei wurden weder zwischen *Cre(-)*- und *Cre(+)*-Mäusen noch zwischen GN-Gruppen und Kontrollen Veränderungen festgestellt. Bei Zugabe von 100 μ M des NHE3-spezifischen Inhibitors EIPA erfolgte in *Cre(-)*- und *Cre(+)*-Mäusen gleichermaßen eine vollständige Hemmung der gesamt-NHE-Aktivität (Abb. 8). Da in GN jedoch die spezifischer der NHE3-Hemmung durch EIPA signifikante eine Restaktivität gemessen wurde (Abb. 8), kann noch eine weitere, EIPA-resistente NHE-Isoform durch GN-Induktion aktiviert worden sein. Megalinabhängige Unterschiede zwischen den GN-Gruppen wurden nicht festgestellt.

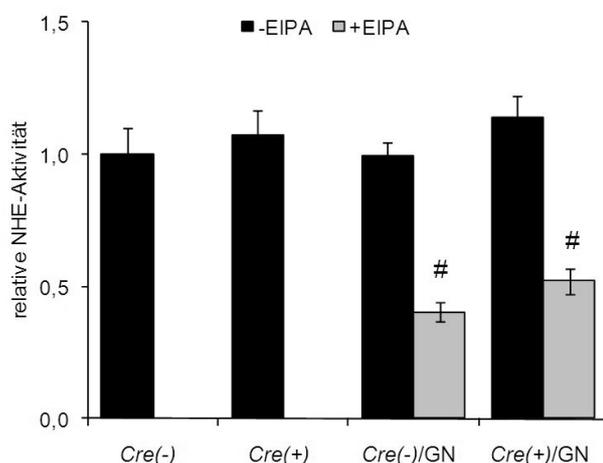


Abb. 8: NHE-Aktivität. Schwarze Säulen: gesamt-NHE-Aktivität ohne Hemmung durch EIPA. Graue Säulen: gesamt-NHE-Aktivität mit 100 μ M des NHE3-spezifischen Inhibitors EIPA. In den Kontrollen wurde die gesamte NHE-Aktivität vollständig gehemmt. In beiden GN-Gruppen wurde eine NHE-Restaktivität gemessen, die keine NHE3-Aktivität darstellt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Kontrolle *Cre(-)* wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen relativ darauf bezogen. [#] $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Der proximal-tubuläre NHE3 blieb durch Proteinurie und RME weitgehend unbeeinflusst, da in der Immunhistochemie, im Western Blot und in der *real-time-quantitative* PCR keine Veränderungen, weder der kortikalen mRNA-Expression, noch der Proteinmenge in der BBM, festgestellt werden konnten.

In den GN-Gruppen wurde jedoch eine megalinunabhängige NHE3-Aktivitätsreduktion gefunden (Abb. 8). Daneben zeigten die Ergebnisse für NaPi-IIa und AQP1 eine reduzierte Expression unter GN-assoziiierter Proteinurie sowie eine Anreicherung unter Megalin-Teildefizienz. Die bereits für NaPi-IIa bereits bekannte, relative Signalerhöhung in megalindefizienten Zellen wird durch RME hervorgerufen (BACHMANN et al. 2004). Tab. 7 zeigt zusammengefasst die veränderten Parameter der mit Hilfe verschiedener Methoden untersuchten proximal-tubulären Transporter und Kanäle.

Tab. 7: Zusammenfassung proximal-tubulärer veränderter Parameter in den Mäusen

NHE3	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
Immunhistochemie	↔	↔	↔
Immunblot BBM	↔	↔	↔
mRNA im Kortex	↔	↔	↔
Aktivität in der BBM	↔	↓	↓
NaPi-IIa, AQP1	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
Immunhistochemie	↑	↓	↔(↓vs.Cre[+])
Immunblot BBM	↑	↓	↔(↓vs.Cre[+])
mRNA im Kortex	↑	↓	↓

Vertikale Pfeile zeigen signifikante Veränderungen an. Alle Veränderungen beziehen sich auf *Cre(-)*, sofern nicht gesondert angegeben.

4.3 Analyse von distal-tubulären Na⁺-Transportern und AQP2

Um die Effekte von RME und GN auf Transporterproteine des distalen Tubulus und des Sammelrohres zu untersuchen, wurden bei den Kontrollmäusen sowie bei den anti-GBM-GN-Mäusen Expression und zelluläre Verteilung von NKCC2, α -, β - und γ ENaC, α Na,K-ATPase und AQP2 bestimmt (Tab. 8).

Wie bei den BBM-Fraktionen wurden von kortikalen und medullären Plasmamembran-Extrakten Quantifizierungen durch Immunblots durchgeführt, da angenommen wurde, dass die lokale Expression dieser Transporter ihre Aktivität anzeigt.

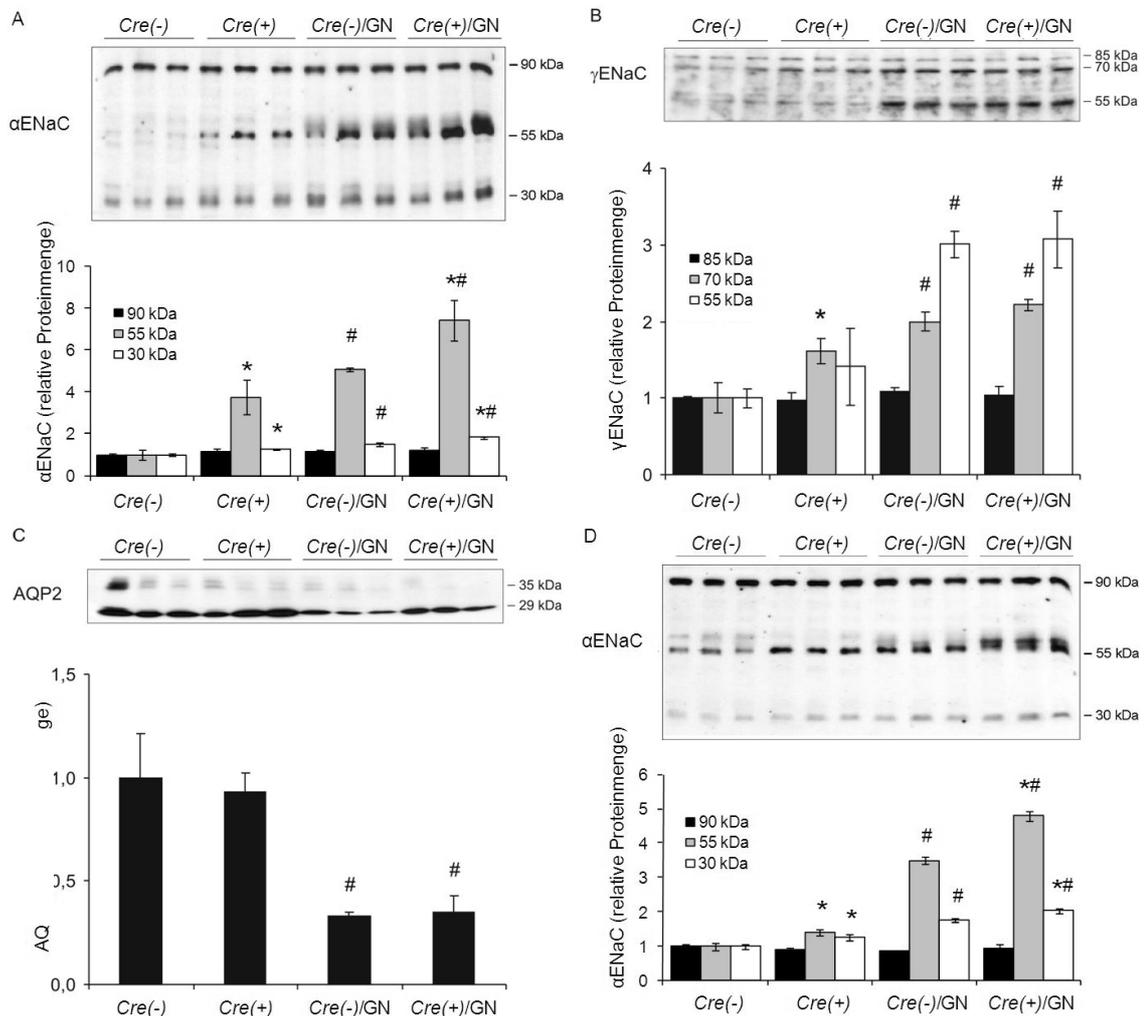


Abb. 9: Semiquantitative Immunblots veränderter Natrium-Transporter und Wasserkanäle in der kortikalen (A, B, C) und in der medullären (D) Plasmamembran. Verteilung der Hauptbande und der kleineren Banden von α -ENaC (A, D) und γ -ENaC (B). Verteilung der beiden Hauptbanden von AQP2 (C), repräsentative Ergebnisse von 6-7 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ ($Cre[+]$ gegen $Cre[-]$), # $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse). Zusammenfassung der numerischen Werte in Tab. 8.

Kortikale und medulläre Anteile der TAL-Segmente zeigten bei allen Gruppen keine Veränderungen der NKCC2-Proteinmenge in der Plasmamembran, ebenso war die Proteinmenge von α Na,K-ATPase sowohl im Kortex als auch in der Medulla unverändert (Tab. 8). Die Hauptbanden der *full-length*- α -, β - und γ ENaC-Proteine zeigten keine Veränderung. Jedoch traten neben den unveränderten *full-length*-Banden von α ENaC (90 kDa) und γ ENaC (85 kDa) signifikante, selektive Zunahmen von zusätzlichen Ban-

den mit niedrigerem Molekulargewicht auf, die vermutlich Spaltprodukte dieser ENaC-Untereinheiten darstellten.

Im *steady state* waren die zusätzlichen α ENaC-Banden bei etwa 55 und 30 kDa im Vergleich von *Cre(+)*- mit *Cre(-)*-Tieren signifikant um 3,74- bzw. 1,26-fach erhöht, was darauf hinweist, dass Megalindefizienz und Mangel der proximalen RME zu einem höheren Gehalt von filtrierten Plasmakomponenten geführt haben können, die sich vermutlich auf die Struktur des ENaC auswirken (Abb. 9 A, Tab. 8). Auf ähnliche Art, jedoch weniger ausgeprägt, trat eine zusätzliche Bande des kortikalen γ ENaC bei 70 kDa bei *Cre(+)*-Mäusen signifikant um 1,62-fach erhöht auf (Abb. 9 B, Tab. 8). In der Medulla waren die zusätzlichen 55- und 30 kDa-Banden, wie im Kortex, ebenfalls in *Cre(+)* signifikant erhöht, und zwar um 1,41-fach und 1,26-fach (Abb. 9 D, Tab. 8). Veränderungen der Gesamtexpression von β ENaC oder der medullären γ ENaC-Expression wurden nicht gefunden (Tab. 8).

In der anti-GBM-GN waren die Intensitäten der 55 kDa- und der 30 kDa-Bande des kortikalen α ENaC bei *Cre(-)/GN*-Mäusen 5,08- bzw. 1,51-fach erhöht, und um 7,44- bzw. 1,83-fach bei *Cre(+)/GN*-Mäusen (Abb. 9 A, Tab. 8). Die Intensitäten der 55 kDa- und der 30 kDa-Bande des medullären α ENaC waren bei *Cre(-)/GN*-Tieren 3,5- bzw. 1,75-fach erhöht, und bei *Cre(+)/GN*-Tieren entsprechend 4,79- bzw. 2,03-fach erhöht (Abb. 9 D, Tab. 8). Diese Ergebnisse liefern weitere Hinweise auf eine durch RME beeinflusste tubuläre Proteinurie nephritischen Ausmaßes im distalen Tubulus mit einer möglichen, dadurch bedingten Modifikation von α ENaC. Im Kortex zeigte γ ENaC ebenso Zunahmen der 70- und 55 kDa-Banden unter GN, Effekte der RME waren jedoch nicht festzustellen (70 kDa: 2,0-fache Zunahme bei *Cre(-)/GN*-Mäusen und 2,2-fach bei *Cre(+)/GN*-Tieren; 55 kDa: jeweils 3,01- und 3,08-fache Zunahmen bei *Cre(-)/GN*- und *Cre(+)/GN*-Mäusen). Ebenfalls traten hier, wie bei *Cre(+)*-Tieren, in der Medulla keine Veränderungen von γ ENaC oder von der β ENaC-Gesamtexpression auf (Tab. 8).

Tab. 8: Numerische Werte semiquantitativer Immunblots distal-tubulärer Transporter

Kortikale PM-Fraktion	Berechnete relative Proteinmenge \pm SEM			
	Cre(-)	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
NKCC2	1,00 \pm 0,17	1,06 \pm 0,17	0,77 \pm 0,06	0,87 \pm 0,10
α ENaC 90 kDa	1,00 \pm 0,08	1,16 \pm 0,16	1,17 \pm 0,05	1,22 \pm 0,13
α ENaC 55 kDa	1,00 \pm 0,23	3,74 \pm 0,82*	5,08 \pm 0,11 [#]	7,44 \pm 0,95* [#]
α ENaC 30 kDa	1,00 \pm 0,08	1,26 \pm 0,02*	1,51 \pm 0,09 [#]	1,83 \pm 0,07* [#]
β ENaC	1,00 \pm 0,19	0,88 \pm 0,23	0,94 \pm 0,18	0,89 \pm 0,26
γ ENaC 85 kDa	1,00 \pm 0,01	0,97 \pm 0,09	1,09 \pm 0,04	1,03 \pm 0,12
γ ENaC 70 kDa	1,00 \pm 0,20	1,62 \pm 0,16*	2,00 \pm 0,12 [#]	2,22 \pm 0,08 [#]
γ ENaC 55 kDa	1,00 \pm 0,13	1,41 \pm 0,50	3,01 \pm 0,17 [#]	3,08 \pm 0,37 [#]
α Na,K-ATPase	1,00 \pm 0,25	1,06 \pm 0,18	1,09 \pm 0,17	0,96 \pm 0,20
AQP2	1,00 \pm 0,21	0,93 \pm 0,09	0,33 \pm 0,03 [#]	0,35 \pm 0,08 [#]
medulläre PM-Fraktion	Cre(-)	Cre(+)	Cre(-)/GN	Cre(+)/GN
NKCC2	1,00 \pm 0,40	0,86 \pm 0,17	1,76 \pm 0,37	1,34 \pm 0,24
α ENaC 90 kDa	1,00 \pm 0,06	0,90 \pm 0,05	0,85 \pm 0,04	0,94 \pm 0,14
α ENaC 55 kDa	1,00 \pm 0,10	1,41 \pm 0,10*	3,50 \pm 0,10 [#]	4,79 \pm 0,15* [#]
α ENaC 30 kDa	1,00 \pm 0,06	1,26 \pm 0,08*	1,75 \pm 0,05 [#]	2,03 \pm 0,06* [#]
β ENaC	1,00 \pm 0,10	1,05 \pm 0,09	0,94 \pm 0,25	1,50 \pm 0,35
γ ENaC 85 kDa	1,00 \pm 0,09	1,03 \pm 0,12	0,99 \pm 0,16	1,02 \pm 0,12
γ ENaC 70 kDa	1,00 \pm 0,23	1,06 \pm 0,04	1,10 \pm 0,11	1,18 \pm 0,03
γ ENaC 55 kDa	1,00 \pm 0,17	1,10 \pm 0,12	1,17 \pm 0,13	1,18 \pm 0,13
α Na,K-ATPase	1,00 \pm 0,11	1,37 \pm 0,14	1,25 \pm 0,22	0,95 \pm 0,17
AQP2	1,00 \pm 0,08	0,94 \pm 0,05	0,88 \pm 0,12	0,85 \pm 0,08

Die Werte wurden auf β -Actin normalisiert und als Mittelwerte der densitometrischen Intensitäten \pm Standardfehler angegeben ($n \leq 7$). Die Cre(-)-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen relativ darauf bezogen. * $p < 0,05$ (Cre[+] gegen Cre[-]) [#] $p < 0,05$ (GN gegen unbehandelte Mäuse).

Die AQP2-Signale waren in den Kontrollen unverändert und unter GN nur im Kortex signifikant vermindert (3,03-fach in Cre(-)/GN- und 2,85-fach in Cre(+)/GN-Mäusen (Abb. 10, Tab. 8).

Diese Befunde wurden durch bei den immunhistochemischen Färbungen beobachtete Veränderungen annähernd bestätigt (Abb. 10). In den Kontrollen wiesen die Färbungen von α ENaC und γ ENaC im kortikalen CNT bei *Cre(+)*- im Vergleich zu *Cre(-)*-Tieren nicht nur eine stärkere Intensität auf, sondern zeigte auch eine erhöhte Umverteilung in die apikale PM. Kortikale α Na,K-ATPase- und AQP2-Signale zwischen *Cre(+)*- und *Cre(-)*-Mäusen unterschieden sich nicht wesentlich.

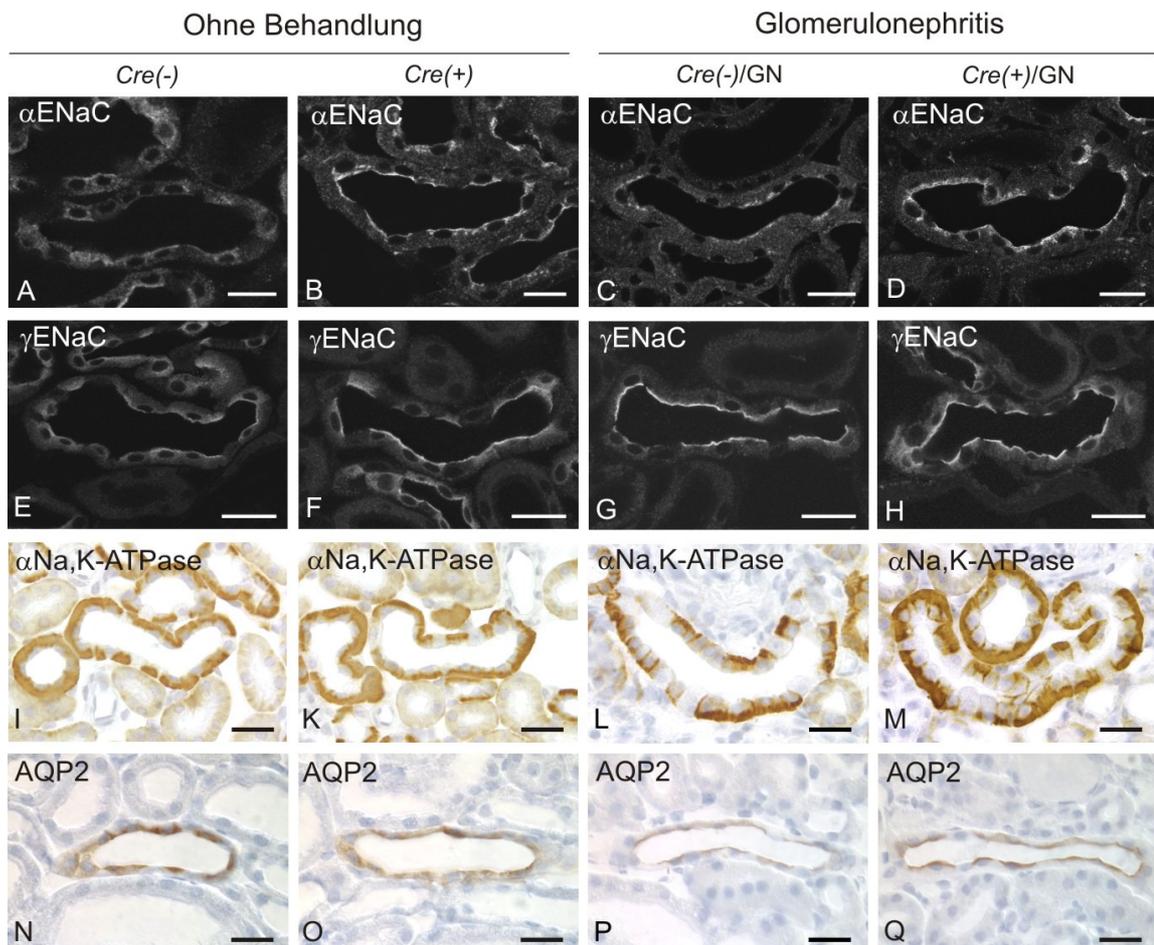


Abb. 10: Immunhistochemische Analyse der Transporter α ENaC, γ ENaC, α Na⁺-K⁺-ATPase und AQP2 im Nierenkortex. A-H: Die adluminalen Signale von α ENaC und γ ENaC sind in *Cre(+)*-Mäusen und beiden GN-Gruppen erhöht, am stärksten in *Cre(+)/GN*-Mäusen. I-M: Die basolateralen Signale von α Na⁺-K⁺-ATPase in GN sind stärker als in den Kontrollen. N-Q: Signale von AQP2 sind in den GN-Gruppen vermindert. Pro Gruppe wurden 3 Mäuse ausgewertet. Kalibrierbalken = 20 μ m.

Unter GN zeigten *Cre(+)*-Tiere stärkere apikale ENaC-Signale als *Cre(-)*-Tieren, hier ebenfalls mit einer verstärkten Umverteilung in die apikale PM. Die Signale der α Na,K-ATPase zeigten einen erheblichen Anstieg bei GN, abweichend vom Immunblot (Tab. 8) aus PM-Fractionen von kortikalem Nierengewebe, die eine Mischung aller enthalte-

nen Nephronsegmente enthielten. Daher wurden die Veränderungen der α Na,K-ATPase im Sammelrohr vermutlich maskiert. Die AQP2-Signale waren in den GN-Gruppen vermindert und zeigten keine Abhängigkeit vom RME.

4.4 Suche nach enzymatischen Schnittstellen in künstlichen Maus- α - und γ ENaC-Peptiden

In den Immunblots traten sowohl in Cre(+) als auch in beiden GN-Gruppen neben den *full-length*-Banden von α - und γ ENaC kleinere Banden auf, die vermutlich durch filtrierte Plasmaproteasen hervorgerufene Spaltprodukte darstellen. Um Hinweise für die Lokalisation von Schnittstellen in der Peptidsequenz der ENaC-Untereinheiten und für die sie verursachenden Proteasen zu finden, sollte Sammelurin aus megalindefizienten Mäusen auf die Fähigkeit hin untersucht werden, künstliche Peptide aus den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC zu schneiden. Auf Bromcyan-aktivierten Sepharosebeads immobilisierter Sammelurin bewirkte Spaltungen aller synthetischen Peptide (Tab. 9-12).

Tab. 9: Peaks aus der MALDI-TOF-Analyse von synthetischen α ENaC-Peptiden und von deren Schnittprodukten im Zeitverlauf

AS-Positionen	m/z berechnet	Gemessenes m/z-Verhältnis und relative Intensität (%) nach							
		0,5 h		2,5 h		6 h		10 h	
S191-L215	2808,51	2808,54	39,32	2808,69	0,30	2808,71	0,06	-	-
	1432,79	1432,81	58,85	1432,88	87,45	1432,90	89,83	1432,87	88,03
	1088,61	-	-	1088,57	5,84	1088,69	5,28	1088,66	4,94
R217-N241	2703,41	2703,41	10,80	2703,58	2,3	2703,62	3,14	-	-
	2278,12	2278,13	1,23	2278,26	10,34	2278,30	50,96	2278,24	31,65
	1685,96	-	-	1686,06	1,96	1686,08	9,71	-	-
	1371,79	-	-	1371,87	7,66	1371,89	30,95	-	-
	1260,67	-	-	1260,74	2,88	1260,76	24,81	-	-
A301-H325	2864,30	2864,39	5,52	-	-	-	-	-	-
	1621,67	1621,73	51,73	1621,81	30,44	1621,69	10,41	1621,69	6,65
	2128,90	2128,98	24,28	-	-	-	-	-	-
	1352,58	1352,51	4,28	-	-	-	-	-	-
	1108,47	-	-	1108,54	10,72	1108,49	27,11	1108,46	12,35

In der MALDI-TOF detektierte α ENaC-Peptide und deren spezifische Produkte nach Inkubation mit immobilisiertem Sammelurin aus Mäusen mit verminderter RME zu den angegebenen Zeitpunkten. Das berechnete Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) eines Peptides ist voran angegeben. Die gemessenen m/z-Werte haben eine Abweichung von unter 100 *parts per million* vom berechneten m/z-Wert. Zugehörig zum Zeitpunkt ist die relative Intensität, bezogen auf das stärkste Peak-Signal in der Probe (Basispeak), angegeben. Die spezifischen Produkte kommen, gegenüber den Kontrollansätzen, nur in den mit Urin inkubierten Peptiden vor. Die letzten sechs Peptide wurden so stark gespalten, dass keine spezifischen Produkte nachgewiesen werden konnten. Sie sind in der Tabelle nicht dargestellt.

Bei den ersten drei künstlichen α ENaC-Peptiden S191-L215, R217-N241 und A301-H325 konnte beobachtet werden, dass jeweils das vollständige Produkt mit zunehmender Inkubationszeit abgebaut wird, wohingegen seine Produkte zunehmen, aber später teilweise auch abgebaut werden (Tab. 9). Die sechs weiteren α ENaC-Peptide N317-S341, F335-L359, N352-R377, L370-F394, A387-L411 und I404-V428 wurden so stark gespalten, dass keine eindeutigen Produkte erkennbar waren.

Tab. 10: Schnittstellen in synthetischen Peptiden aus den extrazellulären Schleifen von α ENaC.

AS-Positionen	Aminosäuresequenz der Peptide und der Spaltprodukte	m/z berechnet
S191-L215	ssytrqaggrrr ↓ ¹ str A dlrgalphpl strdlrgalphpl dlrgalphpl	2808,51 1432,79 1088,61
R217-N241	rlr B tppppnpar ↓ ² sar A sasssvrdnn tppppnparsasssvrdnn rlrtppppnpar tppppnparsar rlrtppppnparsar	2703,41 2278,12 1371,79 1260,67 1685,96
A301-H325	algsfif ↓ ² tcrf ↓ ¹ nqapc ↓ ³ nqa ↓ ⁴ nysqfh nqapcnqanysqfh tcrfnqapcnqanysqfh tcrfnqapcnqa qanysqfh	2864,30 1621,67 2128,90 1352,58 1108,47

Ein roter Pfeil ↓ symbolisiert eine Schnittstelle, wobei ein Peptidfragment von mindestens einer Seite der Schnittstelle gefunden wurde. Die Schnittstellen und die Spaltprodukte sind nach Reihenfolge und Stärke des Auftretens nummeriert und sortiert. Der grün hinterlegte Großbuchstabe **A** bezeichnet zwei, für sowohl Furin als auch TMPRSS4 bekannte Schnittstellen (MEROPS). Der grün hinterlegte Großbuchstabe **B** gibt eine Konsensussequenz für eine Schnittstelle von Kallikrein 1 an (-4,-3,-2,R↓+1,P,P,+4, ExPASy Proteomics tool PeptideCutter). Der Kasten markiert eine in der Literatur beschriebene inhibitorische Domäne, nach deren Exzision die Kanalaktivität erhöht wird (CARATTINO et al. 2006).

Im künstlichen α ENaC-Peptid S191-L215 mit 2808,5 m/z wurde ab 2,5 h ein Spaltprodukt mit 1088,61 m/z (dlrgalphpl) gefunden. Dieses lag hinter einer Schnittstelle für TMPRSS4 (*transmembrane protease serine 4*, auch *channel activating protease CAP2*) und Furin (R205↓R206) (Tab. 10). Im α ENaC-Peptid R217-N241 (2703,41 m/z) wurde nach 2,5 h und 6 h ein weiteres Spaltprodukt mit 1685,96 m/z (rlrtppppnparsar) gefunden, welches vor einer weiteren Schnittstelle für TMPRSS4 und Furin (R231↓S232) lokalisiert war (Tab. 10). Bereits nach 0,5 h wurde ein Spaltprodukt mit 2278,12 m/z (tppppnparsasssvrdnn) nachgewiesen. Mit Hilfe der Peptidasen-Datenbank MEROPS (RAWLINGS et al. 2010) konnte eine Schnittstelle für Kallikrein 1

mit der Konsensussequenz -4,-3,-2,R↓+1,P,P,+4 identifiziert werden. Die weiteren sechs Schnittstellen, die in α ENaC gefunden wurden, konnten nicht charakterisiert werden.

Tab. 11: Peaks aus der MALDI-TOF-Analyse von synthetischen γ ENaC-Peptiden und von deren Schnittprodukten im Zeitverlauf

AS-Positionen	m/z berechnet	Gemessenes m/z-Verhältnis und relative Intensität (%) nach							
		0,5 h		2,5 h		6 h		10 h	
K91-T115	2785,44	2785,65	62,62	2785,63	61,69	2785,57	61,94	2785,53	12,90
	1697,87	-	-	1697,97	2,62	1697,93	14,61	1697,91	93,42
	1106,58	-	-	-	-	1106,63	4,31	1106,62	13,16
S108-K132	2666,41	2666,64	71,61	2666,59	68,84	2666,52	71,50	2666,50	67,33
	2219,16	2219,31	2,21	2219,27	4,21	2219,21	23,75	2219,22	74,51
L125-R149	2847,55	2847,74	32,53	2847,75	1,55	-	-	-	-
	1775,98	1776,09	41,09	1776,09	94,30	1776,01	19,52	1776,01	10,50
	1334,75	1334,82	9,07	1334,81	51,21	1334,76	18,24	1334,75	15,64
	1349,70	1349,78	4,82	1349,78	18,30	1349,72	97,97	1349,71	98,28
R142-L166	2897,55	2897,69	21,52	2897,77	16,89	2897,58	0,75	-	-
	1450,87	1450,91	25,62	1450,98	92,47	1450,90	56,00	1450,92	41,22
	1465,69	1465,76	19,23	1465,80	70,95	1465,71	95,64	1465,73	96,00
	1954,07	1954,18	17,81	1954,22	24,73	1954,09	85,63	1954,12	26,25
	962,49	962,53	19,35	962,55	46,02	962,51	24,01	962,52	19,87
	1404,68	-	-	1404,79	7,96	1404,70	28,75	1404,73	96,04
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F159-R183	2938,59	2938,71	50,78	2938,82	30,24	2938,63	1,30	-	-
	2015,00	2015,09	24,63	2015,16	87,27	2015,02	84,72	2015,02	27,39
A176-H200	2897,61	2897,73	58,32	2897,87	7,52	2897,62	1,91	2897,57	0,25
	2258,33	2258,33	1,92	2258,40	0,83	2258,28	1,23	2258,33	1,01
	1253,68	-	-	1253,78	6,98	1253,67	49,50	1253,68	99,96
	1581,89	1581,96	3,27	-	-	1581,89	13,40	1581,89	18,00
H193-T217	2809,38	2809,50	61,81	2809,61	61,71	2809,39	31,73	2809,55	7,65
	2289,22	2289,30	4,04	2289,39	9,91	2289,23	47,42	2289,35	70,28
	1866,00	-	-	-	-	1866,02	2,62	1866,09	8,45
	1521,85	-	-	-	-	-	-	1521,92	5,14

In der MALDI-TOF detektierte γ ENaC-Peptide und deren spezifische Produkte nach Inkubation mit immobilisiertem Sammelurin aus Mäusen mit verminderter RME zu den angegebenen Zeitpunkten. Voran angegeben das berechnete Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) eines Peptides. Dargestellte, gemessenen m/z-Werte mit Abweichung von unter 100 *parts per million* vom berechneten m/z-Wert. Zugehörig zum Zeitpunkt angegeben ist die relative Intensität, bezogen auf das stärkste Peak-Signal in der Probe. Weitere Abbauprodukte der spezifischen Produkte nicht dargestellt.

Von allen Peptiden aus γ ENaC konnten ihre vollständigen Sequenzen sowie spezifische Spaltprodukte nachgewiesen werden. Auch hier bei den γ ENaC-Peptiden ist ersichtlich, dass mit längerer Inkubationszeit die vollständigen Peptide abnehmen, während ihre spezifischen Spaltprodukte zu-, zum Teil aber auch wieder abnehmen (Tab. 11).

Tab. 12: Schnittstellen in synthetischen Peptiden aus den extrazellulären Schleifen von γ ENaC.

AS-Positionen	Aminosäuresequenz der Peptide und der Spaltprodukte	m/z berechnet
K91-T115	kldfpavtic ↓ ninpykysavsdllt ninpykysavsdllt kldfpavtic	2785,44 1697,87 1106,58
S108-K132	savsdlltdldsetkqallsi ↓ ygvk savsdlltdldsetkqallsi	2666,41 2219,16
L125-R149	llsl ↓ ³ ygvkdvd ↓ ² stpr A krrreagsmr llslygvkdvdstpr llslygvkdvd ygvkdvdstpr	2847,55 1775,98 1334,75 1349,70
R142-L166	rreagsmr B stwe ↓ ¹ gtpprfln ↓ ³ lipll gtpprflnlipll rreagsmrstwe stwegtpprflnlipll rreagsmr stwegtpprfln	2897,61 1450,87 1465,69 1954,07 962,49 1404,68
F159-R183	lnlipll ↓ ¹ vfnenekgardfftgr vfnenekgardfftgr	2938,59 2015,00
A176-H200	ardfftgrkr ↓ ² kis ↓ ³ gkiihk C asnmh ardfftgrkrkisgkiihk ardfftgrkr ardfftgrkrkis	2897,61 2258,33 1253,68 1581,89
H193-T217	hkas ↓ ² nvm ↓ ³ hvheskklvgfql ↓ ¹ csndt hkasnmhvheskklvgfql nvmhvheskklvgfql hvheskklvgfql	2809,38 2289,22 1866,00 1521,85

Das Darstellungsprinzip dieser Tabelle entspricht Tab. 10. Die in ENaC bekannten Schnittstellen sind mit grün hinterlegten Großbuchstaben markiert. Zugehörige Proteasen sind: **A** TMPRSS4 (MEROPS), **B** Kallikrein 1 (Konsensussequenz -4,-3,-2,R↓S,+2,+3,+4, ExPASy Proteomics tool PeptideCutter), **C** Plasmin.. Der Kasten markiert eine in der Literatur beschriebene inhibitorische Domäne, nach deren Exzision die Kanalaktivität erhöht wird (BRUNS et al. 2007).

Beim künstlichen γ ENaC-Peptid L125-R149 mit 2847,55 m/z wurde ab 0,5 h das Spaltprodukt llslygvkdvdstpr mit 1775,98 m/z gefunden, das vor einer für TMPRSS4 spezifischen Schnittstelle liegt (R140↓K141) (Tab. 12, Abb. 11). Aus dem γ ENaC-Peptid A176-H200 mit 2897,61 m/z war von 0,5 bis 10 h das Spaltprodukt ardfftgrkrkisgkiihk mit 2258,33 m/z und geringer Intensität nachweisbar, das vor einer für Plasmin spezifischen Schnittstelle liegt (K194↓A195) (Tab. 12, Abb. 11). Im Peptid R142-L166 trat

nach 0,5 h das Produkt stwegtpprflnplll mit 1954,07 m/z auf, welches hinter einer für Kallikrein 1 möglichen Schnittstelle -4,-3,-2,R↓S,+2,+3,+4 liegt. Die weiteren 12, über alle γ ENaC-Peptide verteilt auftretenden Schnittstellen konnten nicht identifiziert werden.

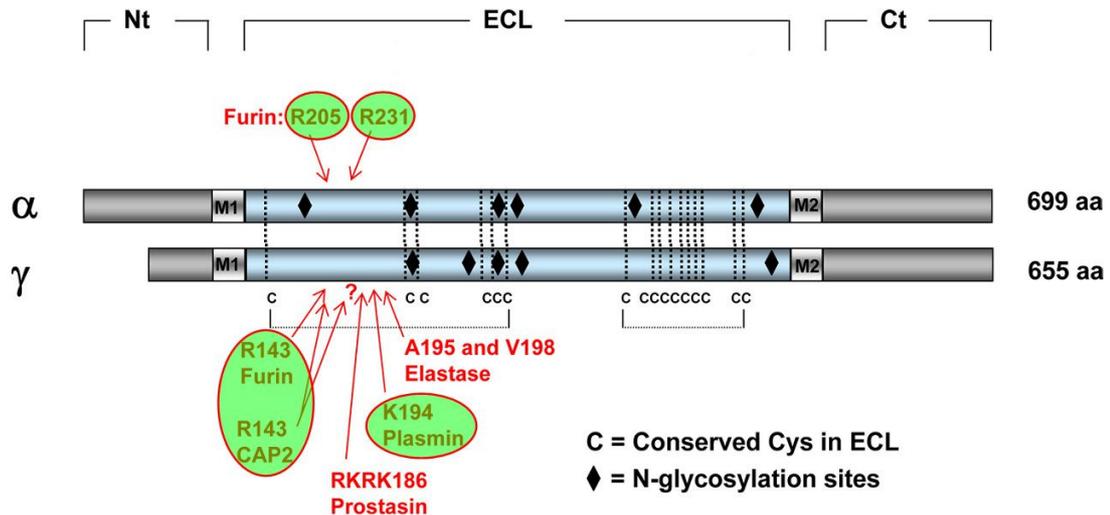


Abb. 11: Enzymatische Schnittstellen in den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC. Mit roten Pfeilen markiert sind in der Literatur bekannte Schnittstellen mit den ihnen zugewiesenen Proteasen. Die Schnittstellen liegen in einem Bereich der jeweiligen extrazellulären Schleife, die durch eine Disulfidbrückendindung konservierter Cysteinreste eine zusätzliche räumliche Struktur aufweist. Grün eingerahmt sind die auch hier in den Peptiden gefundenen Schnittstellen. Nt: N-terminales Ende, Ct: C-terminales Ende, ECL: extrazelluläre Schleife (verändert nach KLEYMAN et al. 2009).

Zusammengefasst haben wir in künstlichen Peptiden aus extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC mehrere Schnittstellen gefunden, die spezifisch bei Inkubation mit immobilisiertem Sammelurin aus megalindefizienten Mäusen auftraten. Position sowie die sie verursachenden Proteasen sind zum Teil bekannt.

5 Diskussion

5.1 anti-GBM-GN und RME-Defizienz in der Maus und ihr Einfluss auf renale Natriumtransporter und Wasserkanäle

In der vorliegenden Arbeit wurden unter der Bedingung einer rasch voranschreitenden GN (*rapid progressive glomerulonephritis*) Natriumtransporter und Wasserkanäle des proximalen und distalen Tubulus sowie des Sammelrohrepithels mithilfe biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Die GN wurde durch Injektion von gegen die GBM gerichteten Antikörpern (LE HIR et al. 1998) in einer nieren-spezifischen, Megalin-teildefizienten Mauslinie induziert (LEHESTE et al. 2003, THEILIG et al. 2007). Ziel der Untersuchung war die Aufklärung einer möglichen Salz- und Wasserretention, modellhaft für das humane Krankheitsbild von Funktionsstörungen des Natrium- und Volumenhaushalts bei proteinurischen glomerulären Erkrankungen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass verminderte proximale RME mit daraus folgender niedermolekularer Proteinurie sowie die GN-induzierte glomeruläre Proteinurie mit oder ohne RME bezüglich der Volumenretention geringe Auswirkungen auf Expression und Aktivität der proximal tubulären Membrantransporter hatten. In der HENLESchen Schleife wurden keine Veränderungen festgestellt. Hingegen verursachten RME-Defizienz und glomeruläre GN allein, in Kombination miteinander zum Teil additive, wesentliche Veränderungen der Oberflächenexpression des ENaC und ein zusätzliches Auftreten von Formen seiner α - und der γ -Untereinheit mit kleinerem Molekulargewicht. Diese deuten auf die Aktivierung des ENaC und daraus eine möglicherweise resultierende erhöhte Salzretention hin. In den GN-Gruppen wurden tatsächlich signifikante Zunahmen des Blutdrucks und eine verminderte fraktionelle Natriumausscheidung nachgewiesen. Des Weiteren traten dort erhöhte Plasmacholesterinwerte auf.

Um Natriumhaushalt-bedingte Parameter unter den Gruppen vergleichbar zu halten, wurden die Tierexperimente bei einer durch die GN induzierten Proteinurie von 10-15 mg/24 h beendet, bevor Veränderungen in der GFR auftraten, wie sie bei den progressiven glomerulären und tubulointerstitiellen Schäden im Megalin-teildefizienten Genotyp beobachtet wurden (THEILIG et al. 2007). Eine defiziente RME allein führte zu

einer niedermolekularen Proteinurie, wie für diesen Genotyp schon bekannt ist (LEHESTE et al. 2003).

Da der größte Teil der Natriumreabsorption im proximalen Tubulus stattfindet, wurde dieses Segment auch als effizient zur Volumenretention beitragend angesehen, wie eine Studie in Ratten mit einer experimentellen Nephrose berichtet (BESSE-ESCHMANN et al. 2002). Der proximal tubuläre NHE3 bewerkstelligt nahezu den gesamten $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austausch in diesem Segment. NHE3 ist der effizienteste proximale Natriumtransporter und ist weiterhin für die RME von Bedeutung aufgrund seiner Fähigkeit, Lysosomen zur vollständigen Rezeptor-Liganden-Dissoziation anzusäuern (GEKLE et al. 1999). Die NHE3-Aktivität kann anhand der Biosyntheserate, der Umverteilung entlang der Mikrovilli in der BBM (YANG et al. 2007) und der Ansäuerungskapazität in BBM-Vesikeln bestimmt werden; letztere kann auch zur Messung seiner Gesamtaktivität verwendet werden (CASSANO et al. 1984). Bei den Untersuchungen konnten für NHE3 sowohl bei der durch den Genotyp bedingten reduzierten RME allein (eine Form der tubulären Proteinurie) als auch unter GN und RME keine wesentlichen Veränderungen der Biosynthese des Transporters und seiner Lokalisation in der BBM beobachtet werden. Die drastische Reduktion des proximalen endosomalen Vesikelapparates einschließlich der *recycling*-Endosomen, der bekanntlich die NaPi-IIa- Rückgewinnung erheblich beeinflusst (BACHMANN et al. 2004), schien die Lokalisation von NHE3 in der BBM nicht zu beeinträchtigen.

Jedoch wurde eine Abnahme der NHE3-spezifischen Ansäuerung der BBM-Vesikel in beiden Genotypen mit GN festgestellt, die damit aber ebenfalls nicht megalinabhängig war. Diese Abnahme schien zudem durch eine andere, EIPA-resistente NHE-Isoform kompensiert zu werden, so dass es in der Summe nicht zu einem allgemeinen Ausfall der Ansäuerung der BBM-Vesikel kam. Daher kann geschlossen werden, dass Expression und die Abnahme der Aktivität von NHE3 bei GN nicht von Megalin abhängig waren.

Die beiden anderen Produkte der BBM, NaPi-IIa und AQP1, zeigten ähnliche Ergebnisse. Megalindefizienz an sich verursachte eine reduzierte RME dieser Produkte, was zu ihrer erhöhten Akkumulation in der BBM führte, übereinstimmend mit früheren Befunden über die NaPi-IIa-Expression (BACHMANN et al. 2004). Die GN-Gruppen zeigten eine verminderte NaPi-IIa- und AQP1-mRNA- und Proteinexpression, wobei die immunreaktiven Signale gleichermaßen in megalinpositiven und megalindefizienten pro-

ximalen Epithelien der megalindefizienten Gruppe reduziert waren. Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit Befunden aus dem anti-Thy1-GN-Modell in der Ratte überein, wo die NaPi-IIa- und AQP1-Proteinexpression verringert waren, im Unterschied zur vorliegenden anti-GMB-GN jedoch auch eine reduzierte NHE3-Expression gefunden wurde (GADAU et al. 2009). In einem durch HgCl₂ in Ratten induzierten nephrotischen Syndrom war die Proteinmenge von NHE3 ebenfalls verringert (KIM et al. 2006). Der Grund für die Verminderungen der proximalen Transporter bleibt noch festzustellen. Eine mögliche Ursache ist die Schädigung der BBM. Funktionell könnte die Abnahme von AQP1 und die daraus folgende Reduktion der proximal transzellulären Wasserpassage den tubuloglomerulären *feedback*-Mechanismus aktivieren, welcher bei AQP1-defizienten Mäusen (SCHNERMANN et al. 1998) einen erhöhten Wasser- und Salzzufluss zum distalen Nephron verhindert. Die Aktivierung des tubuloglomerulären *feedback* bei Nephrosen kann für die Stabilisierung des Natrium- und Wasserzuflusses in die der MD nachgelagerten Segmente wichtig sein (ICHIKAWA et al. 1983).

Weder Expression noch Aktivität von NHE3, NaPi-IIa und AQP1 zeigen in unserem Modell eine Vereinbarkeit mit einer proximal-tubulären Natriumretention in einer anti-GBM-GN und können somit die bei Puromycin-Aminonukleosid-induzierter Nephrose erhobenen Daten für den Fall der anti-GBM-GN nicht bestätigen (BESSE-ESCHMANN et al. 2002). In gleicher Art unterstützten frühere Mikropunktionsstudien keine direkte Rolle des proximalen Tubulus bei der Natriumretention bei GN. Andere Studien über experimentelle anti-GBM-GN zeigten eine gleiche fraktionelle Reabsorption durch den proximalen Tubulus und die HENLESche Schleife bei Kontrollen und anti-GBM-behandelten Ratten (SIMON et al. 1989), und Ratten mit einseitiger Nephrose zeigten eine reduzierte Natriumreabsorption im PCT und im TAL (ICHIKAWA et al. 1983).

Nicht vorhandene Änderungen der juxtaglomerulären COX-2-Expression (THEILIG et al. 2006) und der RAAS-Parameter stützen weiterhin unsere Schlussfolgerung und sind zum Teil übereinstimmend mit vorangegangenen Arbeiten (SIMON et al. 1989, DECHOW et al. 2001, BISTRUP et al. 2005, GADAU et al. 2009). Unveränderte COX-2- und Reninsignale in der Immunhistochemie sowie eine unveränderte Plasma-Aldosteronaktivität weisen auf die Abwesenheit systemischer Einflüsse für die Regulation des ENaC in der anti-GBM-GN der Maus hin.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie betreffen das Sammelrohrsystem. Sowohl in den megalindefizienten Kontrollen als auch in beiden GN-Gruppen waren die Expressi-

on von α - und γ ENaC in der PM beim Nachweis im Western Blot (*full-length*-Banden, zusammen mit den kleineren Banden) und in der Immunhistochemie erhöht. Dies deutet darauf hin, dass, trotz wesentlicher Mengenunterschiede der Proteine im Urin, sowohl bei verminderter proximaler RME (mit daraus folgender tubulärer, niedermolekularer Proteinurie), als auch bei glomerulärer Proteinurie ähnliche Veränderungen des adluminalen Zellkompartiments im Sammelrohr verursacht wurden. In einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe (GADAU et al. 2009) wurde ebenfalls gezeigt, dass sich bei glomerulärer Proteinurie im anti-Thy1-GN-Krankheitsmodell die zelluläre Lokalisation von α - und γ ENaC aus dem Zytosol in die apikale PM verschiebt. Im PAN-Modell wurde ebenfalls eine erhöhte Umverteilung der ENaC-Untereinheiten aus dem Zytosol in die apikale Plasmamembran gezeigt (KIM et al. 2004). Der Grund für diese Ereignisse im *trafficking* ohne RAAS-Veränderungen ist noch nicht geklärt. Beim nephrotischen Syndrom wurde ein Einfluss von veränderter Zusammensetzung des tubulären Proteins auf den intrazellulären *trafficking*-Apparat durch ausgelöste Signalwege bei Loslösung von der Regulation der ENaC-Expression durch Aldosteron in Erwägung gezogen (AUDIGÉ et al. 2003). Die Abwesenheit von Veränderungen der β ENaC-Untereinheit bestätigt andere Arbeiten, die disproportionale Veränderungen der ENaC-Untereinheiten bei Nierenerkrankungen und unter Natriumrestriktion zeigten, was darauf hinweist, dass β ENaC weniger an regulatorischen Prozessen beteiligt ist (GADAU et al. 2009, KIM et al. 2004, MASILAMANI et al. 2002).

Die Zunahme der Proteinmengen der ENaC-Untereinheiten in den Western Blots der Membranfraktionen waren durch selektive Erhöhungen der kleineren, 55- und 30 kDa-Banden der α -Untereinheit und der 70 kDa- γ -Untereinheit im Kortex der megalindefizienten Mäuse charakterisiert, wobei die *full-length*-Banden gleiche Intensitäten aufwiesen. Die Zunahmen der kleineren Banden waren in den GN-Gruppen mehr ausgeprägt, vorrangig bei α ENaC, wovon auch erhöhte medulläre Signale der kleineren Banden auftraten. Die Verminderung der RME rief zusätzliche Veränderungen hervor. Zunahmen der 70 kDa- γ ENaC-Bande blieben auf den Cortex beschränkt und zeigten auch Veränderungen einer zweiten, 55 kDa-Bande. Beide Banden zeigten durch GN induzierte Zunahmen; die 55 kDa-Bande zeigte keine megalinabhängigen Veränderungen durch reduzierte RME.

In einer vorigen Arbeit unserer Forschergruppe (GADAU et al. 2009) wurde ebenfalls gezeigt, dass bei der anti-Thy1-GN in Ratten kleinere Fragmente der α - und der γ -Untereinheit des ENaC auftreten. Diese Ergebnisse könnten angesichts neuerer Er-

kenntnisse von Bedeutung sein, die darauf hinweisen, dass das Auftreten kleinerer Produkte des ENaC mit geringerem Molekulargewicht mit dem enzymatischen Verdau seiner Untereinheiten zusammenhängen und dass diese Veränderungen mit einer Aktivierung des Kanals einhergehen (HUGHEY et al. 2003, HUGHEY et al. 2004, BENGRINE et al. 2007, HARRIS et al. 2007, ROSSIER & STUTTS 2009). Dieser Mechanismus wurde durch die Beobachtung erklärt, dass amiloridsensitive Natriumströme als Antwort auf extrazelluläre Serinprotease erhöht sind (VALLET et al. 1997). Exogene Zugabe von Trypsin (BENGRINE et al. 2007), Neutrophiler Elastase (HARRIS et al. 2007) oder die Wirkung der endogenen Protease Furin (HUGHEY et al. 2004) riefen ähnliche Effekte hervor. Eine proteolytische Aktivierung erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit und Aktivität des ENaC und hebt die Selbstinhibition bei erhöhtem Natriumgehalt im Tubulusharn auf (CHRAÏBI & HORISBERGER 2002, SHENG et al. 2006). Inhibitorische Domänen der ENaC-Untereinheiten, die durch Proteolyse ausgeschnitten werden können, wurden weiterhin identifiziert (CARATTINO et al. 2006, BRUNS et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass Proteasen wie Plasmin, das aus dem Urin nephrotischer Ratten gewonnen werden konnte, den ENaC aktivieren (PASSERO et al. 2008, SVENNINGSSEN et al. 2009). Plasmin kann lokal aus filtrierte Plasminogen aktiviert werden und scheint durch proteolytisches *processing* besonders wirksam bei der Gesamtkanalaktivierung zu sein (PASSERO et al. 2008). Die Passage von Plasmaproteasen durch den undichten glomerulären Filter bei GN wurde bereits nachgewiesen, so dass ein ähnlicher Mechanismus einer Proteolyse und Aktivierung des ENaC in unserem GN-Modell wirksam sein kann. Bei der Ratte erhielten wir zuvor ähnliche Ergebnisse bei der anti-Thy1-GN, wo α ENaC eine zusätzliche 65 kDa-Bande aufwies, die für die proteolytische Spaltung durch Furin typisch ist (GADAU et al. 2009, HUGHEY et al. 2004). Während die Größe des vorhandenen 70 kDa- γ ENaC-Spaltprodukts einem veröffentlichten Nachweis entspricht (PASSERO et al. 2008), bewegten sich die Zunahmen bei den α ENaC-Banden, verglichen mit bisherigen Daten, in einem etwas anderen Molekulargewichtsbereich.

Die größere von uns beobachtete 55 kDa-Bande von α ENaC kann als leicht abweichend, jedoch analog zu sonst gezeigten 60- bis 65 kDa-Bereichen angesehen werden (GADAU et al. 2009). Die 30 kDa-Bande deutet darauf hin, dass die kleinere NH₂-terminale extrazelluläre Domäne (und nicht der lange 60 kDa-Hauptteil) des geschnittenen Proteins erkannt wurde, da unser Antikörper gegen ein NH₂-terminales Fusionsprotein gerichtet war und nicht gegen Erkennungsstellen am COOH-Terminus, wie von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Dies stimmt mit vorangehenden Daten überein, die

mit gegen den NH₂-Terminus gerichtetem Antikörper, der ebenfalls eine 30 kDa-Bande erkennt, erzielt wurden (ERGONUL et al. 2006, FRINDT et al. 2008, ROSSIER & STUTTS 2009). Das 30 kDa-Fragment spiegelt auch eine Furin-abhängige Proteolyse unter stimulierten Bedingungen in einem heterologen System wider (HUGHEY et al. 2004). Jedoch ist Furin eine Protease, die ENaC intrazellulär während der Reifung im *trans*-GOLGI-Netzwerk schneidet (HUGHEY et al. 2004). Die *channel activating protease 2* (CAP2) oder TMPRSS4 kann aber ebenfalls an der gleichen Stelle wie Furin, aber auch an weiteren Stellen schneiden (GARCÍA-CABALLERO et al. 2008). Weiterhin kann angenommen werden, dass das Auftreten von α - und γ ENaC-Produkten mit Bereichen um 55 kDa mit unvollständiger Glykosylierung oder Degradation im Zusammenhang stehen könnte, möglicherweise hervorgerufen durch unzureichendes intrazelluläres *processing* oder durch Wirkung filtrierter Glykosidasen oder lokal aktivierter Deglykosylierung (ERGONUL et al. 2006). Das Konzept der ENaC-Aktivierung durch proteolytische Spaltung wird somit indirekt durch unsere Ergebnisse bei GN-assoziiierter Proteinurie unterstützt.

Eine Minderung der proximalen RME an sich war mit deutlichen Zunahmen von ENaC-Spaltprodukten verbunden, was darauf hindeutet, dass die entsprechenden Proteasen Liganden von Megalin sind. Die Daten belegen ferner, zumindest bezüglich α ENaC, dass Megalin, abhängig vom Ausmaß der Proteinurie und der daraus folgenden Sättigung der proximalen RME, auf diese Weise indirekt nachgelagerte Natriumtransporter beeinflussen kann.

Unsere Ergebnisse bestätigen folglich im Einklang mit früheren Arbeiten eine Rolle des Sammelrohrsystems als einem Brennpunkt im Nephron für eine gesteigerte Natriumretention bei proteinurischen Nierenerkrankungen (BUERKERT et al. 1991, ICHIKAWA et al. 1983, KIM et al. 2004, KIM et al. 2006, LOURDEL et al. 2005, SIMON et al. 1989). Außer der angenommenen Rolle des ENaC wurde weiterhin die primäre, aldosteronunabhängige Beteiligung der Na,K-ATPase an der distalen Natriumretention diskutiert (BESSE-ESCHMANN et al. 2002, LOURDEL et al. 2005). Es muss jedoch beachtet werden, dass eine ENaC-vermittelter Anstieg der Natriumkonzentration auch *per se* die Na,K-ATPase-Aktivität nachregulieren kann (BLOT-CHABAUD et al. 1988). Die beobachtete immunhistochemische Hochregulierung der α Na,K-ATPase im Sammelrohr würde deshalb mit dem aktivierten Transport zusätzlich zu einem Anstieg der ENaC-vermittelten intrazellulären Natriumkonzentration übereinstimmen (LOURDEL et al. 2005).

Hinweise für eine Wasserretention sind neben der reduzierten proximalen AQP1-Expression auch deutliche Abnahmen der AQP2-Expression, die im Kortex, jedoch nicht in der Medulla bei beiden GN-Gruppen gefunden wurden. Dazu war das Urinvolumen leicht erhöht, jedoch ohne Veränderung der Osmolarität. Diese Befunde zeigen keinen eindeutigen Harnkonzentrationsdefekt, bei dem neben einer verminderten AQP2-Expression auch Veränderungen des NKCC2 im TAL auftreten müssten. Zudem zeigen nephrotische Tiermodelle mit Harnkonzentrationsdefekt auch eine verringerte medulläre AQP2-Expression (APOSTOL et al. 1997, FERNÁNDEZ-LLAMA et al. 1998). Dennoch könnte die kortikale AQP2-Reduktion eine physiologisch angemessene Antwort auf eine extrazelluläre Volumenexpansion repräsentieren.

Da Lipidurie ein häufiges Phänomen bei proteinurischen Erkrankungen ist und das Plasmacholesterin bei unserem Modell erhöht war, könnten zellulär veränderte Membranlipide möglicherweise zusätzlich mit den beobachteten Veränderungen in Beziehung stehen. Zelluläre Fettsäuren können Fehlfunktionen der Zelle verursachen, und mit Fettsäuren und BSA beladene Mäuse zeigten eine systemische Wasserretention (KAMIJO et al. 2007), so dass eine veränderte transepitheliale Reabsorption von Wasser und Natrium im vorhandenen Modell mit diesen Veränderungen zusammenhängen kann. Da für NaPi-IIa, NHE3 und Aquaporine schon gezeigt werden konnte, dass sie mit *lipid rafts* assoziiert sind, kann das *trafficking* oder die Membranassoziiierung dieser Proteine in einer veränderten Cholesterinumgebung gestört sein (BOBULESCU et al. 2008, CRANE & VERKMAN 2008, INOUE et al. 2004, LEVI et al. 1990, MURTAZINA et al. 2006, ZAGER et al. 2003). Dies mag ebenso auf die distalen Epithelien zutreffen, wo gezeigt wurde, dass die Na,K-ATPase (WELKER et al. 2007), der NKCC2 (WELKER et al. 2008) und der ENaC (HILL et al. 2007) teilweise *lipid raft*-abhängig sind, wenn auch mit heterogenen funktionellen Auswirkungen, die derzeit noch nicht vollkommen verstanden sind.

5.2 Schnittstellen in den extrazellulären Schleifen von α - und γ ENaC

Im untersuchten anti-GBM-GN Tiermodell wurden sowohl unter tubulärer Proteinurie mit reduzierter RME, als auch unter glomerulärer Proteinurie bei GN kleinere Produkte der α - und γ -ENaC-Untereinheit gefunden, die vermutlich durch proteolytische Spaltung entstanden sind. Verschiedene Studien belegen eine Aktivierung des ENaC durch

proteolytische Spaltung seiner α - und γ -Untereinheit (HUGHEY et al. 2003, HUGHEY et al. 2004, BENGRINE et al. 2007, HARRIS et al. 2007, ROSSIER & STUTTS 2009).

Es sollte nach genaueren Hinweisen dafür gesucht werden, um welche Proteasen es sich handelt, die im hier untersuchten anti-GBM-Modell für die Spaltung verantwortlich sein können. Dafür wurden 9 bzw. 7 sequenzüberlappende Peptide mit je 25-26 AS, die abgeschnitten aus der extrazellulären Schleife nahe der N-terminalen Transmembrandomänen der α - bzw. γ ENaC-Untereinheit entsprachen, synthetisiert. Diese wurden mit auf aktivierten Affinitätsbeads immobilisiertem Sammelurin aus Mäusen mit einer niedermolekularen Proteinurie inkubiert und danach mit Hilfe der MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert (SCHLÜTER et al. 2003). Dabei wurden vollständige und gespaltene Peptide detektiert. Produkte, die eine Abweichung von unter 100 *parts per million* zur theoretischen Größe eines Produktes aufwiesen und nicht aus einer Proteolyse vom Rande her entstanden, wurden berücksichtigt. Anhand der Fragmente und mithilfe der öffentlich verfügbarer Proteomik-Datenbanken und Software (MEROPS, ExPASy Proteomics tool Peptide cutter) wurden nach Schnittstellen bekannter Proteasen gesucht.

In den α ENaC-Peptiden wurden zwei Schnittstellen für Furin und TMPRSS4, sowie eine Schnittstelle mit einer Konsensussequenz für eine Schnittstelle des renalen Kallikrein 1 identifiziert (Tab. 10). Die letzten 6 Peptide von α ENaC waren sehr instabil und wurden ohne Entstehung stabiler Produkte gespalten. Sie entsprechen dem Bereich, wo die native Untereinheit N-Glykosylierungen aufweist, die sie vor proteolytischer Spaltung schützen. Aus demselben Grund wird die extrazelluläre Schleife der β ENaC-Untereinheit nicht proteolytisch gespalten, die eine stärkere N-Glykosylierung aufweist (ROSSIER & STUTTS 2009). Für γ ENaC wurden weitere Schnittstellen für Furin/TMPRSS4, Plasmin und das renale Kallikrein 1 identifiziert (Tab. 12). Die weiteren Schnittstellen, für die keine Proteasen identifiziert werden konnten, bieten Raum für spätere Untersuchungen.

In der Literatur sind bereits verschiedene Proteasen bekannt, die ENaC schneiden und somit aktivieren können. Die Wirkung extrazellulärer Proteasen erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit und Aktivität des ENaC und hebt die Selbstinhibition bei erhöhtem Natriumgehalt im Tubulusharn auf (CHRAÏBI & HORISBERGER 2002). Schlüssel-Histidinreste in den extrazellulären Schleifen, die die Na^+ -Selbstinhibition modulieren, liegen nahe Furin-Schnittstellen (SHENG et al. 2006).

Für die α ENaC-Untereinheit ist eine Proteolyse durch die endogene Serinprotease Furin an den Positionen R205↓D206 und R231↓S232 mit dem Erscheinen eines 65 kDa großen Fragmentes bekannt (HUGHEY et al. 2004). Dadurch wird eine 26-mer inhibitorische Domäne aus der extrazellulären Schleife von α ENaC entfernt (CARATTINO et al. 2006). Furin ist eine endogene Protease, die bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen im intrazellulären *trans*-GOLGI-Netzwerk eine Rolle spielt (Übersicht in THOMAS 2002). Die Furin-Schnittstellen ist zugleich für TMPRSS4 (CAP2) spezifisch (GARCÍA-CABALLERO et al. 2008). Diese ist eine sind Typ II Transmembran-Serinprotease (Übersicht in HOOPER et al. 2001).

Für γ ENaC wurden ebenfalls mehrere Schnittstellen und Proteasen beschrieben. Furin schneidet γ ENaC hier nur einmal posttranslational an Stelle R143↓E144 (HUGHEY et al. 2004). Die Furin-Schnittstelle ist hier ebenfalls für TMPRSS4 spezifisch (GARCÍA-CABALLERO et al. 2008).

Ein zweiter Schnitt in γ ENaC kann durch die Protease Prostasin (*channel activating protease 1*, CAP1) an Position GRKR186↓K187 erfolgen, wodurch eine 43-mer inhibitorische Domäne mit einer Größe von 70 kDa freigesetzt wird (BRUNS et al. 2007). Prostasin ist eine mit GPI-Anker in der äußeren Schicht der Lipid-Doppelmembran inserierte Serinprotease (VALLET et al. 1997). In den künstlichen Peptiden konnte jedoch keine spezifische Prostasin-Schnittstelle gefunden werden.

PASSERO et al. (2008) fanden eine für Plasmin spezifische Schnittstelle (IHKA196↓S197), die auch hier nachgewiesen wurde. Alternativ zu Prostasin kann Plasmin auch die inhibitorische Domäne freisetzen. Plasmin ist keine intrazelluläre oder membrangebundene Protease, sondern gelangt bei einer GN als das Zymogen Plasminogen durch den defekten Filtrationsapparat aus dem Blutplasma in den Tubulusharn. Dort kann es durch im CNT und CD exprimierte Proteasen wie *tissue type plasminogen activator* und *urokinase type plasminogen activator* (Urokinase) oder Kallikrein 1 proteolytisch in Plasmin umgewandelt werden. Auf diese Weise aktiviert, kann Plasmin zu einer Spaltung von ENaC führen (SVENNINGSEN et al. 2009).

Von Kallikrein wurde ebenfalls berichtet, dass es ENaC direkt oder indirekt über Aktivierung einer anderen Protease schneidet und dabei ein 70 kDa Fragment entsteht (LOFFING & KORBMACHER 2009, PICARD et al. 2008).

TMPRSS4 (*channel activating protease 2*, CAP2) und die verwandte Typ II Transmembran-Serinprotease Matriptase (*channel activating protease 3*, CAP3) können in

einer proteolytischen Kaskade nacheinander aktiviert werden und anschließend ENaC aktivieren (VUAGNIAUX et al. 2002, ANDREASEN et al. 2006). Dafür ist kein katalytisch aktives Protsasin notwendig (ANDREASEN et al. 2006). Die proteolytische Aktivierung von ENaC in der anti-GBM-GN könnte über die nichtendogene Protease Plasmin erfolgen, die bei Proteinurie im Tubulusharn erscheint und durch lokale Proteasen aus ihrer inaktiven Vorstufe Plasminogen gebildet werden kann, sowie durch die Transmembranprotease TMPRSS4, die den Harn sezerniert werden könnte.

6 Zusammenfassung

Ziel der Untersuchung war die Aufklärung einer möglichen Salz- und Wasserretention, modellhaft für das humane Krankheitsbild von Funktionsstörungen des Natrium- und Volumenhaushalts bei proteinurischen glomerulären Erkrankungen. Es konnten in dieser Arbeit renale klinische Veränderungen bei anti-GBM-GN identifizieren können, die für Volumenretention, Bluthochdruck und Ödembildung bei GN oder nephritischem Syndrom des Menschen von Bedeutung sein können. Unser Modell weist darauf hin, dass bei GN sowohl eine veränderte Filtratzusammensetzung als auch proximal tubuläre RME, die von Megalin kontrolliert werden, wesentliche bestimmende Faktoren der nierenbasierten Salzretention und Volumenexpansion sind. Während proximal tubuläre Membrantransporter hieran nicht kausal beteiligt zu sein scheinen, können die erhöhte Expression der α - und γ ENaC-Untereinheiten in der Zellmembran, sowie deren strukturelle Veränderungen, vermutlich verursacht durch die proteolytische Wirkung gefilterter Plasmaproteasen wie Plasmin oder lokaler, aktivierter epithelialer Protasen, wie Protsasin oder TMPRSS4, die sammelrohrbasierte Natriumretention bestimmen. Obwohl tubuläre und glomeruläre Proteinurie analoge Effekte auf den Natriumhaushalt hervorrufen können, dominierten die Effekte der glomerulären Proteinurie eindeutig über die der verminderten proximalen RME im Beitrag zum proteolytischen Schneiden des ENaC und zur Antinatriurese.

Kurzfassung

Humane glomeruläre Entzündungen sind ist durch anhaltende Proteinurie gekennzeichnet und können mit Natriumretention, Bluthochdruck und Ödembildung einhergehen. Hohe Mengen an filtriertem Protein gelangen in den Nierentubulus, wo sie den epithelialen Transport verändern können. Eine durch die Proteinurie stark erhöhte Proteinendozytose mit nachfolgender zellulärer Proteinüberladung kann den proximalen Tubulus beeinträchtigen, jedoch wurden auch intrinsische Funktionsstörungen distaler Epithelien beschrieben.

Um die mögliche Beteiligung einzelner Tubulussegmente an unktionsstörungen des Natrium- und Volumenhaushalts bei proteinurischer, glomerulärer Erkrankung aufzuklären, wurde eine anti-GBM-Glomerulonephritis (GN) in einer Mauslinie mit einer nierenspezifischen Megalin-Teildefizienz induziert, die eine verminderte rezeptorvermittelte Endozytose aufweist. Diese Mauslinie erlaubt es, die Bedeutung der tubulären gegenüber der glomerulären Proteinurie abzugrenzen und in beiden Fällen tubuläre Transportmechanismen zu untersuchen.

Behandelte Mäuse mit bzw. ohne durch Megalin-Teildefizienz bedingten Endozytosedefekt wiesen bei einer Proteinurie von 10-15 mg/24 h eine reduzierte fraktionelle Natriumexkretion und einen erhöhten systolischen Blutdruck auf.

Der Endozytosedefekt rief im proximalen Tubulus zum Teil eine erhöhte epitheliale Expression von NaPi-IIa und AQP1 hervor, aber keine Veränderung von NHE3. Die GN bewirkte, unabhängig von Megalin, jedoch eine generell verminderte NaPi-IIa- und AQP1-Expression, sowie eine verringerte NHE3-Aktivität, die vermutlich durch eine andere NHE-Isoform kompensiert war.

Hingegen konnten im Verbindungstubulus und im Sammelrohr eine erhöhte ENaC-Expression sowohl bei tubulärer als auch bei glomerulärer Proteinurie gefunden werden. Immunblots zeigten neben den charakteristischen *full-length*-Banden der α - und γ -Untereinheiten von ENaC signifikante Zunahmen zusätzlicher, kleinerer Spaltprodukte des Kanals. Die Auswirkungen auf diese Zunahmen waren bei der glomerulären Proteinurie stärker als bei einer durch verminderte rezeptorvermittelte Endozytose hervorgerufenen niedermolekularen Proteinurie.

Die vermehrt auftretenden, kleineren α - und γ -ENaC-Banden weisen auf eine verstärkte proteolytische Spaltung des ENaC hin, welche zur Erhöhung der Kanalaktivität beitragen kann. Erhöhte immunhistochemische Signale der α Na,K-ATPase im Verbindungstubulus deuten zusammen mit einer erhöhten apikalen ENaC-Expression und dem Auftreten vermutlicher ENaC-Spaltprodukte auf eine lokal verstärkte Natriumretention hin.

An Affinitätsbeads immobilisierter Sammelurin aus Megalin-teildefizienten Mäusen wurde mit künstlichen Peptiden inkubiert, die Sequenzen aus den extrazellulären Schleifen der α - und der γ ENaC-Untereinheit enthielten. Die Peptide wurden mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Gefundene Schnittstellen belegen die proteolytische Wirkung der filtrierten Plasmaprotease Plasmin und von aus dem Tubulusepithel sezernierten Proteasen TMPRSS4 und Kallikrein 1.

Die gewonnenen Ergebnisse stützen das Konzept einer Natriumretention sowohl bei tubulärer wie auch bei glomerulärer Proteinurie als mögliche Ursachen für Bluthochdruck und Ödembildung bei glomerulären Entzündungen.

Schlagwörter: Glomerulonephritis, Proteinurie, Volumenretention, Natriumretention, Bluthochdruck, epithelialer Natriumkanal, proteolytische Spaltung

Abstract

Human glomerular inflammatory diseases are accompanied by sustained proteinuria and may involve sodium retention, hypertension, and edema formation. High quantities of filtered protein enter the renal tubule, where they may alter epithelial transport functions. Exaggerated protein endocytosis caused by proteinuria, and consequent protein overload may affect proximal tubules, but intrinsic malfunction of distal epithelia has also been reported.

In order to elucidate a possible involvement of particular tubule segments in disturbances of sodium and volume handling occurring in proteinuric glomerulopathy, an anti-GBM glomerulonephritis (GN) was induced in a mouse strain with a kidney-specific megalin-deficiency, featuring blunted receptor mediated endocytosis.

Treated mice with or without endocytosis defect caused by megalin-deficiency showed a reduced fractional sodium excretion, and elevated systolic blood pressure when proteinuria had reached 10-15 mg/24 h.

Blunted endocytosis caused in part an increased epithelial expression of NaPi-IIa and AQP1, but did not change NHE3 abundance. However, GN reduced NaPi-IIa and AQP1 expression independently from megalin, and decreased NHE3 activity as well, which was probably balanced by another NHE isoform.

However, in the connecting tubule and the collecting duct, an increased ENaC expression was found both under tubular and glomerular proteinuria. Immunoblots of ENaC showed, in addition to the characteristic full-length bands of its α - and γ -subunits, significant increases of additional, smaller cleavage products of the channel. The effects of glomerular proteinuria dominated over those of a low molecular weight proteinuria, caused by blunted proximal endocytosis, in their contributions to the increments of smaller bands of the ENaC subunits.

Increased abundances of smaller α - and γ ENaC bands suggest a proteolytic cleavage of ENaC, which contribute to an elevated channel activation. With GN, enhanced immunohistochemical signals of α Na,K-ATPase in the connecting tubule in conjunction with

increased ENaC surface expression, and the abundance of the putative ENaC cleavage products point to locally elevated sodium retention.

Accumulated urine from megalin-deficient mice was immobilized to affinity beads and incubated with synthesized peptides, containing sequences from the extracellular loops of the α - and γ ENaC subunits. The peptides were subsequently analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Cleavage sites found account for the proteolytic action of the filtered plasma protease plasmin and proteases secreted from the tubular epithelium like TMPRSS4 and kallikrein 1.

The data obtained thus support the concept of sodium retention in both tubular and glomerular proteinuria as possible causes for hypertension and edema formation occurring in glomerular inflammatory diseases.

Keywords: glomerulonephritis, proteinuria, volume retention, sodium retention, hypertension, epithelial sodium channel, proteolytic cleavage

Literaturverzeichnis

Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17 (11): 2974-2984, 2006.

Abriel H, Horisberger JD. Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 516: 31-43, 1999.

Agre P. Aquaporin null phenotypes: The importance of classical physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16): 9061-9063, 1998.

Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 48(4): 1206-1215, 1995.

Anantharam A, Palmer LG. Determination of epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry from single-channel conductances. *J Gen Physiol* 130(1): 55-70, 2007.

Andreasen D, Vuagniaux G, Fowler-Jaeger N, Hummler E, Rossier BC. Activation of epithelial sodium channels by mouse channel activating proteases (mCAP) expressed in *Xenopus* oocytes requires catalytic activity of mCAP3 and mCAP2 but not mCAP1. *J Am Soc Nephrol* 17(4): 968-976, 2006.

Apostol E, Ecelbarger CA, Terris J, Bradford AD, Andrews P, Knepper MA. Reduced renal medullary water channel expression in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 8(1): 15-24, 1997.

Audigé A, Yu ZR, Frey BM, Uehlinger DE, Frey FJ, Vogt B. Epithelial sodium channel (ENaC) subunit mRNA and protein expression in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 104(4): 389-395, 2003.

Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R, Ellison DH. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat Embryol (Berl)* 200(5): 447-468, 1999.

Bachmann S, Schlichting U, Geist B, Mutig K, Petsch T, Bacic D, Wagner CA, Kaissling B, Biber J, Murer H, Willnow TE. Kidney-specific inactivation of the megalin gene impairs trafficking of renal inorganic sodium phosphate cotransporter (NaPi-IIa). *J Am Soc Nephrol* 15(4): 892-900, 2004.

Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(9): 5372-5377, 1998.

Bengrine A, Li J, Hamm LL, Awayda MS. Indirect activation of the epithelial Na⁺ channel by trypsin. *J Biol Chem* 282(37): 26884-26896, 2007.

Bernard DB, Alexander EA, Couser WG, Levinsky NG. Renal sodium retention during volume expansion in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int* 14(5):478-485, 1978.

Besse-Eschmann V, Klisic J, Nief V, Le Hir M, Kaissling B, Ambühl PM. Regulation of the proximal tubular sodium/proton exchanger NHE3 in rats with puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 13 (9): 2199-2206, 2002.

Bhalla V and Hallows KR. Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications *J Am Soc Nephrol* 19(10): 1845–1854, 2008.

Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 647(2): 169-176, 1981.

Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 265(5 Pt 2): F736-F742, 1993.

Bistrup C, Thiesson HC, Jensen BL, Skøtt O. Reduced activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is not responsible for sodium retention in nephrotic rats. *Acta Physiol Scand* 184(2): 161–169, 2005.

Blot-Chabaud M, Jaisser F, Gingold M, Bonvalet JP, Farman N. Na⁺-K⁺-ATPase-dependent sodium flux in cortical collecting tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 255(4 Pt 2): F605-F613, 1988.

Bobulescu IA, Dubree M, Zhang J, McLeroy P, Moe OW. Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule Na⁺/H⁺ exchange and ammonium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(6): F1315-F1322, 2008.

Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone-system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 116(4): 263-272, 2004.

Bruns JB, Carattino MD, Sheng S, Maarouf AB, Weisz OA, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. Epithelial Na⁺ channels are fully activated by furin- and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the gamma-subunit. *J Biol Chem* 282(9): 6153-6160, 2007.

Buerkert J, Martin DR, Trigg D, Simon EE. Sodium handling by deep nephrons and the terminal collecting duct in glomerulonephritis. *Kidney Int* 39(5): 850–857, 1991.

Butterworth MB, Frizzell RA, Johnson JP, Peters KW, Edinger RS. PKA-dependent ENaC trafficking requires the SNARE-binding protein complexin. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(5): F969-F977, 2005.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367(6462): 463–467, 1994.

Carattino MD, Sheng S, Bruns JB, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. The epithelial Na⁺ channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit. *J Biol Chem* 281(27): 18901-18907, 2006.

Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, Miller TY. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244(4909): 1195-1198, 1989.

Cassano G, Stieger B, Murer H. Na/H- and Cl/OH-exchange in rat jejunal and rat proximal tubular brush border membrane vesicles. Studies with acridine orange. *Pflugers Arch* 400(3): 309–317, 1984.

Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114(5):634-642, 2004.

Chang RL, Ueki IF, Troy JL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran. *Biophys J* 15(9):887-906, 1975a.

Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* 8(4):212-218, 1975b.

Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudo-hypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 12(3): 248-253, 1996.

Cheek DB, Perry JW. A salt wasting syndrome in infancy. *Arch Dis Child* 33(169): 252-256, 1958.

Chraïbi A, Horisberger JD. Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *J Gen Physiol* 120(2):133-145, 2002.

Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(4): 258-68, 2002.

Crane JM, Verkman AS. Long-range nonanomalous diffusion of quantum dot-labeled aquaporin-1 water channels in the cell plasma membrane. *Biophys J* 94(2): 702-713, 2008.

Custer M, Lötscher M, Biber J, Murer H, Kaissling B. Expression of Na-P(i) cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am J Physiol* 266(5 Pt 2): F767-F774, 1994.

Dechow C, Morath C, Peters J, Lehrke I, Waldherr R, Haxsen V, Ritz E, Wagner J. Effects of all-trans retinoic acid on renin-angiotensin system in rats with experimental nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(5): F909-F919, 2001.

Deschênes G, Wittner M, Stefano A, Jounier S, Doucet A. Collecting duct is a site of sodium retention in PAN nephrosis: a rationale for amiloride therapy. *J Am Soc Nephrol* 12(3):598-601, 2001.

Dijkink L, Hartog A, Deen PM, van Os CH, Bindels RJ. Time-dependent regulation by aldosterone of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in rabbit kidney. *Pflugers Arch* 438(3): 354-360, 1999.

Dijkink L, Hartog A, van Os CH, Bindels RJ. The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer. *Pflugers Arch* 444(4): 549-555, 2002.

Dillon MJ, Leonard JV, Buckler JM, Ogilvie D, Lillystone D, Honour JW, Shackleton CH. Pseudohypoaldosteronism. *Arch Dis Child* 55(6): 427-434, 1980.

Doucet A, Favre G, Deschênes G. Molecular mechanism of edema formation in nephrotic syndrome: therapeutic implications. *Pediatr Nephrol* 22(12):1983-1990, 2007.

Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C. Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase – tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2(8618): 986–989, 1988.

Epstein AA. Concerning the causation of edema in chronic parenchymatous nephritis; method for its alleviation. *Am J Med* 13(5): 556-561, 1952.

Ergonul Z, Frindt G, Palmer LG. Regulation of maturation and processing of ENaC subunits in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(3): F683–F693, 2006.

Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM. Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 274(38):27281-27286, 1999.

Fernández-Llama P, Andrews P, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper M. Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na⁺ transporters. *Kidney Int* 54(1): 170–179, 1998.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* 17(2):344-352, 1998.

Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere

gGmbH 2008. http://www.bundesverband-niere.de/files/Quasi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf (04.08.2010).

Frindt G, Ergonul Z, Palmer LG. Surface expression of epithelial Na channel protein in rat kidney. *J Gen Physiol* 131(6): 617–627, 2008.

Fuchs W, Larsen EH, Lindemann B: Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin. *J Physiol* 267(1): 137-166, 1977.

Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI: Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242(4878): 583–585, 1988.

Gadau J, Peters H, Kastner C, Kühn H, Nieminen-Kelhä M, Khadzhyrov D, Krämer S, Castrop H, Bachmann S, Theilig F. Mechanisms of tubular volume retention in immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int* 75(7):699-710, 2009.

García-Caballero A, Dang Y, He H, Stutts MJ. ENaC proteolytic regulation by channel-activating protease 2. *J Gen Physiol* 132(5): 521–535, 2008.

Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77(2): 359-396, 1997.

Garty H. Regulation of Na⁺ permeability by aldosterone. *Semin Nephrol* 12(1):24-29, 1992.

Gekle M, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gassner B, Silbernagl S. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol* 520(Pt 3): 709-721, 1999.

Gekle M. Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol* 67: 573-594, 2005.

Hager H, Kwon TH, Vinnikova AK, Masilamani S, Brooks HL, Frøkiær J, Knepper MA, Nielsen S. Immunocytochemical and immunoelectron microscopic localization of alpha-, beta-, and gamma-ENaC in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(6):F1093-1106, 2001.

Haller H, Gross WL. Glomerulonephritis. *Internist* 44: 1073–1074, 2003.

Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 11(1): 76-82, 1995a.

Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP. A de novo missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(25): 11495-11499, 1995b.

Harlow E, Lane D. Antibodies: a laboratory manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory Publications, edited by Harlow E, Lane D, New York 1988, pp. 139-243.

Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC. A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282(1): 58–64, 2007.

Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome. *Kidney International* 46(3): 823–829, 1994.

Hill WG, Butterworth MB, Wang H, Edinger RS, Lebowitz J, Peters KW, Frizzell RA, Johnson JP. The epithelial sodium channel (ENaC) traffics to apical membrane in lipid rafts in mouse cortical collecting duct cells. *J Biol Chem* 282(52): 37402–37411, 2007.

Hooper JD, Clements JA, Quigley JP, Antalis TM. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem* 276(2): 857-860, 2001.

Hollenberg NK, Adams DF. The renal circulation in hypertensive disease. *Am J Med* 60(6): 773-784, 1976.

Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR. Glomerulonephritis. *N Engl J Med* 339(13): 888-899, 1998.

Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR. Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem* 278(39): 37073–37082, 2003.

Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD, Kleyman TR. Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 279(18): 18111-18114, 2004.

Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR, Badr KF, Schor N, Troy JL, Lechene CP, Brenner BM. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 71(1): 91–103, 1983.

Inoue M, Digman MA, Cheng M, Breusegem SY, Halaihel N, Sorribas V, Mantulin WW, Gratton E, Barry NP, Levi M. Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity. *J Biol Chem* 279(47): 49160-49171, 2004.

Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(3):226-232, 2009.

Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E: Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449(7160): 316–323, 2007.

Jennette JC, Thomas DB. Crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 16(Suppl 6): 80-82, 2001.

Johnston CI. Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J Hypertens Suppl* 10(7):S13-S26, 1992.

Kalluri R, Wilson CB, Weber M, Gunwar S, Chonko AM, Neilson EG, Hudson BG. Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome. *J Am Soc Nephrol* 6(4): 1178-1185, 1995.

Kamijo Y, Hora K, Kono K, Takahashi K, Higuchi M, Ehara T, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPARalpha protects proximal tubular cells from acute fatty acid toxicity. *J Am Soc Nephrol* 18(12): 3089–3100, 2007.

Kellenberger S, Gautschi I, Rossier BC, Schild L. Mutations causing Liddle syndrome reduce sodium-dependent downregulation of the epithelial sodium channel in the *Xenopus* oocyte expression system. *J Clin Invest* 101(12): 2741-2750, 1998.

Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82(3): 735-767, 2002.

Kim SW, Wang W, Nielsen J, Praetorius J, Kwon TH, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Increased expression and apical targeting of renal ENaC subunits in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(5): F922-935, 2004.

Kim SW, Wang W, Sassen MC, Choi KC, Han JS, Knepper MA, Jonassen TE, Frøkiaer J, Nielsen S. Biphasic changes of epithelial sodium channel abundance and trafficking in common bile duct ligation-induced liver cirrhosis. *Kidney Int* 69(1): 89-98, 2006.

Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP. ENaC at the Cutting Edge: Regulation of Epithelial Sodium Channels by Proteases. *J Biol Chem* 284(31): 20447–20451, 2009.

Kliscic J, Zhang J, Nief V, Reyes L, Moe OW, Ambühl PM. Albumin regulates the Na^+/H^+ exchanger 3 in OKP cells. *J Am Soc Nephrol* 14(12): 3008-3016, 2003.

Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK, Kleyman TR. Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 273(22): 13469–13474, 1998.

Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephtrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol* 285(2):316-329, 2005.

Kriz W, Bankir L. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int* 33(1): 1-7, 1988.

Kriz W: Nieren. In: Drenckhahn D, Christ B, Bennighoff A: Anatomie. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 16. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer 2003. XI, 956 S.: zahl. Ill., graph. Darst. S. 758-790.

Lai EY, Patzak A, Steege A, Mrowka R, Brown R, Spielmann N, Persson PB, Fredholm BB, Persson AE. Contribution of adenosine receptors in the control of arteriolar tone and adenosine-angiotensin II interaction. *Kidney Int* 70(4):690-698, 2006.

Laragh JH, Angers M, Kelly WG, Lieberman S. Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man. *JAMA* 174:234-240, 1960.

Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Aucouturier P, Moskaug JO, Otto A, Christensen EI, Willnow TE. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol* 155(4): 1361-1370, 1999.

Leheste JR, Melsen F, Wellner M, Jansen P, Schlichting U, Renner-Müller I, Andreasen TT, Wolf E, Bachmann S, Nykjaer A, Willnow TE. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J* 17(2): 247-249, 2003.

Le Hir M, Haas C, Marino M, Ryffel B. Prevention of crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular membrane antibody in tumor necrosis factor-deficient mice. *Lab Invest* 78(12): 1625-1631, 1998.

Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hähnel B, Hosser H, Kriz W. Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12(10): 2060-2071, 2001.

Le Hir M. Histopathology of humorally mediated anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in mice. *Nephrol Dial Transplant* 19(7): 1875-1880, 2004.

Levi M, Baird BM, Wilson PV. Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport. *J Clin Invest* 85(1): 231-237, 1990.

Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Physicians* 76, 199-213, 1963.

Loffing J, Zecevic M, Féraillé E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, Firestone GL, Pearce D, Verrey F. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(4): F675-F682, 2001.

Loffing J, Korbmacher C. Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch* 458(1): 111-135, 2009.

Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, Schnermann J. Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice. *Am J Physiol* 277(3 Pt 2): F447-F453, 1999.

Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem* 277(40):37871-37880, 2002.

Lorenz JN, Dostanic-Larson I, Shull GE, Lingrel JB. Ouabain inhibits tubuloglomerular feedback in mutant mice with ouabain-sensitive alpha1 Na,K-ATPase. *J Am Soc Nephrol* 17(9):2457-2463, 2006.

Lourdé S, Loffing J, Favre G, Paulais M, Nissant A, Fakitsas P, Créminon C, Féraillé E, Verrey F, Teulon J, Doucet A, Deschênes G. Hyperaldosteronemia and activation of the epithelial sodium channel are not required for sodium retention in puromycin-induced nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 16(12): 3642-3650, 2005.

Luft FC. Mendelian forms of human hypertension and mechanisms of disease. *Clin Med Res* 1(4):291-300, 2003.

Marples D, Frøkiær J, Nielsen S. Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* 276(3 Pt 2): F331-F339, 1999.

Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104(7): R19-R23, 1999.

Masilamani S, Wang X, Kim G-H, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S, Nakamura K, Stokes JB and Knepper MA. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(4): F648-F657, 2002.

MacRobbie EA, Ussing HH. Osmotic behaviour of the epithelial cells of frog skin. *Acta Physiol Scand* 53: 348-365, 1961.

McDonough AA, Magyar CE, Komatsu Y. Expression of Na(+)-K(+)-ATPase alpha- and beta-subunits along rat nephron: isoform specificity and response to hypokalemia. *Am J Physiol* 267(4 Pt 1): C901-C908, 1994.

Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(4): F593-F601, 2004.

Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, Le Hir M, Wiggins R, Kriz W, Holzman LB. Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15(1):61-67, 2004.

Morris RG, Hoorn EJ, Knepper MA. Hypokalemia in a mouse model of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6): F1416-F1420, 2006.

Motoyoshi Y, Matsuoka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S, Ichikawa I. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int* 74 (10): 1262–1269, 2008.

Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42(4):1017-1019, 1992.

Murtazina R, Kovbasnjuk O, Donowitz M, Li X. Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid raft-dependent. *J Biol Chem* 281(26): 17845-17855, 2006.

Orth SR, Ritz E. Das nephrotische Syndrom. *Internist* 39: 1246–1252, 1998.

Passero CJ, Mueller GM, Rondon-Berrios H, Tofovic SP, Hughey RP, Kleyman TR. Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem* 283(52): 36586–36591, 2008.

Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, Sonderausgabe PCR 10: 92-95, 2004.

Picard N, Eladari D, El Moghrabi S, Planès C, Bourgeois S, Houillier P, Wang Q, Burnier M, Deschenes G, Knepper MA, Meneton P, Chambrey R. Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. *J Biol Chem* 283(8): 4602-4611, 2008.

Polzin D, Kaminski HJ, Kastner C, Wang W, Krämer S, Gambaryan S, Russwurm M, Peters H, Wu Q, Vandewalle A, Bachmann S, Theilig F. Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases. *Kidney Int* 78(7): 650-659, 2010.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D227-D233, 2010.

Rossier BC, Stutts MJ. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu Rev Physiol* 71: 361-379, 2009.

Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC. A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(12): 5699-5703, 1995.

Schlüter H, Jankowski J, Rykl J, Thiemann J, Belgardt S, Zidek W, Wittmann B, Pohl T. Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Anal Bioanal Chem* 377(7-8): 1102-1107, 2003.

Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier BC, Reilly RF, Reeves WB, Oberbäumer I, Tapp R, Bachmann S. Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 276(3 Pt 2): F367-F381, 1999.

Schnermann J, Chou CL, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16): 9660-9664, 1998.

Schnermann J, Briggs JP. Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int* 74(4): 418-426, 2008.

Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19(3): 282-285, 1998.

Sheng S, Carattino MD, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. Furin cleavage activates the epithelial Na⁺ channel by relieving Na⁺ self-inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6):F1488-F1496, 2006.

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79(3): 407-414, 1994.

Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme 2007. XIII, 441 S.: Ill., Graph Darst. S. 148-187.

Simon EE, Merli C, Fry B, Buerkert J. Contribution of superficial nephron segments to sodium excretion in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 36(4): 601-608, 1989.

Skou JC. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep* 24(4-5): 436-451, 2004.

Snyder PM, Cheng C, Prince LS, Rogers JC, Welsh MJ. Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem* 273(2): 681-684, 1998.

Stauss HM, Gödecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 33 (6): 1359-1363, 1999.

Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, van den Heuvel LP, Bindels RJ. Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J Am Soc Nephrol* 14(6):1419-1426, 2003.

Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17):9983-9988, 2001.

Svenningsen P, Bistrup C, Friis UG, Bertog M, Haerteis S, Krueger B, Stubbe J, Jensen ON, Thiesson HC, Uehnholt TR, Jespersen B, Jensen BL, Korbmacher C, Skøtt O. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 20(2): 233-234, 2009.

Theilig F, Câmpean V, Paliege A, Breyer M, Briggs JP, Schnermann J, Bachmann S. Epithelial COX-2 expression is not regulated by nitric oxide in rodent renal cortex. *Hypertension* 39(4): 848-853, 2002.

Theilig F, Debiec H, Nafz B, Ronco P, Nüsing R, Seybarth HW, Pavenstädt H, Bouby N, Bachmann S. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(5): F987-F994, 2006.

Theilig F, Kriz W, Jerichow T, Schrade P, Hähnel B, Willnow T, Le Hir M, Bachmann S. Abrogation of protein uptake through megalin-deficient proximal tubules does not safeguard against tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol* 18(6): 1824-1834, 2007.

Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10): 753-66, 2002.

Torretti J. Sympathetic control of renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:167-192, 1982.

Valentin JP, Ying WZ, Couser WG, Humphreys MH. Extrarenal resistance to atrial natriuretic peptide in rats with experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol* 274(3 Pt 2): F556-F563, 1998.

Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389(6651): 607-610, 1997.

Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 12(8):1599-1606, 2001.

Vehaskari VM. Heritable forms of hypertension. *Pediatr Nephrol* 24(10): 1929-1937, 2009.

Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E, Rossier BC. Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol* 120(2): 191-201, 2002.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem* 270(46): 27411-27414, 1995.

Walz G. Pathogenetische Aspekte des nephrotischen Syndroms. *Internist* 44: 1075–1082, 2003.

Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 12(12 Pt 3):205S-213S, 1999.

Welker P, Geist B, Frühauf JH, Salanova M, Groneberg DA, Krause E, Bachmann S. Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(3): R1328–R1337, 2007.

Welker P, Böhlick A, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schlüter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, Bachmann S. Renal Na-K-Cl cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(3): F789–F802, 2008.

Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J: Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16): 8460-8464, 1996.

Wright FS, Schnermann J. Interference with feedback control of glomerular filtration rate by furosemide, triflocin, and cyanide. *J Clin Invest* 53(6):1695-1708, 1974.

Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15): 8525-8529, 2000.

Yang LE, Leong PK, McDonough AA. Reducing blood pressure in SHR with enalapril provokes redistribution of NHE3, NaPi2, and NCC and decreases NaPi2 and ACE abundance. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(4): F1197–F1208, 2007.

Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Shah VO. Acute tubular injury causes dysregulation of cellular cholesterol transport proteins. *Am J Pathol* 163(1): 313–320, 2003.

Zhu H, Chao J, Guo D, Li K, Huang Y, Hawkins K, Wright N, Stallmann-Jorgensen I, Yan W, Harshfield GA, Dong Y. Urinary prostaticin: a possible biomarker for renal pressure natriuresis in black adolescents. *Pediatr Res* 65(4): 443-446, 2009.

Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(1): 31-37, 2004.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich recht herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Sebastian Bachmann für die Idee und die Ausschreibung des Projektes, die dieser Arbeit zugrunde lag, sowie für die Unterstützung bei den Publikationen und für kritische Durchsicht des Manuskripts. Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Udo Heinemann danken, der die Aufgabe des Zweitgutachters für diese Arbeit übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Franziska Theilig für die praktischen Laborarbeiten, deren Methodik ich bei ihr lernte, und die vielseitige Unterstützung vor Ort. Ich denke auch an die Mitarbeiter des Instituts für vegetative Anatomie an der Charité und danke für jegliche weitere technische und methodische und Hilfe sowie für theoretische Hinweise. Frau Pascale Schulte danke ich für das Korrekturlesen des Manuskripts. Ferner möchte ich mich herzlich bedanken bei den Kollegen aus den externen Kooperationen, die mir die Erstellung dieser Arbeit nicht zu unwesentlichem Teil ermöglichten.

Abschließend gilt mein Dank besonders meinen Eltern und Schwiegereltern für die familiäre Unterstützung im Hintergrund. Meiner Schwester Judith danke ich für die zeitweilige Unterkunft in Berlin. Meiner Frau Anja gilt zuletzt mein Dank, da sie mir während dieser Zeit in allen Höhen und Tiefen beigestanden hat und mir stets eine große Hilfe war.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Veröffentlichungen

Kastner C, Pohl M, Sendeski M, Stange G, Wagner CA, Jensen B, Patzak A, Willnow T, Bachmann S, Theilig F. Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental Glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296(4): F902-911, 2009.

Gadau J, Peters H, Kastner C, Kühn H, Nieminen-Kelhä M, Khadzhynov D, Krämer S, Castrop H, Bachmann S, Theilig F. Mechanisms of tubular volume retention in immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 75(7): 699–710, 2009.

Polzin D, Kaminski HJ, Kastner C, Wang W, Krämer S, Gambaryan S, Russwurm M, Peters H, Wu Q, Vandewalle A, Bachmann S, Theilig F. Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases. *Kidney International* 78(7): 650-659, 2010.

Schmidt W, Kastner C, Sternberg K, Allemann R, Löbner M, Guthoff R, Schmitz KP. New Concepts for Glaucoma Implants - Controlled Aqueous Humor Drainage, Encapsulation Prevention, and Local Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011 (angenommen).

Kongressbeiträge

Kastner C. Altered transporter trafficking and surface expression under proteinuria: role of endocytosis. *1st Symposium of the DFG-Research Unit FOR 667: Epithelial Mechanisms in Renal Volume Regulation*, 20.-22.09.2007, Eggsdorf.

Kastner C, Sendeski M, Wagner C, Jensen B, Patzak A, Willnow T, Bachmann S, Theilig F. Beteiligung des proximalen Tubulus und des Sammelrohrs an der Volumenretention in experimenteller Glomerulonephritis. *25. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft*, 24.-26.09.2008, Würzburg.