

5 Diskussion

Meine Untersuchungsbefunde haben neue, unerwartete Resultate für das Tamm-Horsfall Protein geliefert. Die Untersuchungen waren basierend auf der exklusiven Lokalisation der THP-Synthese im TAL, der reichlichen Synthese des Proteins sowie auf Literaturdaten, die seine zelluläre Translokation und Membraninsertion betreffen (zusammengefaßt in Serafini-Cessi F, 2003). Der zuvor vermutete Bezug zur spezifischen Transportleistung der dicken aufsteigenden Henle-Schleife im Rahmen des Harnkonzentrierungsmechanismus hat durch die vorliegenden Befunde einen neuen Aspekt gewonnen. In Anbetracht der intensiven luminalen Sekretion von THP und seiner Fähigkeit zur Polymerisierung war zuvor vermutet worden, dass THP zur Wasserimpermeabilität des TAL-Segments durch Bildung eines gelartigen Filmes entlang der luminalen Zellwand beiträgt (Hoyer SR et al, 1979). Nach der Charakterisierung der Verteilung von AQP-Isoformen in einzelnen Nephronsegmenten (Überblick in Agre P et al, 1996) wurde die Wasserimpermeabilität des TAL auf die Tatsache zurückgeführt, dass in diesem Segment keiner der beschriebenen Wasserkanäle vorhanden ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die optimalen Bedingungen für die THP-Polymerisierung (Kochsalzkonzentration von 100 mmol/L bzw. Calciumchloridkonzentration von 1 mmol/L) erst im normalen Endharn, allerdings nicht in der intratubulären Flüssigkeit des TAL gegeben sind (Serafini-Cessi F et al, 2003). Neuere Studien haben Bezüge zwischen Mutationen im UMOD-Gen und der Entwicklung zweier phänotypisch ähnlicher Erkrankungen, MCKD2 (Medulläre Zystische Nierenerkrankung Typ 2) und FJHN (Familiäre Juvenile Hyperurikämische Nephropathie), mit einem Harnkonzentrierungsdefekt aufgezeigt (Hart TC et al, 2002). Im Rahmen kindlicher Fälle des antenatalen Bartter-Syndroms wird eine drastische Störung der Harnkonzentrierung durch Ausfall der NKCC2-Transportfunktion verursacht. Es ist merkwürdig, dass in diesen Fällen eine Reduktion und fallweise sogar das beinahe komplette Fehlen von THP-Synthese festgestellt wurden (Schröter J et al, 2003). Insgesamt sprechen die oben aufgeführten klinischen Daten für eine Beteiligung von THP im normalen Ablauf des Harnkonzentrierungsmechanismus.

Zur Klärung der Rolle von THP bei der Ionentransportfunktion des TAL wurde in der vorliegenden Arbeit eine THP-Knockout Maus charakterisiert. Gen-Knockout-Modelle eignen sich gut für die Festlegung ausgefallener Funktionen und den Nachweis möglicher Kompensierungsmechanismen, sofern die Inaktivierung nicht lethal wirkt. Die komplette THP-Geninaktivierung in diesem Modell konnte mit Hilfe von immunohistochemischen sowie biochemischen Methoden mit dem Einsatz verschiedener polyklonaler Antikörper gegen THP sowie einer spezifischen Antisense-RNS-Sonde bestätigt werden.

Die in der Literatur dargestellten Fälle von Mutationen im UMOD-Gen zeigen charakteristische morphologische Veränderungen in der Niere (bilateral geschrumpfte Nieren, medulläre Zysten) sowie durch Hyperurikämie und insuffiziente Harnkonzentrierungsleistung bedingte Veränderungen (Hart TC et al, 2002). Entgegen unseren Erwartungen hatte die komplette Inaktivierung der THP-Synthese bei der Maus keine solchen Einflüsse auf die Nierenmorphologie, und auch die TAL-Zellen selbst waren nicht verändert. Es bestand daher bei THP-/- Mäusen kein Zusammenhang zu den beschriebenen morphologischen Veränderungen im Rahmen der humanen Erkrankungen MCKD2 und FJHN. Die morphologischen und funktionellen Defekte im Rahmen der MCKD2/FJHN werden offensichtlich durch Störungen der Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum und intrazelluläre THP-Akkumulation verursacht, welche letztendlich zu einer Zellmetabolismusstörung führen (Rampoldi L et al, 2003). Hyperurikämie tritt als Leitsymptom bei diesen Defekten auf. Der für die Hyperurikämie verantwortliche Mechanismus ist noch nicht endgültig geklärt, beruht aber vermutlich auf dem bestehenden Konzentrierungsdefekt, welcher eine kompensatorische Erhöhung der proximalen Harnsäureresorption zu Folge hat (Hart TC et al, 2002). Im menschlichen Organismus wird die Harnsäure nicht weiter verarbeitet und direkt über die Nieren ausgeschieden. Im Gegensatz dazu wird bei der Maus der größte Teil der schwer löslichen Harnsäure in der Leber mit Hilfe eines spezifischen, hochaktiven Enzyms (Urikase) in das leicht wasserlösliche Allantoin umgewandelt und in dieser Form ausgeschieden. Beim Menschen wurde die Urikase im Laufe der Evolution durch eine spontane Mutation inaktiviert. Insofern sind Mäuse gegenüber

Hyperurikämie viel widerstandsfähiger als Menschen. Inaktivierung des Urikase-Gens bei der Maus führt zur Entwicklung einer ausgeprägten hyperurikämischen Nierenschädigung und wirkt ohne eine Behandlung der Hyperurikämie lethal (Wu X et al, 1994). Unter Berücksichtigung der hohen Urikase-Aktivität ist bei den THP^{-/-} Mäusen selbst im Falle einer erhöhten Harnsäureresorption mit Hyperurikämie nicht zu rechnen. Die Untersuchungen unserer Kooperationspartner geben dennoch einen Hinweis auf eine erhöhte Harnsäurerückresorption bei THP^{-/-} Mäusen. Gersch MS et al haben die fraktionelle Ausscheidung von Na⁺- und Harnsäure bei THP^{-/-} und wt Mäusen verglichen (Gersch MS et al, 2005). Sie konnten zeigen, dass der Quotient aus der Harnsäure- vs. Natriumausscheidung in der THP^{-/-} Gruppe wesentlich kleiner ist bzw. dass die THP^{-/-} Mäuse pro abgegebene Na⁺-Menge eine geringere Harnsäuremenge ausscheiden als die wt Mäuse. Diese Daten deuten darauf hin, dass die THP-Inaktivierung bei der Maus eine Störung der Na⁺-Resorption im TAL verursacht.

Die Untersuchungen in Stoffwechsellkäfigen zeigten, dass THP^{-/-} Mäuse im Durstversuch ein geringeres Harnkonzentrationsvermögen hatten als die Kontrolltiere. Ihr Wasserverlust über den Urin war größer als bei wt Mäusen. Diese Tatsache könnte eine funktionelle Insuffizienz des Ionentransports im TAL bei THP^{-/-} Mäusen widerspiegeln. Da die Unterschiede in den Urinparametern erst nach einer 24h-Wasserdeprivation, nicht aber im Kontrollzustand auftraten, werden diese Störungen im Kontrollzustand vermutlich genügend kompensiert. Um mögliche Kompensierungsmechanismen aufzuschüsseln, wurde das Expressionsprofil der relevanten Ionentransportproteine bei den THP^{-/-} Mäusen im Kontrollzustand untersucht und mit dem der Wildtypiere verglichen. Der generelle Anstieg der mRNS- und Proteinproduktion der im TAL und weiter distal exprimierten Ionentransportproteine in der THP^{-/-} Gruppe spricht für eine fortlaufende Kompensierung des gegebenen Ionentransportdefektes im TAL durch eine erhöhte Synthese der distalen Ionentransportproteine. Gleichzeitig bestärkt diese Beobachtung die Hypothese, dass THP für den normalen Ablauf des Ionentransports im TAL von Bedeutung ist.

Der transzelluläre Na^+ , Cl^- -Transport im TAL wird durch eine Zusammenarbeit mehrerer Ionen-transportproteine ermöglicht (Überblick in Greger R 2000; Bachmann S et al, 1999; Jentsch TJ, 2004). Genetisch bedingte Störungen des Ionen-transportes im TAL sind im Rahmen des Bartter-Syndroms erfasst (Hebert SC, 2003). Die polare Anordnung aller Ionen-transportproteine ist für die normale TAL-Funktion ebenfalls entscheidend und erfolgt über einen komplizierten Transportapparat. In neuerer Zeit werden spezifische dynamische Lipid-Mikrodomänen (*Lipid rafts*; Simons K et al, 2000) als wichtige Strukturen für die zelluläre Sortierung von membranständigen Proteinen, deren Integrierung in die Zellmembran, sowie funktionelle Regulation und Signaltransduktion diskutiert. Dabei werden die in *Lipid rafts* integrierten Proteine über den Golgiapparat und das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert und anschließend per Exo- und Endozytose in die Membran inseriert bzw. aus ihr zurückgenommen. Es wurde gezeigt, dass die Sortierung von renalen Ionen-transportern ebenfalls über diesen Mechanismus erfolgen kann (Shlyonsky VG et al, 2003). Die spezifischen Signalsequenzen, wie z.B. der GPI-Anker, legen dabei Sortierungsrichtungen fest. THP wurde in Triton-unlöslichen Fraktionen (*Lipid rafts*) detektiert (Cavallone C et al, 2001) und besitzt einen GPI-Anker, welcher als Signal für eine luminale Translokation dient. Nach dem Einbau in die *Lipid rafts* wird THP eventuell zusammen mit NKCC2, transloziert (Frühau JH et al, 2003). Somit erfüllt THP auch die theoretischen Voraussetzungen für eine Beteiligung als Interaktionspartner bei der luminalen Translokation/Integrierung in die Plasmamembran von NKCC2 oder anderen TAL-Ionen-transportproteinen. Vergleichsweise ist das dem THP homologe GP2 entscheidend am Ablauf der regulierten Sekretion der Zymogengranula beteiligt (Fukuoka S et al, 1992). Klinische Daten (Schröter J et al, 2003) stützten ebenfalls indirekt die Möglichkeit einer Rolle von THP bei der zellulären Sortierung im TAL.

Eine Störung der Ionenresorption im TAL würde weiterhin die Ionenbeladung der Macula densa-Zellen beeinflussen und als Folge zu einer Anpassung der GFR über regulatorische Mechanismen der Macula densa führen. Die Berechnung der Creatinin-Clearance, welche als GFR-Äquivalent gelten kann, wies darauf hin, dass THP^{-/-} Mäuse im Kontrollzustand eine geringere GFR als

wt Mäuse haben. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigten die juxtaglomerulären Regelparameter COX-2 (mRNS und Protein) sowie Renin (mRNS) eine verminderte Expression bei den THP^{-/-} Mäusen. Diese Ergebnisse können auf die beschriebenen Verhältnisse zwischen der intrazellulären Ionenbeladung der MD-Zellen und der Regulation der JGA-Botensstoffe zurückgeführt werden. Die Macula densa ist bei der Säugerniere in die Regulation des Tonus der afferenten Arteriole sowie in die Steuerung der Renin-Freisetzung maßgeblich miteinbezogen (Überblick in Schnermann J, 1998). Die intrazelluläre Chloridkonzentration, die von der luminalen Chloridkonzentration bzw. Aktivität des Ionentransports in den Macula densa-Zellen abhängig ist, spielt dabei eine entscheidende Rolle (Überblick in Greger R, 1997; Schnermann J, 1998; Schnermann J, 2003). Studien der letzten Jahre lieferten den Beweis, dass die Expression von COX-2 in den Macula densa-Zellen sowie in den benachbarten TAL-Zellen die renale Reninproduktion moduliert (Harris RC, 2003; Harris RC et al, 2004). Es wurde in früheren Arbeiten demonstriert, dass Stimuli, die zu einer erhöhten Reninproduktion führen (Salzmangel, Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym, Angiotensin-Rezeptor Blockade u.a.), ebenfalls mit einem Anstieg der COX-2-Expression in der Macula densa einhergehen. Im Gegensatz dazu sind Vorgänge, welche die Reninproduktion hemmen (Stimulation von NKCC2, salzreiche Diät), mit einer erhöhten Chloridbeladung der Macula densa-Zellen und einer Verminderung der COX-2- und Reninexpression in der Macula densa assoziiert (Yang et al, 1998; Überblick in Harris RC, 2003) und führen zur Aktivierung des tubulo-glomerulären Feedback-Mechanismus (TGF). Die oben beschriebenen Zusammenhänge könnten für die detektierten juxtaglomerulären Änderungen sowie die reduzierte GFR bei den THP^{-/-} Mäusen verantwortlich sein. Die ermittelten Änderungen der JGA-Parameter weisen auf eine erhöhte Ionenbeladung der Macula densa-Zellen bei THP^{-/-} Mäusen hin, welche sich aus einem gestörten Ionentransport im TAL unter THP-Inaktivierung ergeben könnte. Weiterhin kann eine mögliche kompensatorische Anpassung der endokrinen Regulation (Erhöhung des ADH- oder Aldosteronspiegels im Plasma) die NKCC2-Aktivität u.a. in der Macula densa stimulieren und dadurch die intrazelluläre Ionenbelastung der Macula densa-Zellen beeinflussen. Die ADH-

und Aldosteronspiegel im Plasma wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Da in den Macula densa-Zellen unter normalen Bedingungen kein THP produziert wird, kann die THP-Inaktivierung keine direkte lokale Auswirkung auf die Aktivität des Ionentransports in den Macula densa-Zellen, welcher entscheidend durch NKCC2 vermittelt wird, ausüben. Unterschiedliche Aufgabestellungen von TAL- und Macula densa-Zellen (intensive Ionenrückresorption und modulierende Funktion) setzen auch für jeden Zelltyp spezifische Ionentransportmechanismen voraus. Es wurde in diesem Zusammenhang postuliert, dass die Macula densa über eine spezifische NKCC2-Isoform (B) verfügt (Payne A et al, 1993; Igarashi P et al, 1995). Die endgültige Festlegung der Lokalisation von NKCC2-Isoformen (A, B, F) in der Macula densa der Maus und eine detailliertere Aufklärung ihrer spezifischen Regulation würde bei der Klärung der Besonderheiten des hier stattfindenden Ionentransports behilflich sein.

Weiterhin kann ich aus unseren Befunden in der vorliegenden Arbeit schließen, daß die erhaltenen Daten nicht für ein charakteristisches Bild im Sinne des Bartter-Syndroms mit Polyurie, Dehydration, Hypokalämie, Nephrocalcinosis und stimulierte Prostaglandinsynthese sprechen. Dies wäre allerdings bei einer ausgeprägten Ionentransportstörung im TAL grundsätzlich zu erwarten. Das Bartter-Syndrom steht kausal mit dem Defekt eines der TAL-Ionentransportproteine (NKCC2, ROMK oder CLC-K2) bzw. mit einer mangelnden Natriumresorption im TAL in Verbindung (Überblick in Hebert SC, 2003). Eine dominante Rolle bei der Entwicklung der klinischen Symptomatik des Bartter-Syndroms wird vor allem der E2-Hyperprostaglandinämie bzw. einer gestiegenen Stimulation des EP4-Rezeptors zugeschrieben (Nüsing RM et al, 2005). Hyperprostaglandinämie und erhöhte Renin-Freisetzung sind im Rahmen des Bartter-Syndroms vermutlich durch eine gestiegene COX2-Expression in der Macula densa bedingt. Letztere resultiert aus einer mangelnden Ionenresorption in den Macula densa-Zellen (Defekt eines der TAL-Transportproteine) bzw. einer verminderten intrazellulären Ionenbeladung der Macula densa (Überblick in Hebert SC, 2003). Die beim Bartter-Syndrom defekten TAL-Ionentransportproteine sind bei den THP-/- Mäusen genetisch intakt (NKCC2, ROMK oder CLC-K2). Die Inaktivierung der entsprechenden

Ionen-transportproteine in der Maus führt zur Entwicklung einer dem Bartter-Syndrom ähnlichen Symptomatik (Takahashi N et al, 2000). Die gegebene Ionen-transportstörung bei THP-/- Mäusen ist jedoch nicht durch die fehlende Funktion eines der relevanten TAL-Ionen-transportproteine, sondern vermutlich durch eine Störung ihrer funktionellen Organisation in der Plasmamembran bedingt und hat einen milderen Charakter als die beim Bartter-Syndrom auftretenden Defekte.

Ich vertrete die Hypothese, dass THP für die Translokation bzw. Integration von TAL-Ionen-transportproteinen in die luminale Membran eine Rolle spielt. Dafür sprechen folgende publizierte Untersuchungen sowie noch nicht publizierte Daten aus unserem Labor: THP besitzt einen GPI-Anker (Cavallone D et al, 2001; Fukuoka SI et al, 2001), der für die zur apikalen Membran-gerichtete Translokation dieses Proteins verantwortlich ist. THP wird dabei in lipidreichen Domänen, den sogenannten „Lipid rafts“ voraussichtlich zusammen mit NKCC2 transloziert (Cavallone D et al, 2001; Frühauf JH et al, 2003). Hierbei könnte eine Interaktion wirksam werden. Eine Störung der Translokation bzw. Membraninsertion von NKCC2 (oder anderen luminalen TAL-Transportproteinen wie z.B. ROMK) könnte zu einer mangelnden Resorption von Na^+ und Cl^- im TAL führen. Die Charakterisierung der THP-Knockout Maus im Rahmen der vorliegenden Arbeit weist auf einen Ionen-transportdefekt im TAL unter THP-Inaktivierung hin und liefert somit Hinweise auf eine Beteiligung von THP am Ionen-transport im TAL, welcher die Schlüsselrolle beim renalen Konzentrationsmechanismus spielt. Stützend ist hier auch die Beobachtung, daß bei der antenatalen Form des Bartter-Syndroms (Hyper-Prostaglandin E-Syndrom) die THP-Produktion drastisch unterdrückt ist (Schröter J et al, 1993). Um eine mangelnde Ionenrückresorption im TAL zu kompensieren, sind meiner Ansicht nach, bei THP-/- Mäusen reaktiv die Transkription und Translation der distalen Ionen-transporter gesteigert und die GFR reduziert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind im „*American Journal of Physiology, Renal Physiology*“ publiziert (Bachmann S und Mutig K et al, 2004; doppelte Erstautorschaft).