

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

DISSERTATION

**Tubulo-epitheliale Einflüsse auf die Volumenretention bei  
akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Gadau

aus Königs-Wusterhausen

Gutachter: 1.: Prof. Dr. S. Bachmann

2.: Prof. Dr. G. Burckhardt

3.: Prof. Dr. M. Bader

Datum der Promotion: 30.01.2009

## **Danksagung**

Ohne die Unterstützung von lieben Menschen wäre meine Promotionsarbeit nicht zu Stande gekommen. An erster Stelle möchte ich meinen wunderbaren Eltern danken, deren unablässiger Zuspruch mich in Erfolgszeiten bestärkt und auf den Durststrecken gehalten hat. Meinem geliebten Sebastian sowie meinen FreundInnen verdanke ich liebevollen Zuspruch wie auch viele Auszeiten, nach denen ich erholt zurück an die Arbeit gehen konnte. Vielen Dank an meine Ricarda, die sich „fachfremd“ dieser Zeilen für deren korrekte Rechtschreibung und Grammatik angenommen hat.

Besonderer Dank gilt meiner hochmotivierten Betreuerin Dr. med. Franziska Theilig. Zu jeder Zeit hatte sie ein offenes Ohr und einen weiterführenden Hinweis für mich gefunden. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Prof. Sebastian Bachmann verdanke ich meinen Platz als Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe. Durch die Unterstützung im Rahmen eines Forschungsstipendiums konnte ich die große Freiheit nutzen, mich meinem inhaltlich überantworteten Promotionsthema intensiv zu widmen. Zudem wurden mir Erfahrungen auf Kongress- und Publikationsboden ermöglicht. Auch im Zuge der Erstellung dieser schriftlichen Dissertation konnte ich sehr von der kritischen Durchsicht und positiven Zusprache profitieren. Ebenso geht mein Dank an unsere KooperationspartnerInnen, mit denen gemeinsam dieses Projekt realisiert und fertiggestellt werden konnte.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an alle meine KollegInnen in der Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann. Ob für erste experimentelle (Steh-und-Geh)-Versuche oder intensive fachspezifische Diskussionen, immer habe ich die richtigen AnsprechpartnerInnen gefunden. Und auch an die vielen lustigen Stunden „meiner Laborzeit“ mit Thomas & Thomas, Alexandra und Kerim denke ich immer wieder gern zurück. Herzlichen Dank für die Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Grundlagen der renalen Volumenregulation .....	10
1.1.1 Tubuläre Natriumrückresorption.....	10
1.1.2 Regulation von glomerulärer Filtration und tubulärer Rückresorption.....	11
1.2 Proteinurie bei Glomerulopathien .....	12
1.2.1 Glomerulär-tubuläre Retention von Proteinen .....	12
1.2.2 Glomeruläre Proteinurie .....	12
1.2.3 Progression glomerulärer Schädigungen.....	12
1.2.4 Glomeruläre Erkrankungen .....	13
1.3 Klinische Verlaufsformen von Glomerulopathien .....	13
1.3.1 Das nephrotische Syndrom.....	14
1.3.2 Das nephritische Syndrom .....	14
1.4 Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen .....	14
1.4.1 Die Volumenmangel-Hypothese (engl. underfill-hypothesis) .....	15
1.4.2 Die Volumenüberschuss-Hypothese (engl. overfill-hypothesis) .....	16
1.5 Primäre Natriumretention bei Proteinurie .....	16
1.5.1 Veränderte Expression tubulärer Transportsysteme bei Proteinurie.....	16
1.5.2 Einflussfaktoren auf den tubulären Transport bei Proteinurie .....	17
1.6 Das Tiermodell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Anti-Thy1-GN).....	17
<b>2 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen .....	21
3.2 Analyse von Plasma- und Urinparametern.....	21
3.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung.....	22
3.4 Isolierung und Präparation der Bürstensaummembran (BBM)-Fraktion.....	23

3.4.1	Magnesium-Präzipitation .....	23
3.4.2	Enzymbestimmung .....	23
3.5	Isolierung und Präparation der Gesamtplasmamembran (GM)-Fraktion .....	24
3.6	Proteinbestimmung .....	24
3.7	Biochemische Analyseverfahren .....	24
3.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting .....	24
3.7.2	Lipidanalysen in Dünnschicht-Chromatographie (DC) und RP-HPLC .....	25
3.8	Morphologische Analyse .....	26
3.8.1	Lichtmikroskopische Analyse der Histopathologie .....	26
3.8.2	Lichtmikroskopische Analyse intrazellulärer Lipide .....	26
3.8.3	Immunhistochemische Analyse .....	26
3.9	Verwendete Antikörper .....	27
3.10	In-situ-Hybridisierung .....	28
3.10.1	cDNA-Präparation .....	28
3.10.2	Transformation .....	28
3.10.3	In-vitro-Transkription .....	28
3.10.4	Hybridisierung .....	29
3.10.5	Entfernen nicht hybridisierter Riboproben .....	29
3.10.6	Detektion der hybridisierten Riboproben .....	30
3.10.7	Quantifizierung der Signale .....	30
3.11	Statistische Auswertung .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Klinische, Plasma-, Funktions- und Urin-Parameter .....	31
4.2	Mikroskopische Charakterisierung von Anti-Thy1-GN .....	33
4.2.1	Histopathologie in der PAS-Färbung .....	33
4.2.2	Immunhistochemie mit Membranlysekomplex C5b-9-Antikörpern .....	34
4.3	Anreicherung der BBM-Fraktion .....	35
4.4	Expressionsraten tubulärer Transportproteine in Westernblot-Analysen .....	36
4.4.1	Transportproteine im proximalen Tubulus (BBM-Fraktion) .....	36
4.4.2	Transportproteine der GM-Fraktion im Nierenkortex .....	36

4.4.3	Transportproteine der GM-Fraktion in der Nierenmedulla.....	36
4.4.4	Veränderungen der Transportproteine in der Immunhistochemie .....	40
4.5	Analysen der Transkription von NKCC2 und NCC.....	45
4.6	Veränderungen systemisch-endokriner Parameter.....	47
4.6.1	Bestimmung der Konzentration von ADH.....	47
4.6.2	Bestimmung der Enzymmenge von 11- $\beta$ -HSD2.....	47
4.6.3	Veränderungen von Renin-mRNA, Renin-Protein und PRA.....	47
4.7	Lipidzusammensetzungen von BBM-, kortikaler und medullärer GM-Fraktion.....	49
4.8	Intrazelluläre Lipidablagerungen .....	50
4.9	Veränderungen im mikrotubulären Netzwerk.....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1	Klinische und laborchemische Veränderungen.....	54
5.2	Histopathologische Veränderungen .....	56
5.3	Immunreaktion bei Anti-Thy1-GN .....	57
5.4	Expressionveränderungen tubulärer Transportproteine .....	58
5.4.1	Veränderungen im proximalen Tubulus.....	58
5.4.2	Veränderungen im distalen Tubulus und Sammelrohr.....	59
5.5	Einfluss systemischer Volumenregulationssysteme.....	63
5.6	Intrazelluläre Lipidablagerung und Membranzusammensetzung .....	64
5.7	Desorganisation im mikrotubulären Netzwerk .....	66
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>80</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>81</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

11- $\beta$ -HSD2	11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Isoform 2
Abb.	Abbildung
ACE	engl. <i>angiotensin converting enzyme</i>
ADH	antidiuretisches Hormon
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Anti-Thy1-GN	Anti-Thy1-Glomerulonephritis
AP	Alkalische Phosphatase
AQP1	Aquaporin Isoform 1
AQP2	Aquaporin Isoform 2
ATP	Angiotensin-Triphosphat
BBM	engl. <i>brush border membrane</i> (Bürstensaummembran)
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Caco	Cacodylat-Puffer (Cacodylsäure-Natriumsalz-Aqua dest.)
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
ebd.	ebenda
EDTA	engl. <i>ethylene diamine tetracetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGTA	engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> (Ethylenglycoltetraessigsäure)
ENaC	epithelialer Natriumkanal
frdl. überl.	freundlichst überlassen
GBM	glomeruläre Basalmembran

GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GM	Gesamtplasmamembran
GN	Glomerulonephritis
H <sub>2</sub> O	Wasser
Haes	Hydroxyethylstärke
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HDL	engl. <i>high density lipoprotein</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPTLC	engl. <i>high performance thin layer chromatography</i>
HRP	engl. <i>horse rabbish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IgA	Immunglobulin A
ISH	In-situ-Hybridisierung
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KG	Körpergewicht
LB	Luria Berta (Medium: Bacto-Trypton, Hefeextrakt, NaCl)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> (messenger-Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
NaPi-IIa	Natrium-Phosphat-Cotransporter Isoform 2a
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NHE3	engl. <i>sodium hydrogen exchanger</i> (Natrium-Protonen-Austauscher 3)
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter Isoform 2
PAN	Puromycin-Aminonukleosid
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PAS	engl. Perjodic-acid-Schiff stain
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	engl. <i>polymerase chaise reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Perfluoroalkoxy
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PRA	Plasma-Renin-Aktivität
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RP-HPLC	engl. <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeit-Chromatographie mit Umkehrphase)
SD	engl. <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek.	Sekunden
SGK	Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase
SOC	SOB ( <i>super-optimal-broth</i> )-Glukose (Medium)
sog.	sogenannt
SSC	engl. <i>standard sodium citrate</i> (NaCl-Citrat-Puffer)
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TGF	tubuloglomerulärer Feedback
TGF- $\beta$	engl. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
t-RNA	engl. <i>transfer ribonucleic acid</i> ( <i>transfer</i> -Ribonukleinsäure)
vgl.	vergleiche
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der renalen Volumenregulation

Die Nieren spielen die zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Elektrolyt- und Volumenhomöostase. Das innere Milieu im Organismus muss eng reguliert und angesichts sich ständig ändernder Außenbedingungen kontinuierlich angepasst werden. Hauptfunktion der beim Menschen etwa 1 000 000 Glomeruli jeder Niere ist die Filtration niedermolekularer Stoffwechselprodukte aus dem Plasma unter gleichzeitiger Retention von Makromolekülen. Trotz der täglichen Produktion von 180 Litern Tubulusfiltrat, dem Primärharn, werden der Blutproteingehalt sowie das zirkulierende Blutvolumen durch die Mechanismen der glomerulären Filterfunktion und der tubulären Rückresorption aufrechterhalten. Stellgröße der Volumenregulation ist der Gehalt von Natrium, dem Hauptelektrolyten im extrazellulären Milieu (Luft 1999). Positive oder negative Natriumbilanzen führen zu Volumenproblemen (ebd.).

### 1.1.1 Tubuläre Natriumrückresorption

Die Konstanz des Flüssigkeitsvolumens im Körper erfolgt durch die regulierte Filtration und Rückresorption von Natrium und Wasser an spezifischen Transportsystemen im Nephron. Glomerulär frei filtrierte Natrium wird von den Tubuluszellen luminal aufgenommen und unter Energieverbrauch an der basolateralen Seite zurück ins Blut gepumpt. Etwa 65 bis 70 % werden im proximalen Tubulus durch den Natrium-Protonen-Austauscher Typ 3 (NHE3) resorbiert (Rose 1994; Knepper und Brooks 2001). Kompensatorisch kann die Rückresorption durch den Natrium-Phosphat-Cotransporter Typ IIa (NaPi-IIa) erfolgen (ebd.). Die Diffusion von Wasser erfolgt im proximalen Tubulus sowie in der absteigenden Henle'schen Schleife durch den Wasserkanal Aquaporin Typ 1 (AQP1) (Nielsen et al. 1993).

Die Rückresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr ist für die Feinregulation verantwortlich (Rose 1994). In der Henle'schen Schleife werden 20 bis 25 %, in Konvolut und Verbindungstubulus etwa 5 % und im Sammelrohr 4 % des Natriums rückresorbiert. In der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife ist dafür neben NHE3 der Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter Typ 2 (NKCC2) verantwortlich. Die Wasserundurchlässigkeit bewirkt die Konzentrierung der Nierenmedulla sowie die Verdünnung des Tubulusfiltrats vor Eintritt in das

distale Konvolut. Für diesen Vorgang spielt NKCC2 die entscheidende Rolle (Masilamani et al. 2000). Im Konvolut wird der apikale Natriumeintritt durch den Thiazid-sensitiven Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) und den Aldosteron-sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC) gewährleistet. ENaC wird auch im Verbindungstubulus und Sammelrohr exprimiert (Duc et al. 1994) und gilt als der mengenlimitierende Faktor der spät-distalen Natriumrückresorption (Yu et al. 2005). Die Diffusion von Wasser erfolgt durch das Aquaporin Typ 2 (AQP2), das in Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln der Sammelrohr-Hauptzellen exprimiert (Nielsen et al. 1993) und über das antidiuretische Hormon (ADH) reguliert wird. Proximal wie distal ist der apikale Natriumtransport von der Aktivität der basolateral lokalisierten Natrium-Kalium-ATPase (NKA) abhängig, die energieaufwändig Natrium- gegen Kaliumionen tauscht.

### 1.1.2 Regulation von glomerulärer Filtration und tubulärer Rückresorption

Eine Sofortkorrektur von Kreislaufstörungen wird durch die vasokonstriktorischen Effekte des sympathischen Nervensystems und Angiotensin II (Ang II) möglich. Schwankungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Rückresorptionsrate im proximalen Tubulus werden durch die myogene Autoregulation sowie den tubuloglomerulären Feedback (TGF) korrigiert. Durch Konstriktion bzw. Dilatation der glomerulären Gefäße sowie Modifikation der proximalen Natriumresorption werden kurz- bis mittelfristige Korrekturen möglich (Knotek et al. 2000). Ein vermindertes Natriumangebot in der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife wird von den Zellen der Macula densa erfasst und bewirkt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Im juxtaglomerulären Apparat (JGA) wird aus Myoepithelzellen der afferenten Arteriole das Enzym Renin freigesetzt, welches Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I) umsetzt (Hierholzer und Fromm 2005). Aus diesem entsteht Ang II, welches als potenter Vasokonstriktor am peripheren Gefäßsystem und direkter Stimulator des Natrium-Protonen-Austauschs im proximalen Tubulus wirkt (Liu und Cogan 1990). Glomerulär kommt es über eine stärkere Kontraktion der efferenten als der afferenten Arteriole zum Absinken der GFR (Luft 2003). Daneben bewirkt Ang II die nicht-osmotische Ausschüttung von ADH, das im Sammelrohr die Exozytose vesikulär gespeicherter Aquaporine und deren Einbau in die Zellmembran und so die Rückresorption von Wasser steigert. In der Nebennierenrinde stimuliert Ang II die Bildung und Sekretion von Aldosteron. Dieses Mineralokortikoid aktiviert die Natriumrückresorption durch ENaC und fördert damit ebenfalls die renale Volumenretention.

## 1.2 Proteinurie bei Glomerulopathien

### 1.2.1 Glomerulär-tubuläre Retention von Proteinen

Die glomeruläre Retention bzw. Filtration von Makromolekülen wird durch die Größen- und Ladungsselektivität der Filterstrukturen sowie die hämodynamischen Kräfte in der glomerulären Strombahn bestimmt (Ibrahim et al. 2000). Der Filter besteht aus einem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) sowie interdigitierenden Fußfortsätzen epithelialer Podozyten. Physiologisch werden täglich etwa 5 g niedermolekulare Proteine in den Primärharn filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert (Brunkhorst et al. 2000). Das Glykoprotein Megalin spielt in dieser rezeptorvermittelten Endozytose eine Schlüsselrolle (Christensen und Birn 2002).

### 1.2.2 Glomeruläre Proteinurie

Glomeruläre Schädigungen resultieren durch veränderte Permselectivität der Filterstrukturen in sogenannter (sog.) glomerulärer Proteinurie (Ibrahim et al. 2000). Beim erwachsenen Menschen gilt eine Ausscheidung von mehr als 150 mg Protein im Urin als pathologisch (Rose und Fletcher 2007). Die erhöhte Durchlässigkeit führt zum vermehrten Übertritt von Proteinen in den proximalen Tubulus und übersteigt die Kapazitäten der endozytotischen Rückresorption. Der Verlust der Ladungsbarriere ermöglicht den Durchtritt von negativ geladenen Proteinen geringen Molekulargewichts und führt zur selektiven Proteinurie. Erst bei starker Schädigung passieren auch hochmolekulare Eiweiße den Filter, die Urinzusammensetzung entspricht dann weitgehend der des Plasmas. Daneben führen tubulo-interstitielle Schäden durch Beeinträchtigung der proximalen Rückresorption zur sog. tubulären Proteinurie. Massiv erhöhte niedermolekulare Plasmaproteine bei Hämolyse oder Rhabdomyolyse werden filtriert und ebenfalls unvollständig rückresorbiert, die sog. prärenale Proteinurie (Thews et al. 1999).

### 1.2.3 Progression glomerulärer Schädigungen

Glomeruläre Schädigungen schreiten unabhängig von der Grunderkrankung progredient fort und münden schließlich im Nierenversagen. Lichtmikroskopisch nachweisbar ist die Progredienz mit einem Separationsverlust zwischen Kapillarknäuel und Bowman-Kapsel im Glomerulum verbunden (Kriz und LeHir 2005). Durch proteinöse und zelluläre Überbrückungen entstehen

sog. Halbmonde (engl. *crescents*) (ebd., Kriz et al. 2003; LeHir und Besse-Eschmann 2003). Erst sekundär werden auch tubulo-interstitielle Strukturen geschädigt, womit der Verlust des reparativ-regenerativen Potentials einhergeht (Kriz und LeHir 2005). Verbunden mit Zell- und Matrixproliferation steht am Ende der irreversible Untergang von Nephronen, in den auch dann zunächst nicht-betroffene Nephronen miteinbezogen werden (ebd.).

#### 1.2.4 Glomeruläre Erkrankungen

Glomeruläre Erkrankungen wie die diabetische Glomerulosklerose oder Glomerulonephritiden sind die häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz. Ätiologisch werden primäre Glomerulonephritiden von sekundären Formen im Rahmen entzündlicher Systemerkrankungen wie Vaskulitiden oder Kollagenosen abgegrenzt (Couser 1999). Der Nachweis von Antikörpern oder Immunkomplexen ermöglicht eine serologische Klassifikation. Nach dem histologischen Befund werden mesangio- und membranproliferative, fokal sklerosierende, membranöse, *rapid progressive* oder *minimal-change* Glomerulonephritiden unterschieden (ebd.).

In Deutschland waren im Jahr 2006 etwa 87 000 Menschen terminal niereninsuffizient, jährlich kommen 16 000 Neuerkrankte hinzu (Frei und Schober-Halstenberg 2006). Diesen Patienten kann nur durch eine Nierenersatztherapie geholfen werden. Durch lange Wartezeiten auf eine Spenderniere bleiben viele Betroffene jahrelang von der Dialyse abhängig. Die Lebensqualität dieser Patienten ist stark eingeschränkt, Morbiditäts- und Mortalitätsraten sind erhöht. Dazu gehören Nierenersatztherapien zu den teuersten Therapieverfahren im Gesundheitssektor (ebd.).

### 1.3 Klinische Verlaufsformen von Glomerulopathien

Patienten mit proteinurischen Nierenerkrankungen sind häufig durch einen Zustand systemischer Volumenüberladung mit arterieller Hypertonie und ausgeprägten Ödemen gekennzeichnet. Im klinischen Alltag wird dabei zwischen nephritischen und nephrotischen Symptomkomplexen unterschieden (Brunkhorst et al. 2000). Die Zuordnung erfolgt allerdings häufig inkonstant, außerdem können zwischen beiden fließende Übergänge bestehen (Haller und Gross 2003). Meist werden dem nephritischen Syndrom akut-inflammatorische und dem nephrotischen Syndrom chronisch-degenerative Ursachen zugesprochen (Orth und Ritz 1998). Auslöser sind primäre und sekundäre Nierenerkrankungen, die mit einem Verlust der Permeabilität der glomerulären Filterstrukturen einhergehen.

Die Mechanismen, welche die Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen auslösen und unterhalten, sind seit Jahren Gegenstand intensiver Diskussion (Ibrahim et al. 2000). Allerdings konzentrierte sich die Forschung auf die Pathogenese des nephrotischen Syndroms, Untersuchungen zur nephritischen Verlaufsform fehlen fast vollständig (ebd.).

### 1.3.1 Das nephrotische Syndrom

Als nephrotisches Syndrom wird ein Symptomkomplex bei renalen Erkrankungen bezeichnet, der durch ausgeprägte Proteinurie ( $> 3500$  mg/ Tag), generalisierten Ödemen, Hypoalbuminämie sowie Störungen im Lipidstoffwechsel mit Hyperlipidämie und Lipidurie (Marsh 2002) gekennzeichnet ist. Das Ausmaß der Symptome kann beim Einzelnen beträchtlich variieren (Brunkhorst et al. 2000; Ibrahim et al. 2000). Der Verlust von Globulinen und antikoagulativen Faktoren über den Urin macht nephrotische Patienten besonders vulnerabel für Infektionen sowie thrombotisch-embolische Ereignisse (Porth 2007). Häufige Auslöser sind die *minimal-change* und membranöse GN sowie die fokal-segmentale Glomerulosklerose (Couser 1999).

### 1.3.2 Das nephritische Syndrom

Leitsymptom des nephritischen Syndroms ist die glomeruläre Hämaturie mit Akanthozyten und Erythrozytenzylindern im Urinsediment. Die Proteinurie ist meist kleiner ( $< 3000$  mg/ Tag) und selten über einen längeren Zeitraum ausgeprägt. Etwa 80 % der Patienten entwickeln arterielle Hypertonie, über 90 % generalisierte Ödeme. Das nephritische Syndrom wird durch proliferativ-inflammatorische Erkrankungen wie die IgA-Nephropathie oder die postinfektiöse GN verursacht. Mit meist raschem Nierenfunktionsverlust gehen die ANCA-assoziierte Pauci-Immun-GN und die Anti-GBM-Nephritis einher (Porth 2007; Haller und Gross 2003).

## 1.4 Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen

Das nephritische und nephrotische Syndrom sind durch Proteinurie und renale Volumenretention gekennzeichnet. Beim nephrotischen Syndrom wird die Ödempathogenese seit Jahrzehnten mit der sog. Volumenmangel-Hypothese (engl. *underfill-hypothesis*) mit hypoproteinämischen und hypovolämen Kreislaufverhältnissen erklärt. Die Volumenüberschuss-Hypothese (engl. *overfill-hypothesis*) betont dagegen eine primäre renale Volumenretention (Burton und Rose 2007).

#### 1.4.1 Die Volumenmangel-Hypothese (engl. *underfill-hypothesis*)

Grundlage dieser Hypothese ist eine Hypoalbuminämie, die über den Proteinverlust im Urin entstehen könne. Dadurch werde der kolloidosmotische Druck im Kapillarbett reduziert und Flüssigkeit trete aus dem intravasalen in den extravasal-interstitiellen Raum (Ibrahim et al. 2000). Der durch dieses nephrotische Ödem entstehende Volumenmangel im Gefäßsystem aktiviere nun die Systeme der Volumenregulation wie RAAS, sympathisches Nervensystem oder ADH. Über Erhöhung der GFR sowie der fraktionellen Resorptionsrate im Tubulus (Valentin et al. 1992) erfolge so die sekundär-reaktive Natrium- und Volumenretention (Perico und Remuzzi 1993; Brunkhorst et al. 2000). Durch den fortschreitenden Verlust von Proteinen über den Urin werde die Volumenexpansion unterhalten (Ibrahim et al. 2000).

Gegen diese Hypothese spricht die klinische Erfahrung. Bei Messungen des Plasmavolumens von Patienten mit nephrotischen Ödemen wiesen nur etwa 30 % eine Hypovolämie auf (ebd.; Dorhout Mees et al. 1984). Trotz Hypoalbuminämie wurden normale bzw. erhöhte Blutvolumina festgestellt (ebd.). Selbst eine Zunahme des Extrazellulärvolumens bis auf das Dreihundertfache, eine starke Hypoproteinämie oder eine diuretische Therapie konnten das intravasale Volumen in physiologischen Grenzen belassen (Koomans et al. 1986). Daneben sind die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) (Rodriguez-Iturbe et al. 1990) sowie das Mineralokortikoid Aldosteron bei nephrotischen Patienten häufig vermindert (Shapiro et al. 1990). Eine systemische Hypovolämie sollte aber die Aktivierung des gegenregulativen RAAS nachweisen lassen (Shapiro et al. 1986). Weiterhin steigt bei Regression des nephrotischen Syndroms die Natriumexkretion im Urin meist eher an, als das Serumalbumin normalisiert ist (Oliver und Owings 1967) und auch eine Kortikoidmedikation führt vor Normalisierung der kolloidosmotischen Druckverhältnisse zum Einsetzen der Natriurese (Koomans et al. 1987).

Um Flüssigkeit im Gefäßbett zu halten ist nicht der intravasale kolloidosmotische Druck isoliert entscheidend, sondern der transkapilläre onkotische Druckgradient (Burton und Rose 2007). Ein allmählicher Proteinabfall im Intravasalraum wie beim nephrotischen Syndrom führt über einen verminderten Albuminübertritt in den Extravasalraum auch zum onkotischen Druckabfall im Interstitium (Ellison 1999). Die parallele Reduktion beider Parameter, des intravasalen sowie des interstitiellen kolloidosmotischen Drucks, verändert den transkapillären onkotischen Gradienten meist nicht stark genug, um die Entstehung von nephrotischen Ödemen über diesen Mechanismus hinreichend zu erklären (ebd., Koomans et al. 1987).

#### 1.4.2 Die Volumenüberschuss-Hypothese (engl. *overflow-hypothesis*)

Die Volumenüberschuss-Hypothese (engl. *overflow-hypothesis*) beschreibt eine primäre renale Volumenretention, die zur Expansion des Plasmavolumens führt (Perico und Remuzzi 1993). Besonders die Ergebnisse aus tierexperimentellen Arbeiten weisen auf intrinsische Störungen im tubulären Natrium- und Wassertransport hin (Brunkhorst et al. 2000). Erst der erhöhte hydrostatische Kapillardruck bewirkt die Filtration von Flüssigkeit in das Interstitium und so das nephrotische Ödem (ebd.). So konnten im Tubulusepithel nephrotischer Nieren Veränderungen einzelner Natriumtransporter identifiziert werden, die mit einer primären Volumenretention bei proteinurischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen können (Ichikawa et al. 1983; Féraille et al. 1993; Buerkert et al. 1991; Deschenes et al. 2001).

### 1.5 Primäre Natriumretention bei Proteinurie

#### 1.5.1 Veränderte Expression tubulärer Transportsysteme bei Proteinurie

Im nephrotischen Zustand ist die Expression von Natriumtransportern der Bürstensaummembran (BBM) meist vermindert (Kim et al. 2004; Besse-Eschmann et al. 2002). Allerdings könnte durch einen veränderten Aktivitätszustand der Transporter die Natriumrückresorption auch im proximalen Tubulus gesteigert sein (ebd.; Klisic et al. 2003; Biemesderfer et al. 2001).

Als Ursache der nephrotischen Volumenretention werden Dysfunktionen distal lokalisierter Natriumtransporter angenommen. In Tiermodellen (Féraille et al. 1993; Ichikawa et al. 1983; Buerkert et al. 1991) und Mikropunktionsstudien (Deschenes et al. 2001) wurden Aktivitätssteigerungen der basolateral lokalisierten NKA im distalen Tubulus und Sammelrohr gezeigt. Apikal wurde ENaC für die gesteigerte Rückresorption von Natrium im nephrotischen Zustand verantwortlich gemacht (Kim et al. 2004). Erhöhte Expression, Akkumulation in der apikalen Zellmembran (Kim et al. 2004) sowie proteolytische Spaltung (Masilamani et al. 1999; Harris et al. 2007; Hughey et al. 2007) könnten mit einer ENaC-Aktivierung im Zusammenhang stehen. Allerdings sind Veränderungen von ENaC nicht immer nachweisbar (Audigé et al. 2003; Yu et al. 2005). Für die distalen Transporter NHE3, NKCC2, NCC (Kim et al. 2004, Fernández-Llama et al. 1998) und den Wasserkanal AQP2 wurden verminderte Expressionsraten festgestellt (ebd.; Apostol et al. 1997).

### 1.5.2 Einflussfaktoren auf den tubulären Transport bei Proteinurie

In der Pathogenese proteinurischer Erkrankungen ist die Rolle systemisch wirkender Hormone teilweise noch grundlegend unverstanden. Trotz der gesteigerten Expression von Transportern wie ENaC (Kim et al. 2004; Masilamani et al. 1999) waren RAAS-Parameter wie Renin (Rodriguez-Iturbe et al. 1990) und Aldosteron (Shapiro et al. 1990) im Blut nephrotischer Ratten vermindert. Es wurden daher Aldosteron-analoge Effekte durch die fehlende Inaktivierung von Steroiden aufgrund einer gestörten Bereitstellung der 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11- $\beta$ -HSD2) diskutiert (Vogt et al. 2002; Kim et al. 2006; Bistrup et al. 2005).

Epitheliale Transportsysteme sind weiterhin von polaren Sortierungsmustern und der zellulären Umverteilung durch Endo- und Exozytose abhängig (Jentsch et al. 2004). Im tubulären Epithel findet die endgültige Prozessierung und funktionelle Bereitstellung von Proteinen in spezifischen Membrandomänen, sog. *lipid rafts* statt (Schuck und Simons 2004). Diese frei in der Membran „schwimmenden“, dynamischen Strukturen sind durch einen hohen Anteil von Cholesterol und Sphingolipiden gekennzeichnet (Füllekrug und Simons 2004). Transportproteine werden in *lipid rafts* sortiert, separiert und konzentriert (Simons und Ikonen 2000; Simons und Toomre 2000) und so ihrer strukturellen und funktionellen Bedeutung zugeführt (Welker et al. 2007; Frühauf et al. 2007; Akhter et al. 2002; Murtazina et al. 2006; Hill et al. 2002; Inoue et al. 2004).

Für die polare Zellorganisation des Tubulusepithels spielt auch eine intakte Organisation des mikrotubulären Netzwerks, als wesentlicher Bestandteil des hochstrukturierten Zytoskeletts, eine bedeutende Rolle. Über Mikrotubuli vermittelt werden neu synthetisierte Transportproteine an den Ort ihrer Membraninsertion transportiert (Pochynyuk et al. 2007). Daher verhindert der Verlust dieser Organisation durch Colchizin, welches die Aggregation von Tubulindimeren zu Mikrotubuli unterbindet, die Bereitstellung funktionsfähiger Transportsysteme (Lötscher et al. 1999; Baus et al. 2000; Chalumeau et al. 2001). Daneben ist das mikrotubuläre Netzwerk für die endozytotische Wiederaufnahme von Proteinen wichtige Voraussetzung (Gekle et al. 1997).

### 1.6 Das Tiermodell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Anti-Thy1-GN)

Für nephritische Symptomkomplexe gilt das Modell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis (Anti-Thy1-GN) der Ratte als etabliertes Modell (Jefferson und Johnson 1999; Floege et al. 1991). Durch Injektion von Antikörpern, die gegen Thy1-Epitope auf glomerulären Mesangiumzellen

und mesangialer Matrix gerichtet sind (Nakayama et al. 1998), polyklonal oder monoklonal vom Typ OX-7 (Bagchus et al. 1986) oder Typ 1-22-3 (Shimizu et al. 1999), wird eine akute mesangioproliferative GN induziert. Die Immunantwort wird über die Komplementkaskade mit Synthese des Membranlyse-Komplexes C5b-9 vermittelt (Nangaku et al. 1999; Brandt et al. 1996). Innerhalb von 24 Stunden resultiert eine glomeruläre Mesangiolyse (ebd.), nach etwa fünf Tagen folgt die Proliferation mesangialer Zellen zu Myofibroblasten (Jefferson und Johnson 1999). Diese sind Grundlage einer mesangialen Matrixexpansion, die durch das Zytokin TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) vermittelt (Bassuk et al. 2000; Yamamoto et al. 1994) und im chronischen Zustand in Glomerulosklerose deutlich wird. Besonders das Initialstadium ist mit einer Verminderung der GFR verbunden (Jefferson und Johnson 1999). Eng korreliert mit der glomerulären Schädigung (Kriz et al. 2003) erreicht die tierartenabhängig ausgeprägte Proteinurie am fünften oder sechsten Tag ihr Maximum (Nakayama et al. 1998).

Die akute, durch einmalige Injektion induzierte Anti-Thy1-GN heilt nach vier bis sechs Wochen vollständig aus. Durch wiederholte Injektion oder unilaterale Nephrektomie kann ein chronischer Krankheitszustand mit persistierender bzw. progressiver Schädigung hervorgerufen werden (Jefferson und Johnson 1999). Bislang wurde das Modell Anti-Thy1-GN in Studien zur Nierenfunktion bei Glomerulopathien (Floege et al. 1991; Nangaku et al. 1999), zur experimentellen Hypertonie (Liebler et al. 2004; Dechow et al. 2001) sowie zur Progression von Glomerulosklerose (Bassuk et al. 2000; Yamamoto et al. 1994) verwendet.

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Glomeruläre Erkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, sind häufig mit einer renalen Volumenretention assoziiert. Das nephritische Syndrom ist ein klinischer Symptomkomplex mit Hämaturie und Proteinurie sowie generalisierten Ödemen und arterieller Hypertonie, welches sich meist als Folge akuter Glomerulonephritiden entwickelt. Das klinische Erscheinungsbild erinnert an das nephrotische Syndrom. Tatsächlich kann in der klinischen Praxis eine eindeutige Differenzierung zwischen beiden Symptomkomplexen nicht immer eindeutig vorgenommen werden (Haller und Gross 2003).

Von proteinurischen Nierenerkrankungen wie das nephritische und nephrotische Syndrom wird angenommen, dass die tubuläre Proteinüberladung nicht nur Ausdruck der glomerulären Schädigung ist, sondern auch die Progression der Erkrankung vorantreiben kann. Es scheint, dass die nephrotische und nephritische Volumenretention durch primäre Veränderungen im renalen Natriumumgang verursacht ist. Um die zu Grunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, konzentrierte sich die Forschung der letzten Jahre auf nephrotische Syndrom (Ibrahim et al. 2000). Bei diesem wurden veränderte tubulär-epitheliale Transportsysteme festgestellt, die mit der gesteigerten Rückresorption von Natrium und Wasser im Zusammenhang stehen könnten.

Da Erkenntnisse zur Pathogenese der nephritischen Volumenretention fast vollständig fehlen (Buerkert et al. 1991), sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Hypothesen, die für das nephrotische Syndrom diskutiert werden, auch beim nephritischen Krankheitszustand geprüft und ggf. genauer charakterisiert werden. In einem akuten glomerulonephritischen Tiermodell mit Proteinurie, dem Modell der Anti-Thy1-GN, sollte das Tubulusepithel auf Veränderungen im Ionentransport untersucht werden, die mit der Volumenretention beim nephritischen Syndrom assoziiert sein könnten. Da der Zustand einer gestörten Volumenhomöostase durch Verschiebung der Natriumbilanz verursacht ist (Luft 1999), wurden die epithelialen Natriumtransporter entlang des Nephrons untersucht, also im proximalen und distalen Tubulus sowie im Sammelrohr. Es sollte die Hypothese getestet werden, dass die tubuläre Proteinüberladung beim nephritischen Syndrom mit Veränderungen in Expression und zellulärem Verteilungsmuster tubulo-epithelialer Natriumtransporter einhergeht, vergleichbar den Beobachtungen beim nephrotischen Syndrom (Kim et al. 2004; Besse-Eschmann et al. 2002; Féraïlle et al. 1993). Die Veränderungen sollten für die einzelnen Tubulussegmente identifiziert und ggf. spezifiziert werden.

Entgegen der sog. Volumenmangel-Hypothese (*underfill-hypothesis*) lässt sich bei Patienten mit nephrotischem Syndrom meist keine Aktivierung der systemischen Volumenregulation nachweisen (Rodriguez-Iturbe et al. 1990; Shapiro et al. 1990). Um den Einfluss dieser Systeme für die nephritische Volumenretention abschätzen zu können, sollten Faktoren des RAAS sowie ADH bei den glomerulonephritischen Versuchstieren gemessen und unter den Gesichtspunkten der gängigen Hypothesen diskutiert werden.

Im nephrotischen und nephritischen Krankheitszustand kommt es zu Lipidurie und anderen Störungen im Lipidmetabolismus (Marsh 2002). Es sollte untersucht werden, ob die tubuläre Überladung mit Lipiden und Lipoproteinen zu histologisch erkennbaren Veränderungen der Tubulusepithelzellen führt. Da die Zusammensetzung epithelialer Membranen die Funktion von Stofftransporten beeinflussen kann (Jentsch et al. 2004), sollten für den nephritischen Zustand mögliche Zusammenhänge zwischen Lipidurie, verändert zusammengesetzten Membranlipiden und der Funktion der tubulären Natriumtransporter untersucht werden.

Auch der Verlust der strukturierten Organisation des zytoskelettären Netzwerkes geht mit Beeinträchtigungen des tubulo-epithelialen Transports einher. Dies konnte auch in nephrotischen Rattennieren gezeigt werden (Lötscher et al. 1999; Baus et al. 2000; Chalumeau et al. 2001). Es sollte für den nephritischen Zustand geprüft werden, ob die tubuläre Proteinüberladung zu vergleichbaren Schäden von mikrotubulären Strukturen führt und mit der regulären Expression von Natriumtransportern bzw. deren geregelten Transportvorgängen interferieren kann. Dabei waren auch Störungen des intrazellulären Endozytoseapparates denkbar,

Die Anti-Thy1-GN ist ein etabliertes Tiermodell der Ratte (Jefferson und Johnson 1999; Floege et al. 1991), in dem bislang hauptsächlich glomeruläre und tubulo-interstitielle Veränderungen und deren Einfluss auf die Nierenfunktion untersucht wurden (ebd.; Nangaku et al. 1999). Auch wenn dieses Tiermodell bereits in Studien zur experimentellen Hypertonie eingesetzt wurde (Liebler et al. 2004; Dechow et al. 2001), sind die Veränderungen im tubulären Natriumtransport und deren Bedeutung für die renale Volumenretention noch weitgehend ungeklärt. Mit den oben genannten Analysen sollten daher mögliche Ursachen und Mechanismen identifiziert werden. Ziel war es auch, damit das Modell der Anti-Thy1-GN weiter zu charakterisieren. Einer solchen Charakterisierung sollten auch Messungen verschiedener Parameter in Urin und Plasma dienen. Nicht zuletzt sollten histopathologische Veränderungen in den Rattennieren mit Anti-Thy1-GN lokalisiert und spezifiziert werden. Als Vergleichsgruppe sollten gesunde Kontrolltiere dienen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen**

Die tierexperimentellen Studien wurden in Kooperation mit Prof. H. Peters, Medizinische Klinik für Nephrologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Männliche Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld), Körpergewicht (KG) 200 bis 210 g, Endgewicht etwa 260 g, wurden randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt (n = 10 pro Gruppe). Die Versorgung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter. Alle Tierversuche erfolgten unter strikter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Die Tiere der Versuchsgruppe bekamen in leichter Isofluran (Curamed, Karlsruhe)-Narkose Anti-Thy1-Antikörper, Typ OX-7 (1 mg/ kg KG in PBS) in die laterale Schwanzvene injiziert (vgl. Peters et al. 2004), die Kontrolltiere erhielten reine PBS-Injektionen. Die Antikörper stammten aus Hybridomzellen der Maus und wurden standardisiert generiert und aufgereinigt.

In metabolischen Einzelkäfigen (Tecniplast, Bagagiate, Italien) wurden 5 Tage vor sowie 5 Tage nach Injektion der Antikörper die Trink- und Urinvolumina für 24 Std. registriert. Ebenfalls 5 Tage vor sowie 5 Tage nach Injektion der Antikörper wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt (Messung 1 und 2). Der systolische Blutdruck wurde an bewusstseinsklaren Tieren durch Schwanzvenen-Plethysmographie (Life Science Instruments, Utah, USA) gemessen.

Am Tag 6 nach Injektion wurden die Tiere inhalatorisch mit Äther betäubt und durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (40 mg/ kg KG) (Sanofi-CEVA, Bad Segeberg) anästhesiert. Nach Entnahme von Blutproben wurden die Tiere laparotomiert.

### **3.2 Analyse von Plasma- und Urinparametern**

In Plasma und Urin wurden die Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid durch indirekte Ionen-selektive Elektrodenmessungen (Modular Analytics, Roche Diagnostics), die Osmolalität durch ein Osmometer (Gonotec, Berlin), Harnstoff durch eine enzymatische Methode, Kreatinin durch die kinetische Jaffé-Methode (Modular Analytics, Roche Diagnostics), Gesamtprotein, Albumin, Cholesterol und Triglyceride mit einem Standard-Analysegerät (Hitachi 747, Hitachi 911, Kits

von Roche Diagnostics) bestimmt. Kreatinin-Clearance und fraktionelle Natriumexkretion wurden standardisiert berechnet. Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wurde in 1 µl Plasma mit 24 µl Puffer (EDTA, Neomycin-Sulfat, PMSF) durch einen Radioimmunassay (Gammacoat DiaSorin, Stillwater, USA), (Beckman Multi Counter, Fullerton, USA), ADH im Plasma durch einen enzymatischen Immunoassay (Assay Designs, Ann Arbor, USA) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Rekombinantes Arg<sup>8</sup>-Vasopressin wurde für die Erstellung der Standardkurve genutzt, (Absorptionsmaxima bei 405 nm bzw. 570 nm, uQuant, Biotek-Instruments). Freies Cholesterol und Cholesterol-Ester im Urin wurden durch Hochleistungsflüssigkeit-Chromatographie mit Umkehrphase (RP-HPLC) (Shimadzu SPD-M10AVP) bestimmt. Zur Quantifizierung wurden Cholesterol-Benzoesäure und Cholesterol-Pelargonat als Standards genutzt.

### **3.3 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung**

Zur Isolierung von BBM- und Gesamtmembran (GM)-Fraktionen wurden die Nieren von je sechs laparotomierten Tieren entnommen, entkapselt, gewogen, halbiert und schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für die feinstrukturelle morphologische Analyse mit Histo- und Immunhistochemie wurden vier Rattennierenpaare pro Gruppe perfusionsfixiert. Die Aorta abdominalis distal der Abgänge der Arteriae renales wurde freipräpariert, punktiert und mit einem Polyethylenschlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich erfolgte die Eröffnung der Vena cava inferior. Die retrograde Perfusion begann mit einer Vorspüllösung (Caco/Haes [4 %]-Puffer [Haes, MgCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O], 300 mosmol, pH 7,35) für 15 Sek.. Die Fixierung erfolgte mit Caco/Haes (4 %)-Puffer mit 3 % PFA bei konstantem Höhendruck von 2,20 m für 5 Min.. So fixierte Nieren wurden entnommen, geschnitten und in Nachfixierlösungen übertragen. Gewebe für Gefrierschnitte wurde zum Schutz vor Artefakten in Sucrose/Caco-Puffer (800 mosmol, pH 7,4) bei 4 °C über Nacht immerniert. In stickstoffgekühltem 2-Methyl-Butan wurden die Gewebelöcke schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Gewebe für die Paraffineinbettung wurde in Fixierlösung (Caco/Haes [4 %]/ PFA [3 %]) bei 4 °C über Nacht belassen und im Institut für Pathologie, Charité Berlin eingebettet. Es folgten Waschungen mit Caco/Sucrose-Puffer (300 mosmol, pH 7,4) und Natriumacid (0,02 %) sowie Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1x 50 %, 2x 75 %, 1x 90 %, 2x 96 %, 3x 100 %) für je 1 Std.. Die Gewebelöcke wurden über Nacht sowie 2x für je 1 Std. bei 40 °C in Zedernholzöl eingelegt, 3x 2 Std. bei 58 °C Paraffin-behandelt, eingekapselt und mit Paraffin ausgegossen.

### 3.4 Isolierung und Präparation der Bürstensaummembran (BBM)-Fraktion

#### 3.4.1 Magnesium-Präzipitation

Die BBM-Fraktion wurde durch eine zweistufige Magnesium-Präzipitationstechnik präpariert (vgl. Biber et al. 1981). Die Zentrifugationen wurden bei 4 °C durchgeführt (Rotor JA-20, Ultrazentrifuge J2-H8, Beckman), Resuspensionsschritte erfolgten mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonocator Bandelin Sonopuls GM 70). Die bei -80 °C gelagerten, halbierten Nieren wurden in kortikale und medulläre Anteile getrennt. Die kortikalen Anteile wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörsert und in 15 ml Isolationspuffer (300 mM D-Mannitol, 5 mM EGTA, 16 mM Hepes, 10 mM Tris-Base [pH 7,5], Proteasen-Inhibitor [Complete, Roche Diagnostics, Penzberg] 1 Tablette/ 50 ml) homogenisiert. Vom Homogenat wurde 1 ml für die Bestimmung von Gesamtprotein sowie Aktivitäten der BBM-Markerenzyme Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Alkalische Phosphatase (AP) asserviert. Zu dem Ansatz wurden 21 ml einer MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Aquadest [4° C], MgCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O) bis zu einer Konzentration von 12 mmol/l gegeben. Nach 25 Min. auf Eis wurde der Ansatz bei 3.000 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand S1 wurde bei 39.000 x g für 45 Min. zentrifugiert, Pellet P1 verworfen. Pellet P2 wurde in einem 12 mM MgCl<sub>2</sub>-Resuspensionspuffer (150 mM D-Mannitol, 2,5 mM EGTA, 6 mM Tris-Base [pH 7,5], MgCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O) homogenisiert und für 25 Min. auf Eis belassen. Die Resuspension wurde bei 3.000 x g für 15 Min., der resultierende Überstand S3 bei 39.000x g für 45 Min. zentrifugiert, Pellet P3 verworfen. Pellet P4 wurde für einen weiteren Reinigungsschritt in 30 ml Resuspensionspuffer (300 mM D-Mannitol, 16 mM Hepes, 10 mM Tris-Base, pH 7,5) homogenisiert und erneut bei 39.000 x g für 45 Min. zentrifugiert. Pellet P5, die BBM-Fraktion, wurde in 200 µl des letztbeschriebenen Resuspensionspuffers aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.4.2 Enzymbestimmung

Um die Anreicherung der BBM-Fraktion im Pellet P5 zu kontrollieren, wurden die Aktivitäten der BBM-ständigen Markerenzyme GGT und AP (Liang und Sacktor 1977; Tsao und Curthoys 1982) in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten (Modular P, Roche, Hitachi) bestimmt.

### **3.5 Isolierung und Präparation der Gesamtplasmamembran (GM)-Fraktion**

Die bei -80 °C gelagerten halbierten Nieren wurden in medulläre und kortikale Anteile getrennt, in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 1,5 ml Homogenisierungspuffer (Sucrose 250 mM, TEA 10 mM, pH 7,5, Proteasen-Inhibitor [Complete]) aufgenommen. Das Homogenat wurde zentrifugiert (15 Min., 4.000 x g, 4 °C) (Tischzentrifuge Hettich, Typ 2405, Mikro 200R), Pellet P1 in Homogenisierungspuffer aufgenommen, erneut zentrifugiert und beide Überstände S1 und S2 gepoolt. Dieser Pool wurde ultrazentrifugiert (1 Std., 200.000 x g, 4 °C) (Optima, TLS 55, Beckman), Pellet P3 in 600 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen, Ultraschall (Sonocator Bandelin Sonopuls GM 70)-homogenisiert, schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.6 Proteinbestimmung**

In den Homogenaten der BBM- und GM-Fraktion wurde die Proteinkonzentration mit einem kolorimetrischen Proteinassay auf Grundlage der Biuret-Reaktion (Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt. Die Intensität des Farbkomplexes steigt mit der Konzentration an reagierendem Protein proportional an (Smith et al. 1987). Nach Inkubation bei 60 °C für 60 Min., Abkühlen auf Raumtemperatur wurde spektrophotometrisch die Extinktion aller Proben bei 562 nm gemessen. Mit Hilfe einer linearen Verdünnungsreihe mit BSA wurde die Eichkurve erstellt.

### **3.7 Biochemische Analyseverfahren**

#### **3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting**

Die Transportproteine der BBM- und GM-Fraktion sowie die 11-β-HSD2 wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) isoliert. BBM-, GM-Fraktion sowie Homogenat aus Medulla und Kortex wurden in Puffer (2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % Beta-Mercaptoethanol, 1 % Bromphenolblau, 95 mM Tris, pH 6,8) aufgenommen und zur vollständigen Denaturierung 3 Min. bei 96 °C inkubiert. Die Molekülmasse wurde mit Marker (Dual Precision Marker, BioRad Laboratories, Hercules CA, USA) bestimmt. Erreichte der Farbstoff nach etwa 3 Std. das Trenngelende, wurde die Elektrophorese beendet. Verwendet wurden Elektrophoresekammer (BioRad-Laboratories), Puffer (SDS 0,1 %, Glycin 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,3) sowie je nach Größe des Zielproteins 6 bis 12 %ige Acrylamid-Gele. Die Proteinübertragung vom Gel auf

Nitrocellulose-Membranen (Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte durch Westernblotting im *Tank-Sandwich*-System (Bio-Rad-Laboratories) mit Transferpuffer unter Kühlung des gesamten Systems. Zur Kontrolle der Banden wurden die Membranen mit Ponceau-Rot (0,5 %) angefärbt, dann gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5 % Magermilchpulver in PBS für 1 Std. geblockt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte 2 Std. bei Raumtemperatur, anschließend bei 4 °C über Nacht. Dann wurden die Membranen mit PBS/ 0,1 % Tween (pH 7,5) und PBS gewaschen und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase (engl. *horse rabbit peroxidase*, HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern (1:3.000) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen 1 Min. mit Luminol-Reagenz (ECL, Amersham, Freiburg) inkubiert, in einer Dunkelkammer die Autoradiographiefilme (Hyperfilm ECL) belichtet und entwickelt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch (Software Bio-Profil Bio-ID image, Vilber Lourmat, Frankreich). Alle Daten wurden auf  $\beta$ -Aktin als unverändertes Referenzprotein normiert.

### 3.7.2 Lipidanalysen in Dünnschicht-Chromatographie (DC) und RP-HPLC

Zur Analyse der Zusammensetzung der Membranlipide mit Dünnschicht-Chromatographie (DC) (vgl. Schmidt et al. 2001) wurden je 150  $\mu$ g isolierte Membranfraktion in 100  $\mu$ l HEPES (50 mM, pH 8,0) resuspendiert und mit 100  $\mu$ l Methanol und 100  $\mu$ l Chloroform gemischt. Nach Zentrifugation (700x g, 4 °C, 5 Min.) (Tischzentrifuge Hettich, Typ 2405, Mikro 200R) wurde die untere Phase mit 100  $\mu$ l der oberen Phase einer Lösung aus Methanol, Chloroform und HEPES (50 mM, pH 8,0) (1:1:1) gewaschen. Zentrifugation und Waschschritte wurden je 3x wiederholt. Die untere Phase wurde in Vakuumzentrifugation (Speedvac) eingeengt und in 10  $\mu$ l Chloroform aufgenommen. In einer DC mit Kieselgel-60-HPTLC-Platten und Laufmittel aus Chloroform, Methanol und Wasser (65:25:4) erfolgte die Auftrennung der Membranlipide. Als Standards wurden je 5  $\mu$ l einer Mischung aus Chloroform und Cholesterin, Phosphatidylcholin sowie Sphingomyelin (Sigma, Deutschland) je 20 mg/ml genutzt. Die Kieselgelplatten wurden nach Auftrennung getrocknet, mit 20 %iger Schwefelsäure besprüht, zur Schwärzung der Lipide bei 120 °C etwa 20 Min. inkubiert und die Banden quantifiziert (Software Alpha Ease FC Stand alone Innotech, Oldendorf, Deutschland). Die absoluten Mengen von freiem Cholesterin sowie der Ester Cholesterin-Arachidonat und Cholesterin-Lineolat in BBM und medullärer GM wurden durch RP-HPLC (Walther et al. 2004) mit freundlicher Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Kühn, Institut für Biochemie, Charité Berlin, bestimmt.

### **3.8 Morphologische Analyse**

#### 3.8.1 Lichtmikroskopische Analyse der Histopathologie

Histopathologische Untersuchungen im lichtmikroskopischen Bild erfolgten an PAS-gefärbten Schnitten. Paraffinschnitte von 5 µm wurden in einer absteigenden Xylol-Ethanolreihe (Xylol 100 % 2x 10 Min., Ethanol 2x 100 %, 2x 96 %, 1x 80 %, 1x 70 % je 5 Min.) entparaffinisiert, in 0,5 %iger Perjodsäure 10 Min. inkubiert und 10 Min. gewässert. Nach Verbleib in Schiff'schem Reagenz für 25 Min., dann in Sulfitwasser für 3x 2 Min. und einer fließenden Wässerung folgte die Inkubation mit Hämalaun nach Mayer für 3 Min. sowie eine abschließende Wässerung. Die Schnitte wurden mit Eukitt (Riedel-de-Haën, Seelze) eingedeckt und lichtmikroskopisch mit einem Mikroskop von Leica DMRB ausgewertet.

#### 3.8.2 Lichtmikroskopische Analyse intrazellulärer Lipide

Markierungen von Neutralfetten erfolgten an Paraffinschnitten von 5 µm, die entparaffinisiert, vorbehandelt und Sudan-III-gefärbt wurden. Cholesterolspezifische Detektionen erfolgten durch Filipin-Färbungen. Gefrierschnitte von 5 µm wurden mit 0,5 % BSA/ 1 % Ziegen Serum in PBS geblockt und mit in DMSO (Sigma D128-500) (1mg/ ml) aufgenommenem Filipin (Sigma F9765) (0,005 %) für 2 Std. inkubiert. Die Negativkontrollen wurden äquivalent mit reinem DMSO behandelt.

#### 3.8.3 Immunhistochemische Analyse

Gefrierschnitte (5 µm) wurden auf Chromgelatine (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haën)-beschichtete Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet, 30 Min. in PBS/ Triton (0,5 %) gelagert, mit Blocking-Reagenz (5 % Milchpulver in PBS) 1 Std. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, mit Primärantikörpern überschichtet und 1 bis 2 Std. auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4 °C belassen. Paraffinschnitte wurden entparaffinisiert, vorbehandelt und ebenfalls mit Primärantikörpern überschichtet. Waschen in PBS folgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern, welche direkt fluoreszenzmarkiert (Cy-2, Cy-3) oder Teil des Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Systems (Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-HRP-gekoppelt) (1:80 in Blocking-Reagenz für 1 Std.) waren. Nach Waschen der Schnitte

in PBS erfolgte die Entwicklung eines enzymatischen Signals mit 0,1 % mit DAB (Sigma, St. Louis, USA) und 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt) in PBS. Die Peroxidase-gefärbten Schnitte wurden mit Hämatoxytin gegengefärbt. Die Entwicklung erfolgte für Schnitte mit Inkubation gleicher Primärantikörper zeitgleich. Abstoppen erfolgte in PBS, Eindeckeln mit PBS/Glycerin. Kernfärbungen erfolgten mit DAPI; Zellkerne werden dabei blau angefärbt. Die Auswertung erfolgte qualitativ nach Signalintensität (Leica DMRB).

### 3.9 Verwendete Antikörper

Die in Immunoblotting und Immunohistochemie verwendeten Primärantikörper wurden bereits im Labor der Arbeitsgemeinschaft (AG) Prof. Dr. S. Bachmann, Institut für Anatomie, Charité Berlin, eingesetzt und charakterisiert. Verwendet wurden: anti-C5b-9-Membranlysekomplex (frdl. überl. von S. Shankland, Washington, USA), anti-AQP1 (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte IgG, Biotrend, Köln), anti-NHE3 (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte IgG, Biotrend), anti-NaPi-IIa (Serum aus Kaninchen, frdl. überl. von J. Biber, Zürich, Schweiz), anti-AQP2 (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti- $\alpha$ -ENaC, anti- $\beta$ -ENaC, anti- $\gamma$ -ENaC (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte IgG, AG S. Bachmann), anti-NKCC2 (polyklonal, Meerschweinchen-anti-Ratte, AG S. Bachmann), anti-NCC (polyklonal, R7, Kaninchen-anti-Ratte, frdl. überl. von D. Ellison, Portland, Oregon, USA), anti- $\alpha$ -NKA (monoklonal, Maus-anti-Ratte IgG, Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA), anti- $\beta$ -NKA (monoklonal, Klon C464.8, Maus-anti-Ratte IgG, Upstate Biotechnology), anti- $\beta$ -Actin (monoklonal, Klon AC-15, Maus-anti-Ratte, Aszitesfluid, Sigma, Missouri, USA), anti-Megalin (Meerschweinchen, C-terminales Peptid, AG S. Bachmann), anti-Villin (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte, frdl. überl. von D. Drenkhahn, Institut für Anatomie Würzburg), anti-Renin (frdl. überl. von A. Kurtz, Institut für Physiologie, Regensburg), anti-11 $\beta$ -HSD2 (Chemicon, Temecula, USA), anti- $\alpha$ -Tubulin (Sigma), anti-F-Aktin (Alexa 488-Phalloidin Molekularproben). Die fluoreszenzmarkierenden Sekundärantikörper (Cy-2, Cy-3) stammten von Dianova, Hamburg, die HRP-konjugierten von Dako Glostrup, Dänemark: Schwein-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG, Huhn-anti-Meerschweinchen IgG.

### 3.10 In-situ-Hybridisierung

#### 3.10.1 cDNA-Präparation

Die verwendeten cDNAs zur Generierung der Riboproben für die In-situ-Hybridisierung kamen im Labor der AG Bachmann bereits zum Einsatz und lagen in klonierter Form vor. Die cDNA für Renin lag als linearisiertes Plasmid 412G3 als SacI-PstI-Fragment des Renin-Gens der Maus (Position 12-306), subkloniert in den pGEM3-Vektor, flankiert durch die Promotorstellen T7 und Sp6 vor. Die Linearisierung erfolgte mit XhoI, die Transkription mit *Antisense*-T7-RNA-Polymerase. Die Generierung der *Sense*-Proben für Renin erfolgte mit T3. Die cDNA für NCC, welche für 712 bp kodiert (Obermüller et al. 1995), lag durch die Promotorstellen für T3 und T7 flankiert, subkloniert in die EcoRV des pBluescript SK (+/-)-Vektors vor. Die cDNA für NKCC2, welche für Aminosäuren 61-188 des Proteins (375 bp) kodiert (Obermüller et al. 1996), lag durch die Promotorstellen für T3 und T7 flankiert, subkloniert in der ecoRV des pBluescript SK (+/-)-Vektors vor. Die Generierung der *Antisense*-Proben erfolgte für NCC mit T7, für Renin und NKCC2 mit T3, die Generierung der *Sense*-Proben mit T3 für NCC und mit T7 für Renin und NKCC2.

#### 3.10.2 Transformation

Riboproben-Matrizen für NCC und NKCC2 lagen als Plasmidstock in Ethanol (100 %) vor. Nach Isolierung der Plasmid-DNA durch Zentrifugation (30 Min., 700x g, 4 °C) (Tischzentrifuge Hettich) und Waschen mit Ethanol (80 %) wurde diese durch Hitzeschock (42 °C, 45 Sek.) in BL21-kompetente Bakterienzellen (*Escherichia coli*) transformiert. Die Ansätze wurden 50 Min. in SOC-Medium inkubiert und unter Zugabe LB-Medium (Bacto-Trypton, Hefeextrakt, NaCl) 16 Std. bei 37 °C vermehrt. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung (Plasmid DNA Purification Kit, Macherey-Nagel, Düren). Zur Differenzierung und Isolierung der Zellen mit erfolgreicher Plasmid-Integrierung diente eine erworbene Ampicillinresistenz.

#### 3.10.3 In-vitro-Transkription

Für alle Versuche wurden *Sense*- und *Antisense*-Proben generiert, *Antisense*-Proben dienten dem Nachweis zellulärer mRNA durch Hybridisierung, *Sense*-Proben als Kontrollsonden. Jeder Transkriptionsansatz, bestehend aus 1 µg Restriktionsfragment bzw. 0,2 µg PCR-Produkt der

DNA in 14 µl DEPC (Sigma) behandeltem H<sub>2</sub>O, 2 µl Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix, Roche Diagnostics, Mannheim), 1 µl RNase Inhibitor (Fermentas) und 2 µl RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde 2¼ Std. bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde zweifach mit Natrium-Acetat (pH 6,0) und Ethanol (100 %) bei -20 °C gefällt, mit Ethanol (80 %) gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend erfolgte die Qualitätsbestimmung der Transkriptionsprodukte durch Agarosegel-Elektrophorese, der RNA-Quantifizierung dienten photometrische Messungen.

#### 3.10.4 Hybridisierung

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

#### 3.10.5 Entfernen nicht hybridisierter Riboproben

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

### 3.10.6 Detektion der hybridisierten Riboproben

Die Schnitte wurden 10 Min. in Puffer 1 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,5), 30 Min. in Blockier-Medium (1 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics), 0,5 % BSA, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur und schließlich mit einem AP-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper, 1:50 (Dako) in Blockier-Medium für 2 Std. bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C überschichtet. Waschschritten mit Puffer 1 und Puffer 3 (100 mM Tris-HCl [pH 9,5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) folgte die enzymatische Farbentwicklung mit Entwicklungspuffer (Nitroblau Tetrazolium, BCIP [Roche]) als Substrat der AP sowie Levamisol (Sigma) zur Hemmung endogener Phosphatasen, gelöst in Puffer 3 (pH 9,5) unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und 4 °C. In Abhängigkeit der Signalintensität erfolgte die Signalgeneration nach 4 bis 6 Std. durch Spülen der Schnitte in Puffer 4 (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) und PBS. Die Prozessierung erfolgte für alle Schnitte gleich unter standardisierten Expositions- und Entwicklungszeiten. Der Eindeckelung in 50 % Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS folgte die Auswertung mit und ohne Interferenzkontrast am Mikroskop Leica DMRB.

### 3.10.7 Quantifizierung der Signale

Die Signale von Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung von Renin wurden durch Auszählungen, je zwei Schnitte pro Tier, jeweils ein Areal von 200 Glomeruli, quantifiziert (vgl. Bosse et al. 1995). Als positiv wurden Signale gewertet, die eindeutig der afferenten Arteriole des JGA bzw. den dort lokalisierten Renin-produzierenden Zellen zugeordnet werden konnten. Die Auswertung der Signale von NCC und NKCC2 erfolgte qualitativ nach Signalintensität.

## 3.11 Statistische Auswertung

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

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische, Plasma-, Funktions- und Urin-Parameter

Alle Ergebnisse der klinisch sowie laborchemisch in Urin und Plasma bestimmten Parameter sind in Tab. 1 dargestellt. Die Messungen fanden bei allen Tieren vor und nach dem Zeitpunkt der Induktion der Anti-Thy1-GN statt (Messung 1 und 2). Vor Induktion der Anti-Thy1-GN, bei Messung 1, wurden keine Unterschiede zwischen den Tieren beider Gruppen festgestellt. Daher sind (außer für das KG und die Kreatinin-Clearance) nur die Ergebnisse nach dem Zeitpunkt der Krankheitsinduktion von Messung 2 angegeben.

In metabolischen Einzelkäfigen wurden für jedes Tier die 24-Std.-Trinkmenge sowie das 24-Std.-Urinvolumen bestimmt. Beide Parameter blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Tieren mit Anti-Thy1-GN unverändert. Der arterielle Blutdruckwert war nicht verändert. Auf das KG zeigte die Induktion der Anti-Thy1-GN ebenfalls keinen Einfluss. Die Gewichtszunahme in beiden Gruppen von Messung 1 zu Messung 2 ist auf das physiologische Wachstum der Tiere zurückzuführen. Das postmortal erfasste Gewicht der anti-Thy1-glomerulonephritischen Nieren war signifikant erhöht als Korrelat der assoziierten Hypertrophie von Glomeruli und Epithelien.

Im Blutplasma der Tiere mit Anti-Thy1-GN blieben die Konzentration der Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid sowie die Menge an Gesamtprotein und Albumin unverändert. Dagegen waren Kreatinin und Harnstoff signifikant erhöht. Die Kreatinin-Clearance war signifikant reduziert, die fraktionelle Natriumausscheidung wies keine signifikante Veränderung auf.

Im 24-Std.-Urin schieden die Tiere mit Anti-Thy1-GN signifikant weniger Natrium, Kalium und Chlorid aus. Kreatinin als harnpflichtiges Abbauprodukt des Muskelstoffwechsels war nur leicht verringert. Die im Vergleich zu Messung 1 erhöhte Kreatinin-Ausscheidung bei Messung 2 in beiden Gruppen auf die wachstumsbedingte Zunahme der Muskelmasse zurückzuführen. Die Tiere mit Anti-Thy1-GN entwickelten eine deutliche Proteinurie mit signifikant erhöhtem Gesamtprotein und Albumin im Urin. Auch die Ausscheidung von freiem Cholesterol sowie von Cholesterol-Lineolat und Cholesterol-Arachidonat war signifikant erhöht. Dagegen war die Urin-Osmolalität signifikant vermindert (Tab. 1).

**Tab. 1.** Klinische und laborchemische Parameter der gesunden Kontrollratten versus (vs.) der Ratten mit Anti-Thy1-GN (MW  $\pm$  SD, n = 10 pro Gruppe, p < 0,05 [\*]; p < 0,01 [†]).

<b>Klinische Parameter</b>	<b>Gesunde Kontrollen</b>	<b>Ratten mit Anti-Thy1-GN</b>
Körpergewicht (Messung 1) (g)	207,10 $\pm$ 09,50	209,10 $\pm$ 09,02
Körpergewicht (Messung 2) (g)	269,70 $\pm$ 12,79	264,00 $\pm$ 16,10
Nierengewicht (postmortal) (mg)	2194,80 $\pm$ 174,83	2846,20 $\pm$ 545,00 *
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122,33 $\pm$ 03,10	122,32 $\pm$ 03,96
Trinkmenge (ml)	34,60 $\pm$ 10,69	36,90 $\pm$ 14,08
Urinvolumen (ml)	17,19 $\pm$ 04,17	20,01 $\pm$ 13,25
<b>Plasmaparameter</b>		
Natrium (mmol/l)	152,20 $\pm$ 0,42	153,20 $\pm$ 0,38
Kalium (mmol/l)	5,22 $\pm$ 0,42	4,32 $\pm$ 0,38
Chlorid (mmol/l)	101,60 $\pm$ 02,61	105,40 $\pm$ 05,59
Gesamtprotein (g/dl)	4,96 $\pm$ 0,40	4,60 $\pm$ 0,28
Albumin (g/dl)	2,42 $\pm$ 0,64	2,40 $\pm$ 0,48
Kreatinin (mg/dl)	0,20 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,08 *
Cholesterol (mg/dl)	51,36 $\pm$ 10,51	82,50 $\pm$ 22,47 *
Triglyceride (mg/dl)	68,91 $\pm$ 24,97	135,75 $\pm$ 76,15 *
Harnstoff (mg/dl)	31,60 $\pm$ 10,55	75,00 $\pm$ 15,70 *
<b>Renale Funktionsparameter</b>		
Kreatinin-Clearance (ml/min*g)	11,93 $\pm$ 2,89	6,88 $\pm$ 1,33 *
Fraktionelle Natriumexkretion	0,34 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,14
<b>Urinparameter</b>		
Natrium (mmol/24h)	2,16 $\pm$ 0,14	1,58 $\pm$ 0,23 *
Kalium (mmol/24h)	4,94 $\pm$ 0,67	3,36 $\pm$ 0,22 *
Chlorid (mmol/24h)	2,91 $\pm$ 0,22	2,04 $\pm$ 0,21 *
Osmolalität (mosmol/kg H <sub>2</sub> O/24h)	1638 $\pm$ 207	1044 $\pm$ 416 *
Protein (mg/24h)	15,07 $\pm$ 05,86	156,13 $\pm$ 64,11 †
Albumin (mg/24h)	0,19 $\pm$ 0,23	23,02 $\pm$ 06,45 †
Kreatinin (Messung I) (mg/24h)	7,55 $\pm$ 0,71	7,47 $\pm$ 0,26
Kreatinin (Messung II) (mg/24h)	9,47 $\pm$ 0,93	8,64 $\pm$ 1,00
Harnstoff (mg/24h)	673,18 $\pm$ 136,64	490,55 $\pm$ 53,73
freies Cholesterol ( $\mu$ g/24h)	7,53 $\pm$ 04,46	115,95 $\pm$ 49,11 †
Cholesterol-Lineolat ( $\mu$ g/24h)	2,28 $\pm$ 02,28	393,15 $\pm$ 143,56 †
Cholesterol-Arachidonat ( $\mu$ g/24h)	8,15 $\pm$ 06,42	1452,65 $\pm$ 788,87 †

## 4.2 Mikroskopische Charakterisierung von Anti-Thy1-GN

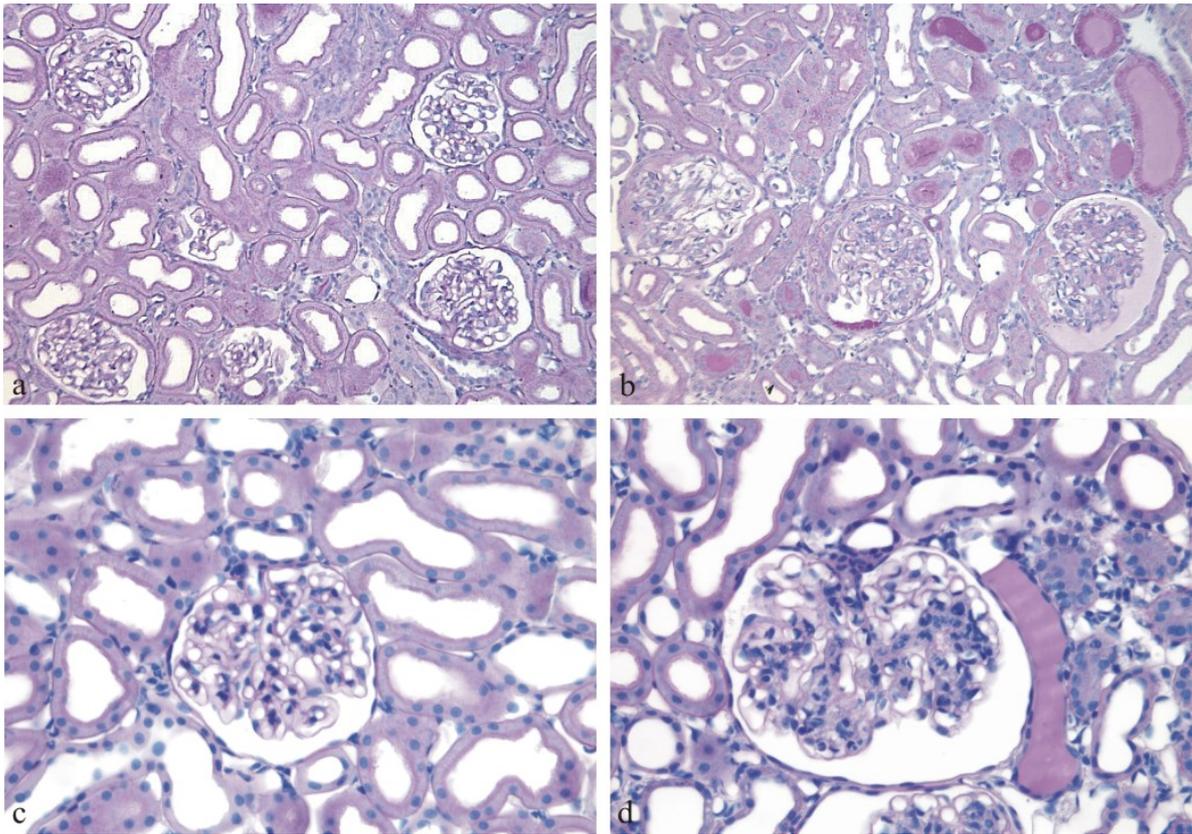
### 4.2.1 Histopathologie in der PAS-Färbung

Histopathologische Veränderungen in den Nieren der anti-Thy1-glomerulonephritischen Ratten wurden in PAS-gefärbten Paraffinschnitten untersucht (Abb. 1.). In einigen Glomeruli fielen glomeruläre Hypertrophie mit Basalmembran- und Kapillarverbreiterung, in anderen zelluläre Mesangiolyse, ödematöse Ballonierung oder mesangiale Matrixerweiterung auf. Im Bowman-Kapselraum kam es zu podozytären Adhäsionen und zur Bildung von hyalinen und proteinösen Halbmonden (engl. *crescents*).

Im Tubulussystem traten fokale Schädigungen mit atrophen und kollabierten Tubuli aber auch mit epithelialer Hypertrophie auf. Die Mehrzahl der Tubuli blieb aber histologisch intakt. Im gesamten Tubuluslumen imponierten abschnittsweise PAS-positive Reaktionen (engl. *tubular casts*), im proximalen Tubulus sowie in kortikaler und medullärer dicker aufsteigender Henle'scher Schleife wurden PAS-positive Anreicherungen auch intrazellulär nachgewiesen.

Insgesamt war das glomeruläre Schädigungsmuster in den glomerulonephritischen Nieren sehr heterogen, mit großen Variationsbreiten zwischen den einzelnen Tieren dieser Gruppe sowie auch zwischen den Glomeruli eines Tieres. Neben histopathologisch veränderten Glomeruli waren auch regelmäßig Glomeruli mit nur sehr leichter bzw. ohne Schädigung zu finden.

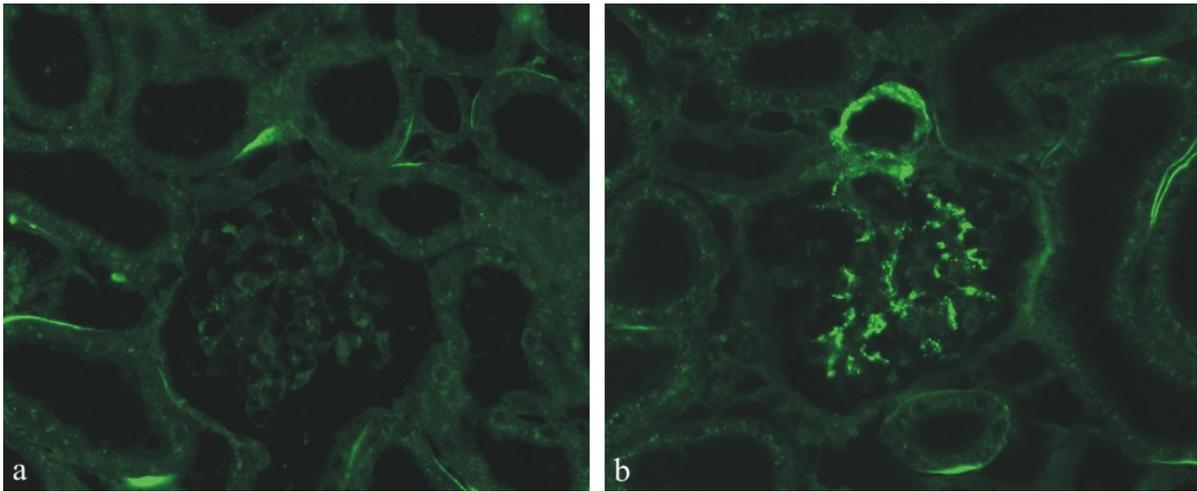
Im Gegensatz zu diesen Veränderungen zeigten die Glomeruli und der das Tubulussystem der gesunden Kontrolltiere unauffällige histologische Verhältnisse ohne Mesangiolyse, mesangiale Matrixverbreiterung, Proteinablagerung oder Proliferation (Abb. 1.).



**Abb. 1. Histopathologische Veränderungen.** Im PAS-gefärbten Nierenschnitt einer gesunden Kontrollratte (a) zeigen sich im Übersichtsbild normale histologische Verhältnisse, während in der Niere mit Anti-Thy1-GN (b) glomeruläre Schädigung und tubuläre Proteinüberladung (*tubular casts*) imponieren. Deutlich sind die Halbmonde (*crescents*) zu erkennen. Der Größenunterschied zwischen dem histologisch unauffälligen Glomerulum einer gesunden Kontrollratte (c) im Vergleich zum Glomerulum in der Niere mit Anti-Thy1-GN (d) ist auf mesangiale Ballonierung, Matrixverbreiterung und Hypertrophie zurückzuführen. (Vergrößerung [a, b] x 150; [c, d] x 250).

#### 4.2.2 Immunhistochemie mit Membranlysekomplex C5b-9-Antikörpern

Die Immunreaktion bei Anti-Thy1-GN erfolgt über Aktivierung des Komplement-Systems (Nangaku et al. 1999; Brandt et al. 1996). Die Immunhistochemie mit Antikörpern, die gegen den Komplementfaktor C6 und Membranlysekomplex C5b-9 gerichtet waren, ergab intensive Signale im intraglomerulären Mesangium, schwächere Signale im extraglomerulären Mesangium der glomerulonephritischen Rattennieren. Im proximalen Tubulus fanden sich komplement-positive Reaktionen in der luminalen BBM lokalisiert. In den Nieren gesunder Kontrollratten waren nur schwach positive Signale im perikapillären Bereich zu finden (Abb. 2.).



**Abb. 2. Komplementreaktion mit Membranlyse-Komplex C5b-9.** Die immunhistochemische Färbung zeigt nur schwach positive Signale in der Niere der gesunden Kontrollratte (a), während in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b) vor allem intramesangial intensiv positive Signale zu erkennen sind. Die extramesangial lokalisierten, schwächer positiven Signale weisen ebenfalls auf die komplementvermittelte Immunreaktion hin. (Vergrößerung [a, b] x 250).

### 4.3 Anreicherung der BBM-Fraktion

Die Isolierung und Anreicherung der BBM-Fraktion erfolgte durch eine zweistufige Magnesium-Präzipitationstechnik und Differentialzentrifugation (Biber et al. 1981). Der Erfolg kann durch Aktivitätszunahme der BBM-lokalisierten Markerenzyme AP und GGT bestimmt werden (Liang und Sacktor 1977; Tsao und Curthoys 1982).

Für beide Enzyme konnten in der isolierten Membranfraktion signifikante Aktivitätszunahmen im Vergleich zum kortikalen Homogenat festgestellt werden (Tab. 2). Damit kann von einer erfolgreichen BBM-Isolierung ausgegangen werden (Levine et al. 1983).

**Tab. 2.** Aktivitäten der BBM-Markerenzyme Alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) in kortikalem Nierenhomogenat vs. isolierter BBM-Fraktion (MW  $\pm$  SD, n = 5 pro Gruppe, p < 0,01 [†]).

	Nierenhomogenat	BBM-Fraktion	Faktor
<b>AP (U/l)</b>	39,33 $\pm$ 17,36	178,83 $\pm$ 24,76 †	4,22 †
<b>GGT (U/l)</b>	253,50 $\pm$ 48,74	1612,00 $\pm$ 384,36 †	6,56 †

#### 4.4 Expressionsraten tubulärer Transportproteine in Westernblot-Analysen

In Westernblot-Analysen wurden die Expressionsraten der tubulären Transporter AQP1, NHE3 und NaPi-IIa in der BBM-Fraktion sowie NHE3, NKCC2, NCC,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ENaC,  $\alpha$ -,  $\beta$ -NKA und AQP2 in kortikaler und medullärer GM-Fraktion untersucht (Abb. 3.). In der BBM-Fraktion wurden außerdem Megalin und Villin analysiert (ebd.). Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in Tab. 3. sowie Abb. 4. dargestellt.

##### 4.4.1 Transportproteine im proximalen Tubulus (BBM-Fraktion)

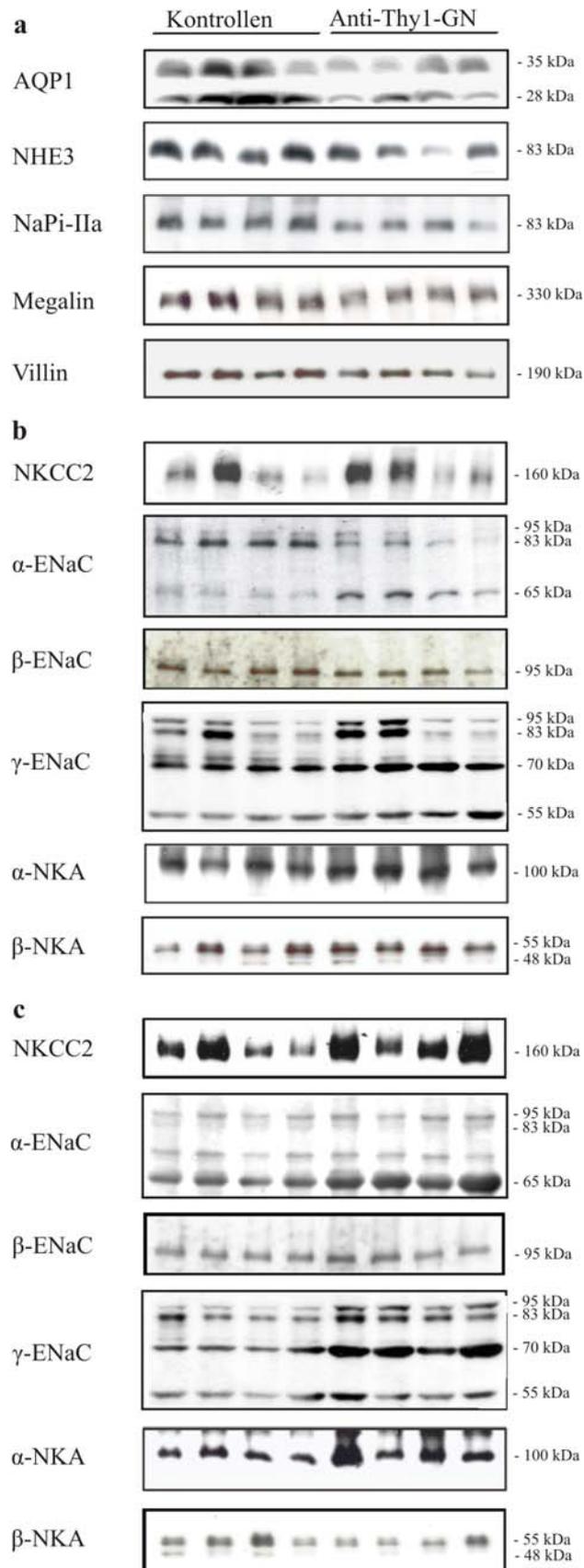
NHE3, NaPi-IIa und AQP1 waren in der BBM-Fraktion der Rattennieren mit Anti-Thy1-GN signifikant vermindert exprimiert. Die Expression von Megalin und Villin blieb unverändert.

##### 4.4.2 Transportproteine der GM-Fraktion im Nierenkortex

In der kortikalen GM-Fraktion wurden für  $\alpha$ -ENaC und  $\gamma$ -ENaC neben vorbekannten Banden bei 95 kDa und 83 kDa, auch Banden geringeren Molekulargewichts, für  $\alpha$ -ENaC von 65 kDa, für  $\gamma$ -ENaC von 70 kDa und 55 kDa, registriert (Abb. 3.). Diese waren neben dem  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC-Gesamtprotein in den glomerulonephritischen Nieren signifikant erhöht. Die Expressionsrate von  $\beta$ -ENaC blieb unverändert. Auch die Expressionsrate der  $\alpha$ -NKA war signifikant erhöht. NHE3, NKCC2, NCC,  $\beta$ -NKA und AQP2 blieben unverändert (Tab. 3., Abb. 4.).

##### 4.4.3 Transportproteine der GM-Fraktion in der Nierenmedulla

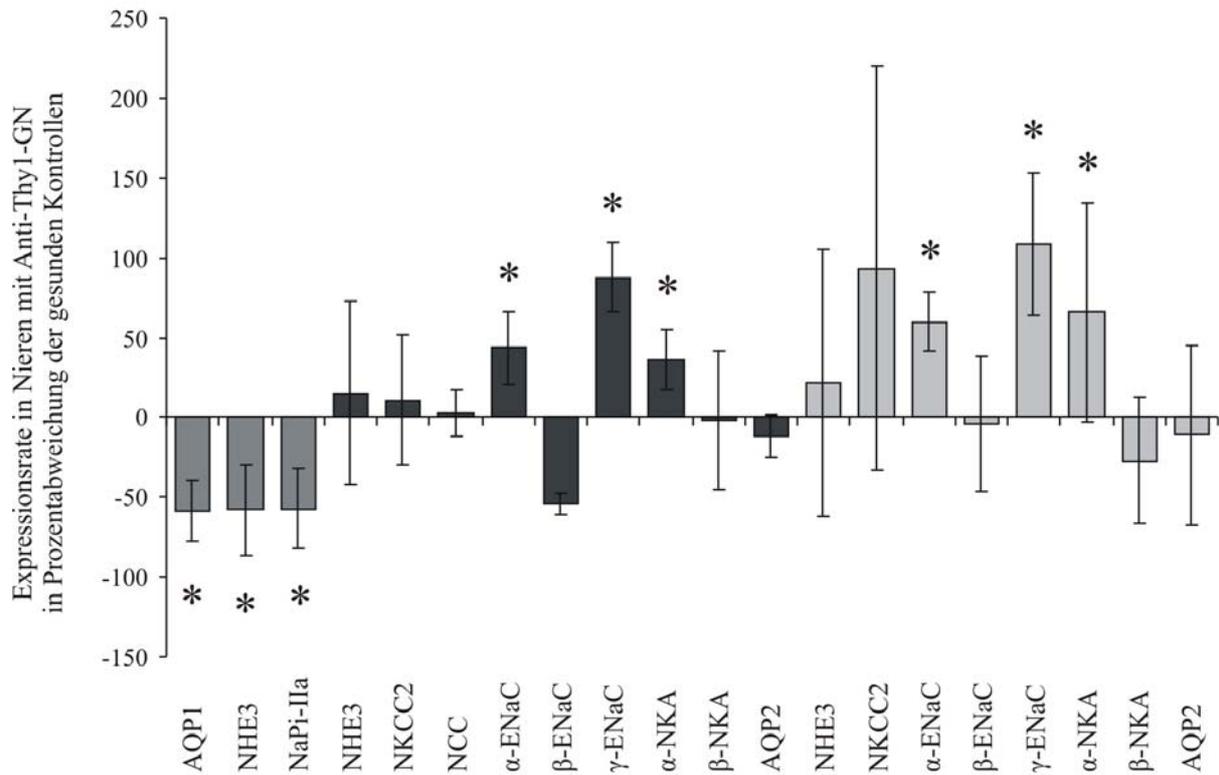
Auch in der medullären GM-Fraktion wurden für  $\alpha$ -ENaC und  $\gamma$ -ENaC Banden bei 95 kDa und 83 kDa sowie bei 65 kDa für  $\alpha$ -ENaC bzw. 70 kDa und 55 kDa für  $\gamma$ -ENaC registriert (Abb. 3.). Für  $\alpha$ -ENaC waren Gesamtproteinmenge sowie die 83 kDa- und 65-KDa-Form, für  $\gamma$ -ENaC Gesamtproteinmenge sowie die 83 kDa- und 70 kDa-Form in den Anti-Thy1-GN-Nieren erhöht.  $\beta$ -ENaC blieb unverändert. Auch die Expression der  $\alpha$ -NKA war in den glomerulonephritischen Nieren erhöht. Die Parameter NHE3,  $\beta$ -NKA und AQP2 blieben unverändert. Die Expression von NKCC2 blieb medullär insgesamt unverändert, allerdings fiel eine große SD in den glomerulonephritischen Nieren auf (Tab. 3., Abb. 4.).



**Abb. 3. Western- bzw. Immunoblots.** Antikörper-Markierung von isolierten Membranproteinen in (a) BBM; (b) kortikaler und (c) medullärer GM-Fraktion; Kontrollen vs. Ratten mit Anti-Thy1-GN (n = 4 pro Gruppe).

**Tab. 3.** Westernblot-Analysen von Membranproteinen im proximalen Tubulus (BBM-) sowie im kortikalen und medullären distalen Tubulus und Sammelrohr (GM-Fraktion). Proteinmengen densitometrisch ausgewertet, normiert auf  $\beta$ -Aktin, Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunder Kontrollen (MW in Prozent [%]  $\pm$  SD; n = 5, p < 0,05 \*).

<b>Proximaler Tubulus (BBM)</b>	
AQP1	67,03 $\pm$ 19,16 vs. 100 $\pm$ 41,33 *
NHE3	41,99 $\pm$ 12,84 vs. 100 $\pm$ 15,50 *
NaPi-IIa	42,82 $\pm$ 07,76 vs. 100 $\pm$ 15,46 *
Megalin	72,15 $\pm$ 30,46 vs. 100 $\pm$ 52,00
Villin	50,95 $\pm$ 28,24 vs. 100 $\pm$ 48,14
<b>Kortikaler distaler Tubulus und kortikales Sammelrohr</b>	
NHE3	115,33 $\pm$ 57,05 vs. 100 $\pm$ 52,59
NKCC2	110,92 $\pm$ 40,86 vs. 100 $\pm$ 76,23
NCC	102,95 $\pm$ 14,72 vs. 100 $\pm$ 76,23
$\alpha$ -ENaC (gesamt)	143,63 $\pm$ 28,53 vs. 100 $\pm$ 28,95 *
$\alpha$ -ENaC (83 kDa + 95 kDa)	35,37 $\pm$ 20,24 vs. 100 $\pm$ 28,55
$\alpha$ -ENaC (65 kDa)	251,88 $\pm$ 36,82 vs. 100 $\pm$ 29,35 *
$\beta$ -ENaC	46,30 $\pm$ 15,11 vs. 100 $\pm$ 26,44
$\gamma$ -ENaC (gesamt)	160,01 $\pm$ 18,41 vs. 100 $\pm$ 06,66 *
$\gamma$ -ENaC (83 kDa + 95 kDa)	154,85 $\pm$ 60,86 vs. 100 $\pm$ 36,41
$\gamma$ -ENaC (70 kDa)	220,90 $\pm$ 34,08 vs. 100 $\pm$ 12,78 *
$\gamma$ -ENaC (55 kDa)	139,92 $\pm$ 22,52 vs. 100 $\pm$ 04,04 *
$\alpha$ -NKA	135,92 $\pm$ 19,20 vs. 100 $\pm$ 20,80 *
$\beta$ -NKA	101,46 $\pm$ 43,35 vs. 100 $\pm$ 27,48
AQP2	87,70 $\pm$ 13,29 vs. 100 $\pm$ 18,59
<b>Medullärer distaler Tubulus und medulläres Sammelrohr</b>	
NHE3	121,84 $\pm$ 83,84 vs. 100 $\pm$ 39,37
NKCC2	193,34 $\pm$ 126,42 vs. 100 $\pm$ 76,91
$\alpha$ -ENaC (gesamt)	148,47 $\pm$ 14,02 vs. 100 $\pm$ 06,46 *
$\alpha$ -ENaC (83 kDa + 95 kDa)	132,30 $\pm$ 03,11 vs. 100 $\pm$ 07,57 *
$\alpha$ -ENaC (65 kDa)	164,63 $\pm$ 60,59 vs. 100 $\pm$ 05,34 *
$\beta$ -ENaC	95,86 $\pm$ 41,91 vs. 100 $\pm$ 23,83
$\gamma$ -ENaC (gesamt)	208,57 $\pm$ 44,85 vs. 100 $\pm$ 19,71 *
$\gamma$ -ENaC (83 kDa + 95 kDa)	199,40 $\pm$ 57,47 vs. 100 $\pm$ 21,88 *
$\gamma$ -ENaC (70 kDa)	293,31 $\pm$ 64,32 vs. 100 $\pm$ 17,74 *
$\gamma$ -ENaC (55 kDa)	124,16 $\pm$ 30,65 vs. 100 $\pm$ 17,03
$\alpha$ -NKA	165 $\pm$ 68,92 vs. 100 $\pm$ 29,29 *
$\beta$ -NKA	73,07 $\pm$ 40,06 vs. 100 $\pm$ 35,65
AQP2	88,83 $\pm$ 56,63 vs. 100 $\pm$ 45,02



**Abb. 4. Expressionsveränderung tubulärer Transportproteine entlang des Nephrons.** Expressionsraten aus Westernblot-Analysen von AQP1, NHE3, NaPi-IIa in der BBM-Fraktion und NHE3, NKCC2, NCC,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ENaC (gesamt),  $\alpha$ -,  $\beta$ -NKA und AQP2 in kortikalen sowie medullären GM-Fraktionen aus Rattennieren mit Anti-Thy1-GN in prozentualer Abweichung der Expressionsrate in gesunden Kontrollnieren. (BBM-Fraktion: dunkelgrau, kortikale GM-Fraktion: schwarz, medulläre GM-Fraktion: hellgrau; MW  $\pm$  SD, n = 5 pro Gruppe, p < 0,05 \*).

#### 4.4.4 Veränderungen der Transportproteine in der Immunhistochemie

Mit fluoreszenz- und PAP-markierten Antikörpern, die gegen AQP1, NHE3, NaPi-IIa, NKCC2, NCC,  $\alpha$ -ENaC,  $\gamma$ -ENaC,  $\alpha$ -NKA, AQP2 gerichtet waren, konnten die Westernblot- Ergebnisse immunhistochemisch bestätigt werden. Neben diesen Veränderungen in der Expressionsstärke, wurden auch Abweichungen in der Verteilung einzelner epithelialer Transporter festgestellt.

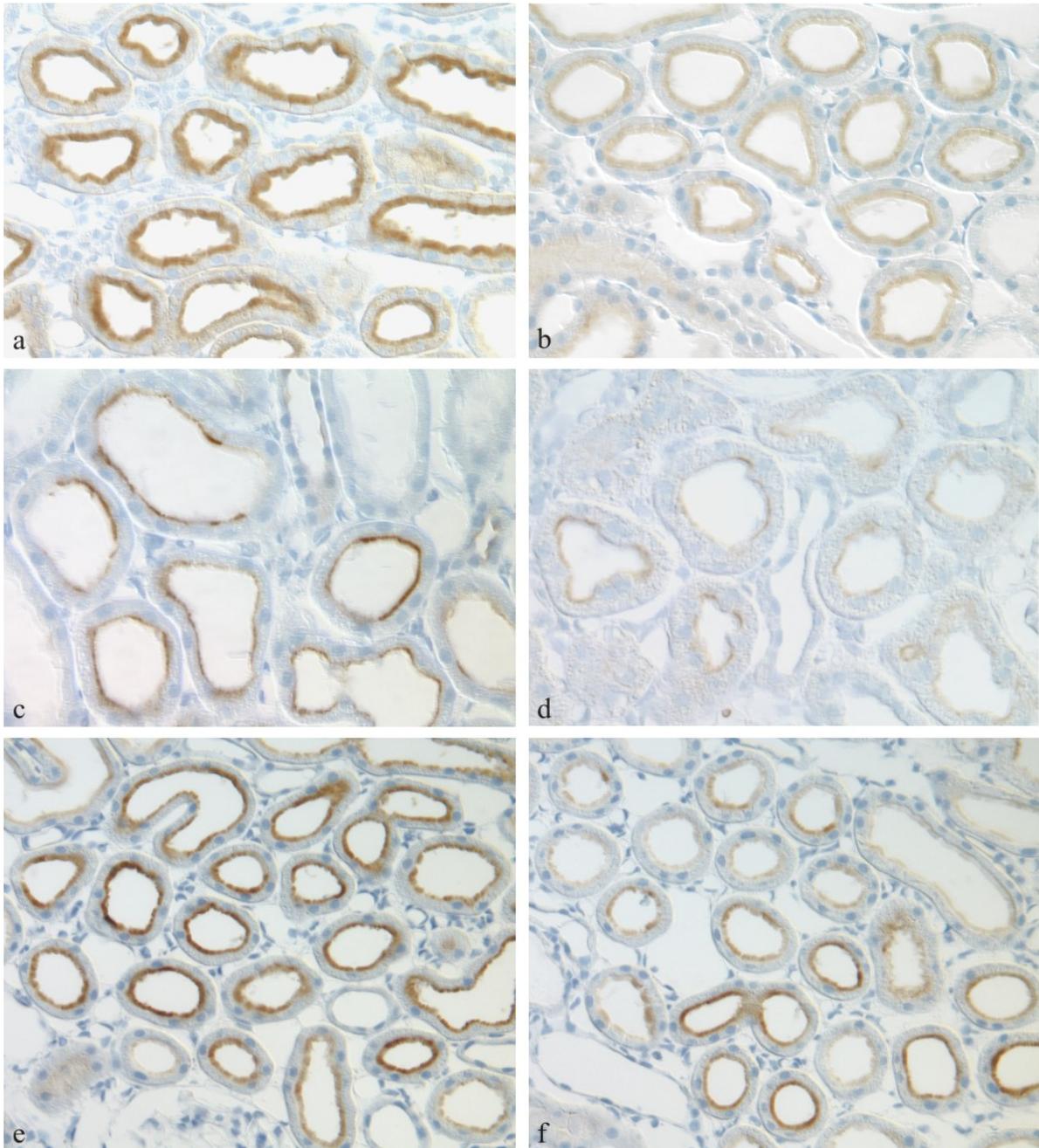
Für die Transporter im proximalen Tubulus AQP1, NHE3 und NaPi-IIa waren die Signale in der BBM der Tiere mit Anti-Thy1-GN deutlich reduziert. Dies spricht für eine Abnahme der Transporterdichte im proximalen Nephronsegment (Abb. 5.).

Dagegen war die Signalantwort der basolateral lokalisierten  $\alpha$ -NKA entlang des gesamten Nephrons, im proximalen Tubulus, in den kortikalen und medullären distalen Tubulussegmenten sowie im Sammelrohr, intensiver (Abb. 6.).

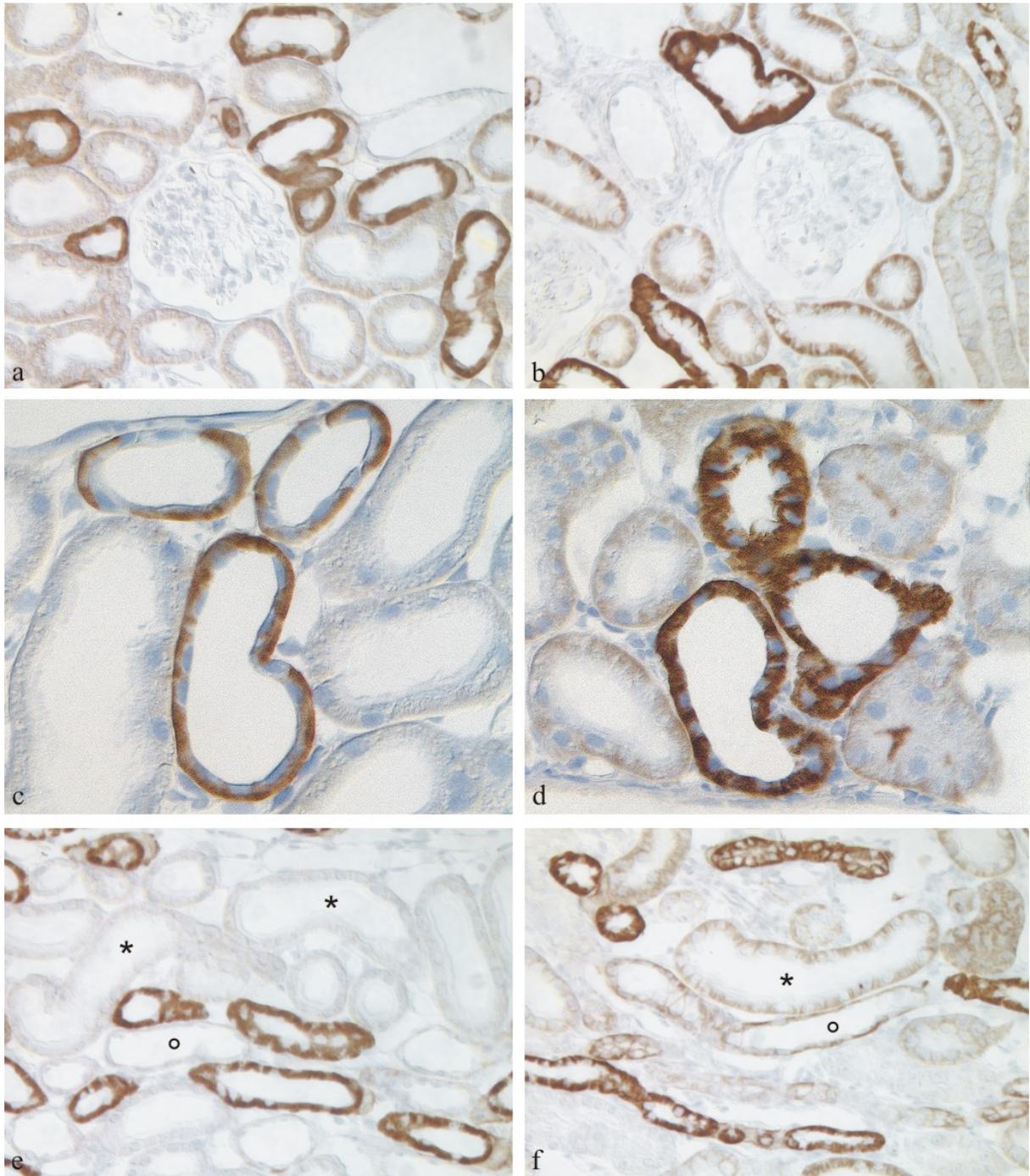
Für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC wurden ebenfalls intensivere Signale in den kortikalen und medullären Nephronsegmenten der glomerulonephritischen Nieren festgestellt. Außerdem erschienen die positiven Signale für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in der apikalen Membran von Verbindungstubulus und Sammelrohr akzentuiert. Es schien zu einer Umverteilung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC innerhalb der Zellmembran gekommen zu sein (Abb. 7., 8., 9.).

Für NKCC2 in der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife wurden sowohl intensivere als auch schwächere Signale detektiert, korrelierend mit der SD in der Westernblot-Auswertung. Beobachtungen einer Umverteilung mit Akkumulation in der apikalen Membranseite wurden auch für NKCC2 gemacht. (Abb. 7.).

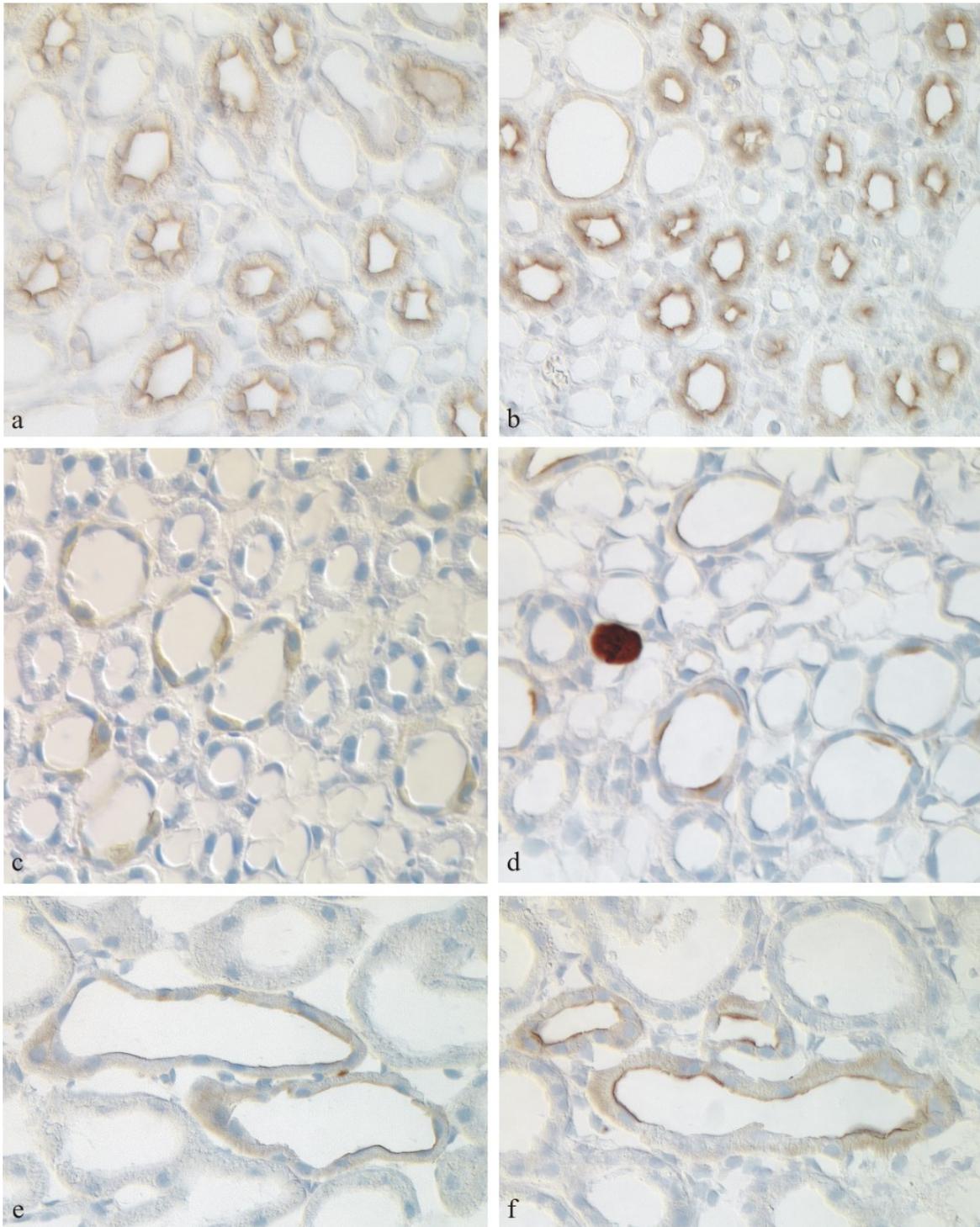
Für NCC und AQP2 wurden immunhistochemisch keine Veränderungen festgestellt.



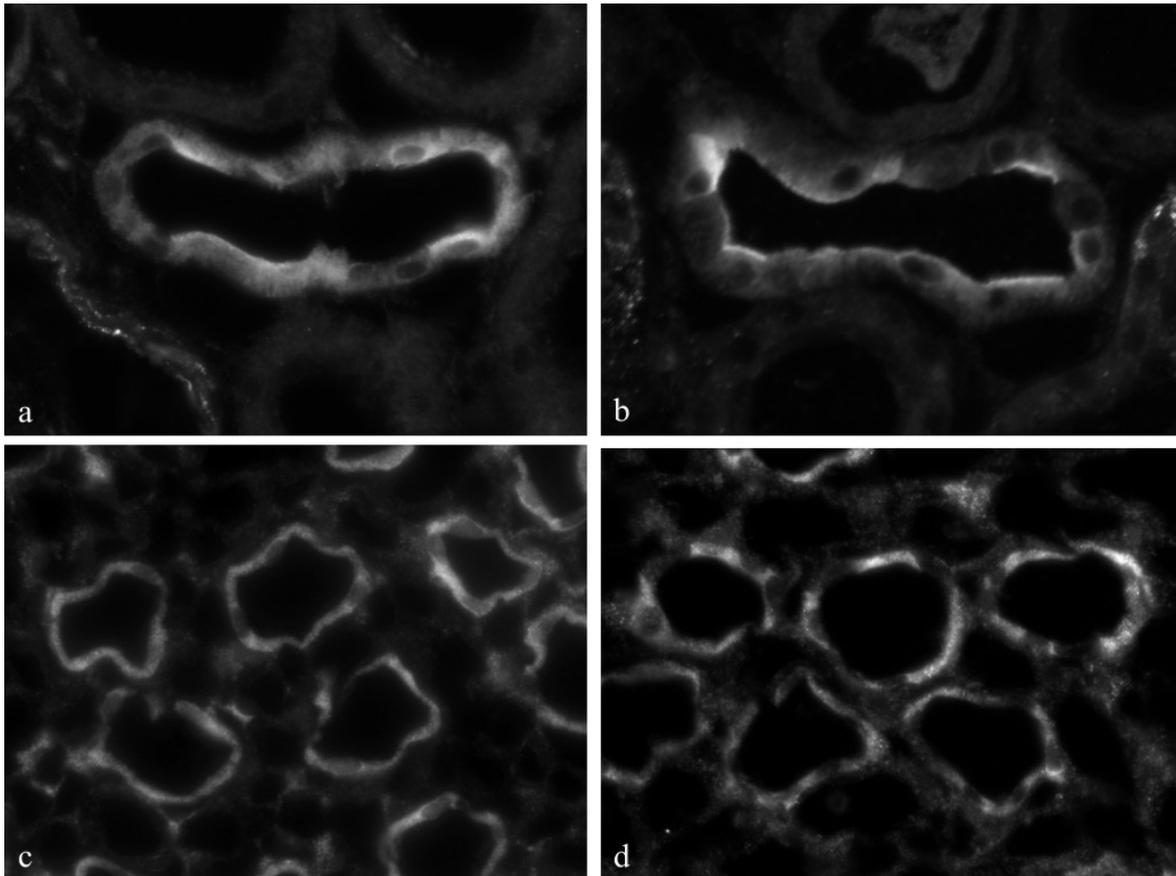
**Abb. 5. Expression tubulärer Transportproteine in der BBM.** Die Immunhistochemie mit PAP-markierten Antikörpern, gerichtet gegen Transportproteine der BBM, zeigt im proximalen Tubulus die Signale für AQP1 (a, b), NHE3 (c, d) und NaPi-IIa (e, f) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (a, c, e) in der anti-Thy1-glomerulonephritischen Rattenniere (b, d, f) abgeschwächt. (Vergrößerung [a-d] x 200; [e, f] x 150).



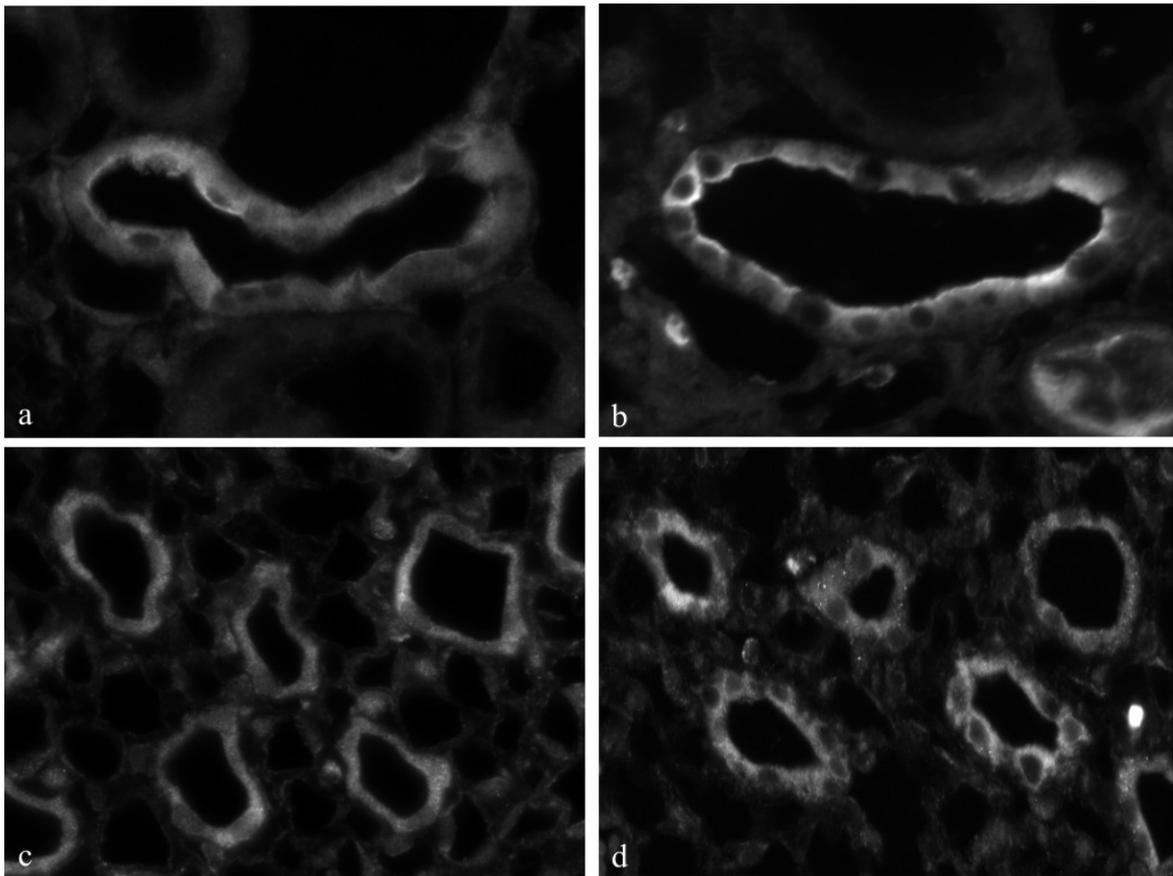
**Abb. 6. Expression der  $\alpha$ -NKA.** Die Immunhistochemie mit PAP-markierten Antikörpern, gerichtet gegen  $\alpha$ -NKA, zeigt im Vergleich zur gesunden Kontrollniere (a, c, e) das Signal in den kortikalen (a-d) und medullären (e, f) Nephronsegmenten im anti-Thy1-glomerulonephritischen Zustand (b, d, f) intensiver. Diese Expressionsvermehrung könnte Ausdruck einer erhöhten Aktivität der NKA sein. (Vergrößerung [a, b, e, f] x 150; [c, d] x 400; \* proximaler Tubulus, ° Sammelrohr).



**Abb. 7. Expression von NKCC2 und  $\alpha$ -ENaC.** Die Immunhistochemie mit PAP-markierten Antikörpern, gerichtet gegen NKCC2 bzw.  $\alpha$ -ENaC, zeigt im Vergleich zur gesunden Kontrolle (a, c, e) in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b, d, f) das Signal für NKCC2 in der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife (a-d) sowie für  $\alpha$ -ENaC im medullären Sammelrohr (e, f) intensiver. Darüber hinaus scheinen die Transporter innerhalb der Zellmembran unverteilt mit Akkumulierung in der apikalen Membran. (Vergrößerung [a-d] x 150; [e, f] x 200).



**Abb. 8. Expression von  $\alpha$ -ENaC.** Die Fluoreszenzmarkierung zeigt für  $\alpha$ -ENaC kortikal, im Verbindungstubulus (a, b) sowie medullär, hier im Sammelrohr (c, d) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (a, c) intensivere Signale sowie Umverteilungen nach apikal in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b, d). (Vergrößerung [a, b] x 250, [c, d] x 200).

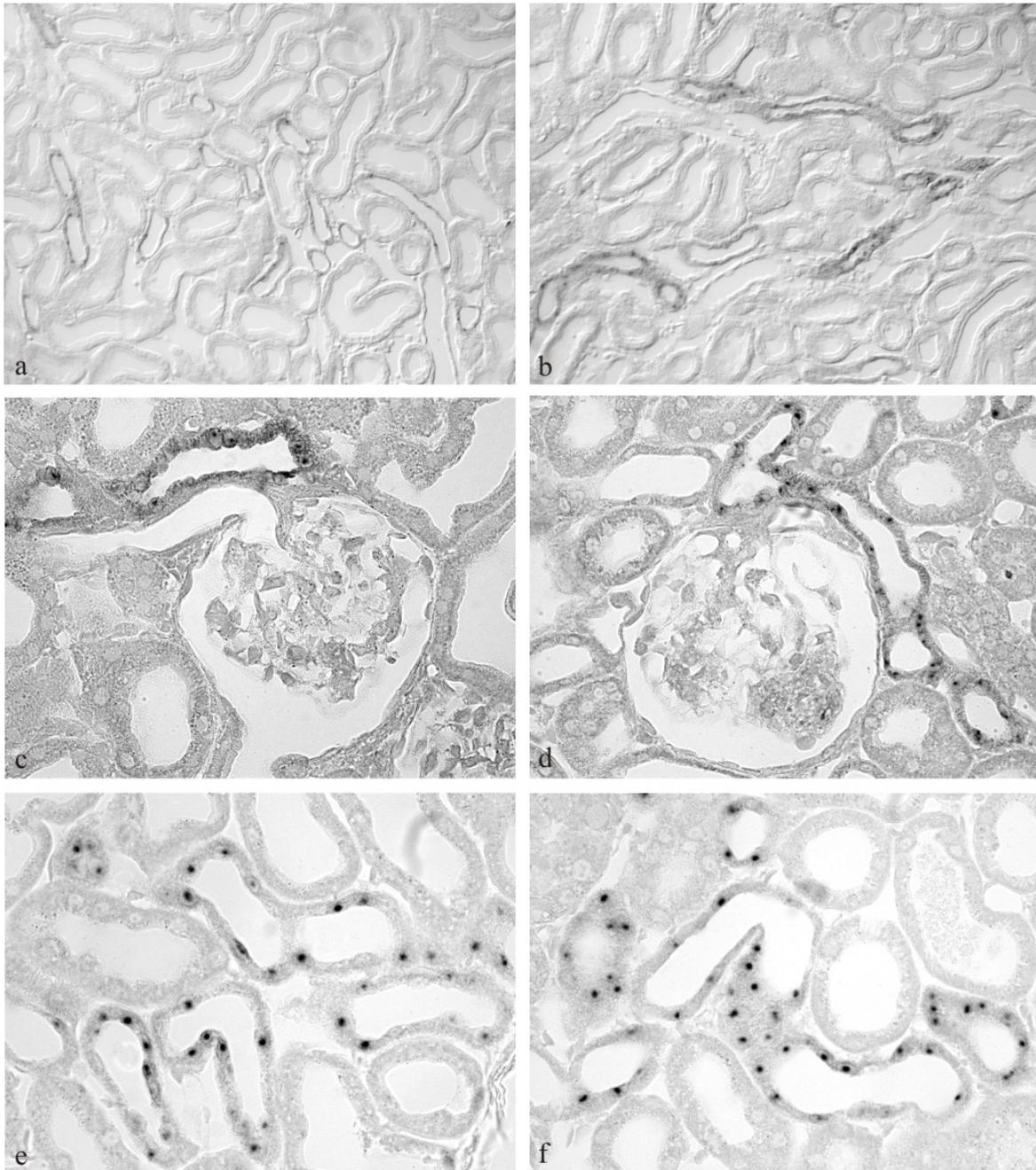


**Abb. 9. Expression von  $\gamma$ -ENaC.** Auch die Fluoreszenzmarkierung für  $\gamma$ -ENaC zeigt im Verbindungstubulus, kortikal (a, b) und im medullären Sammelrohr (c, d) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (a, c) intensivere Signale sowie Umverteilungen in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (c, d). (Vergrößerung [a, b] x 250, [c, d] x 200).

#### 4.5 Analysen der Transkription von NKCC2 und NCC

In-situ-Hybridisierungen von NKCC2 und NCC sollten Veränderungen auf mRNA-Ebene, also in der Transkription erfassen. In den gesunden und glomerulonephritischen Nieren wurden für NKCC2-mRNA positive Signale entlang der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife sowie Glomerulum-assoziiert in Tubuluszellen der Macula densa im JGA lokalisiert (vgl. Obermüller et al. 1996). Dabei ließen sich in den Nieren mit Anti-Thy1-GN tier- und nephronindividuell sowohl gesteigerte als auch verminderte Signalantworten registrieren. Die intensiven Signale wurden hauptsächlich in Zellen der medullären Henle'schen Schleife identifiziert.

Für NCC-mRNA wurden positive Signale entlang des gesamten distalen Konvoluts im Kortex der gesunden und glomerulonephritischen Rattennieren nachgewiesen (vgl. Obermüller et al. 1995). Es wurden keine Veränderungen bei den Tieren mit Anti-Thy1-GN festgestellt. (Abb. 9.).



**Abb. 10. Transkriptionsanalyse auf mRNA-Ebene von NKCC2 und NCC.** Die In-situ-Hybridisierung zeigt für NKCC2-mRNA (a-d) im medullären Abschnitt der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife im Vergleich zur gesunden Kontrolle (a) ein stärkeres Signal in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b). In juxtaglomerulär assoziierten Zellen sind die positiven Signale bei der Kontrolle (c) und Ratte mit Anti-Thy1-GN (d) etwa gleich stark. Die Signalstärke von NCC-mRNA (e, f) zeigt keine Unterschiede zwischen gesunder Kontrolle (e) und anti-Thy1-glomerulonephritischer Rattenniere (f). (Vergrößerung [a, b] x 100; [c, d] x 250; [e, f] x 150).

## 4.6 Veränderungen systemisch-endokriner Parameter

### 4.6.1 Bestimmung der Konzentration von ADH

Um den Einfluss des am Sammelrohr wirkenden Volumenregulators ADH einzuschätzen, wurde die Plasmakonzentration gemessen. Es wurden keine Veränderungen bei den Tieren mit Anti-Thy1-GN festgestellt (Tab. 4.).

**Tab. 4.** Konzentration von ADH im Blutplasma von Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunden Kontrollratten. (MW [%]  $\pm$  SD bzw. MW [pg/ml]  $\pm$  SD, n = 10 pro Gruppe).

ADH-Konzentration im Blutplasma	Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunde Kontrollen
[%]	91,75 $\pm$ 12,65 vs. 100 $\pm$ 20,38
[pg/ml]	22,81 $\pm$ 3,14 vs. 24,86 $\pm$ 5,07

### 4.6.2 Bestimmung der Enzymmenge von 11- $\beta$ -HSD2

Um die Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors durch Glukokortikoide aufgrund deren fehlenden Inaktivierung auszuschließen, wurde die Proteinmenge der 11- $\beta$ -HSD2 in Kortex und Medulla durch Westernblots bestimmt. Es wurden keine Veränderungen festgestellt (Tab. 5.).

**Tab. 5.** Proteinmenge des Enzyms 11- $\beta$ -HSD2 in Nierenkortex bzw. Nierenmedulla von Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunden Kontrollratten, bestimmt durch Westernblot-Analysen. (MW [%]  $\pm$  SD, n = 5 pro Gruppe).

Proteinmenge 11- $\beta$ -HSD2 [%]	Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunde Kontrollen
Nierenkortex	105,37 $\pm$ 9,39 vs. 100 $\pm$ 15,23
Nierenmedulla	101,43 $\pm$ 11,05 vs. 100 $\pm$ 17,07

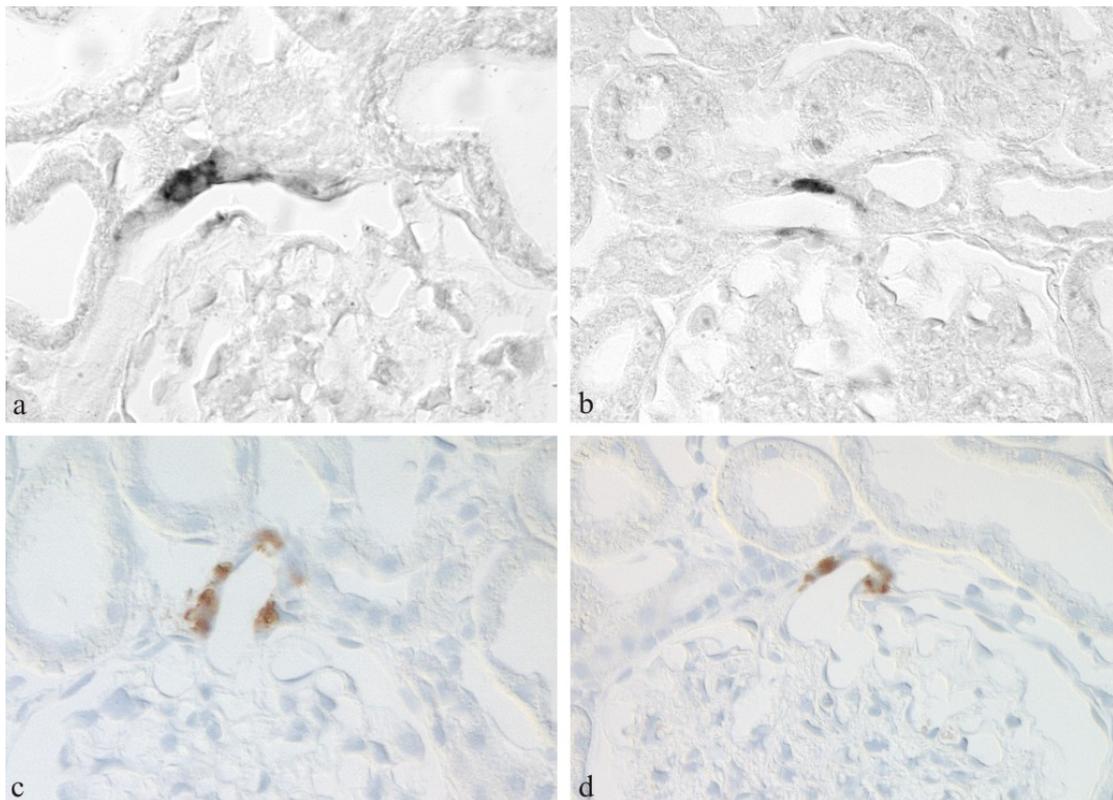
### 4.6.3 Veränderungen von Renin-mRNA, Renin-Protein und PRA

Renin aus dem JGA hat lokal und systemisch vermittelte Einflüsse auf die tubuläre Funktion. Um Veränderungen im RAAS abschätzen zu können, wurden die Transkription (mRNA) und Expression (Protein) von Renin erfasst. Entsprechend der Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen wurden die positiven Signale an der afferenten glomerulären Arteriole lokalisiert. In den gesunden Kontrollnieren stellte sich das Signal um die afferente Arteriole intensiv positiv dar, in den glomerulonephritischen Nieren nur vereinzelt schwach positiv (Abb. 11.).

Die Quantifizierung ergab in den Nieren mit Anti-Thy1-GN signifikant verminderte Werte von Renin-mRNA und Renin-Protein, bezogen auf die Anzahl Glomeruli. Systemisch wirksames Renin wurde durch Messung der PRA im Radioimmunassay erfasst. Diese war bei den Ratten mit Anti-Thy1-GN ebenfalls signifikant vermindert (Tab. 6.).

**Tab. 6.** Renin-mRNA, -Protein und PRA bei Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunder Kontrollen. (MW [%]  $\pm$  SD [Renin-mRNA, Renin-Protein, PRA] bzw. MW [ng Ang I/ ml \*h]  $\pm$  SD (PRA), n = 5 pro Gruppe, p < 0,05 \*).

Renin-Parameter	Ratten mit Anti-Thy1-GN vs.gesunde Kontrollen
Renin-mRNA [%]	43,06 $\pm$ 18,29 vs. 100 $\pm$ 9,98 *
Renin-Protein [%]	49,68 $\pm$ 06,43 vs. 100 $\pm$ 26,39 *
PRA [%]	44,76 $\pm$ 19,62 vs. 100 $\pm$ 32,65 *
PRA [ng Ang I/ ml *h]	2,36 $\pm$ 1,04 vs. 5,28 $\pm$ 1,72 *

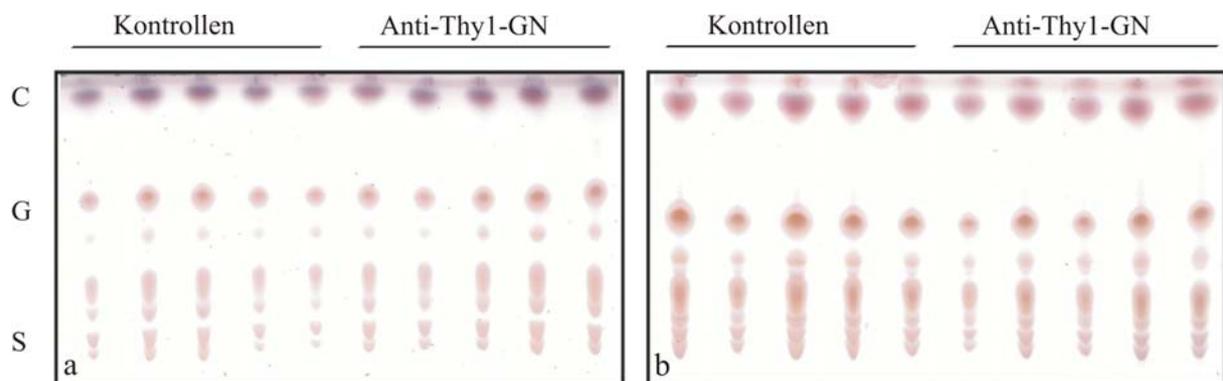


**Abb. 11. Transkription und Expression von Renin.** In-situ-Hybridisierung (a, b) und Immunhistochemie (c, d) zeigen im Vergleich zur Kontrolle (a, c) in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b, d) die Signale für Renin-mRNA und Renin-Protein in den Zellen des JGA deutlich vermindert. (Vergrößerung [a-c] x 400).

#### 4.7 Lipidzusammensetzungen von BBM-, kortikaler und medullärer GM-Fraktion

Um im lipidurischen Zustand eine veränderte Lipidzusammensetzung der tubulären Membran zu registrieren, wurden die BBM- sowie die kortikale und medulläre GM-Fraktion dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (vgl. Schmidt et al. 2001) und auf die Bestandteile Cholesterol, Glycerophospholipide und Sphingolipide untersucht (Abb. 12.).

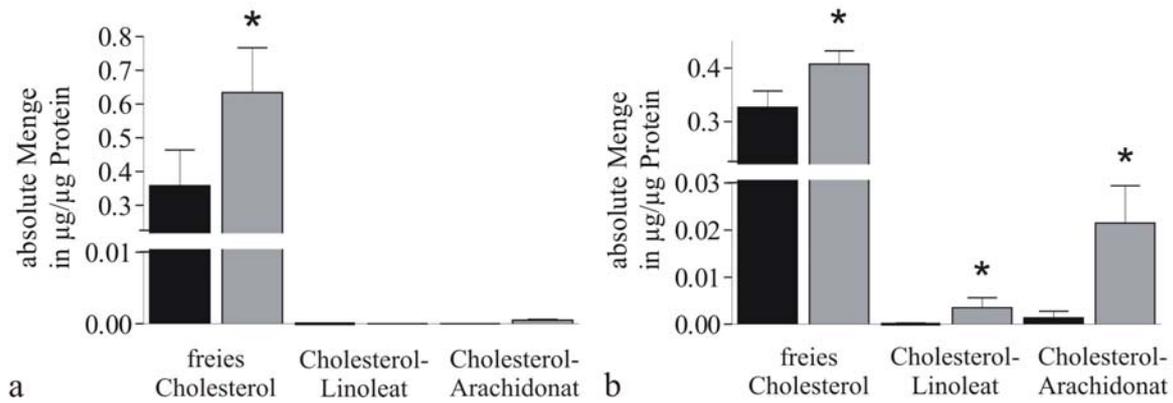
Zur Quantifizierung wurden in BBM- und medullärer GM-Fraktion die absoluten Mengen von Cholesterol, Cholesterol-Lineolat und Cholesterol-Arachidonat durch RP-HPLC bestimmt. Die Ergebnisse mit signifikant höheren Werten in den Rattennieren mit Anti-Thy1-GN sind in Tab. 7 sowie Abb. 13. dargestellt.



**Abb. 12. Auftrennung von Membranfraktionen in Cholesterol (C), Glycerophospholipide (G) und Sphingolipide (S).** Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte (a) BBM-Fraktion und medulläre (b) GM-Fraktion aus Nieren gesunder Kontrollratten und Ratten mit Anti-Thy1-GN.

**Tab. 7.** Freies Cholesterol, Cholesterol-Lineolat und -Arachidonat in BBM- und medullärer GM-Fraktion aus Rattennieren mit Anti-Thy1-GN vs. gesunder Kontrollen. (MW [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  Protein]  $\pm$  SD; n = 5, p < 0,05 \*).

<b>BBM-Fraktion</b>	<b>Ratten mit Anti-Thy1-GN vs. gesunde Kontrollen</b>
freies Cholesterol [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein]	0,634 $\pm$ 0,311 vs. 0,358 $\pm$ 0,213 *
<b>GM-Fraktion, medullär</b>	
freies Cholesterol [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein]	0,408 $\pm$ 0,050 vs. 0,327 $\pm$ 0,061 *
Cholesterol-Lineolat [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein]	0,004 $\pm$ 0,004 vs. 0,0 *
Cholesterol-Arachidonat [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Protein]	0,022 $\pm$ 0,016 vs. 0,001 $\pm$ 0,003 *

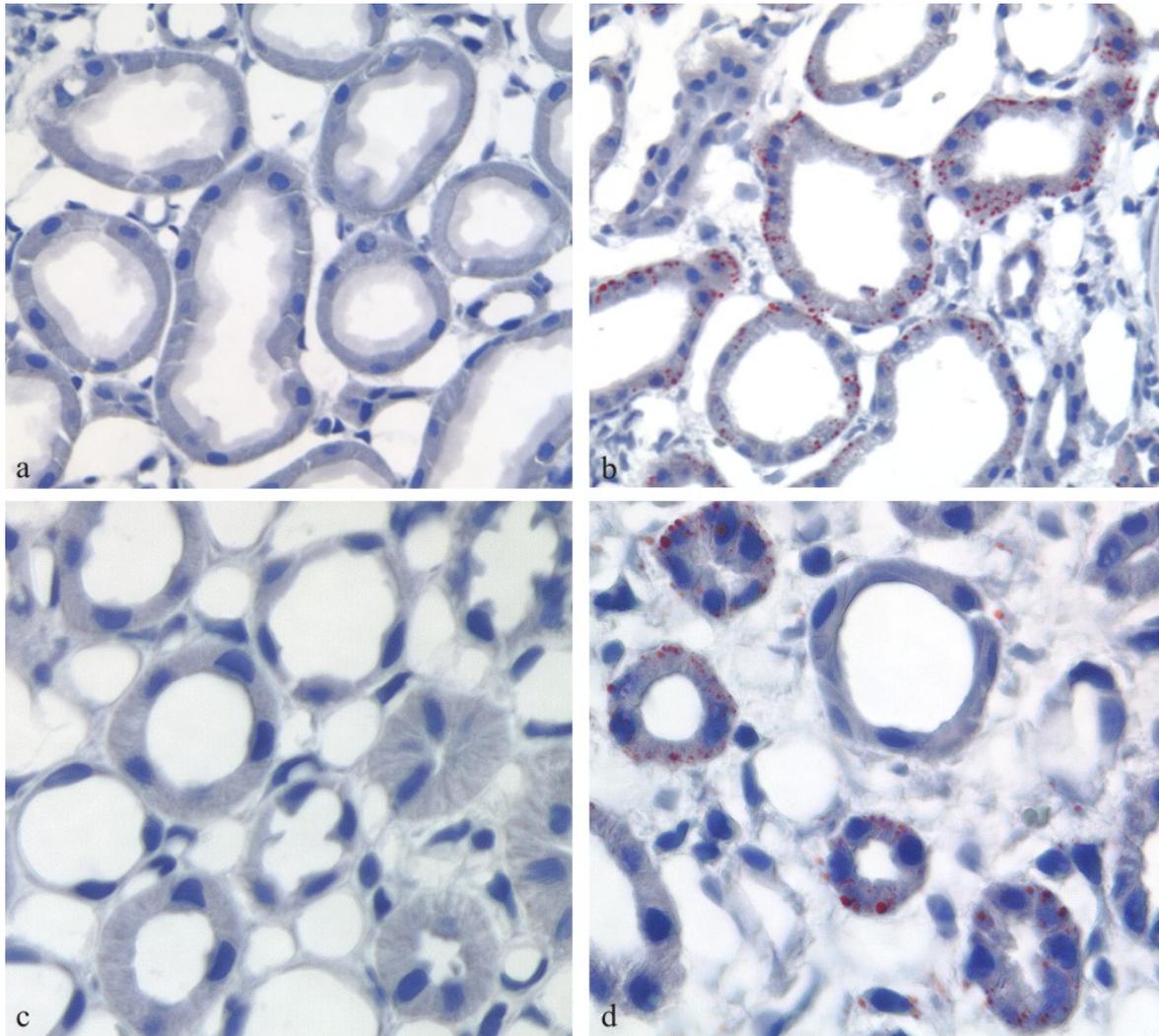


**Abb. 13. Mengen von Cholesterol und Cholesterol-Estern in BBM und medullärer GM-Fraktion.** Die RP-HPLC der (a) BBM-Fraktion zeigt im Vergleich zu gesunden Kontrollen (schwarz) in den Rattennieren mit Anti-Thy1-GN (grau) signifikant erhöhte Mengen an freiem Cholesterol. Die Ester Cholesterol-Lineolat und Cholesterol-Arachidonat sind in beiden Gruppen unter der Messgrenze. In der (b) medullären GM-Fraktion sind die Mengen von Cholesterol, Cholesterol-Lineolat und -Arachidonat in den glomerulonephritischen Nieren signifikant erhöht. (MW [ $\mu\text{g}/\mu\text{g Protein}$ ]  $\pm$  SD; n = 5 pro Gruppe, p < 0,05 \*).

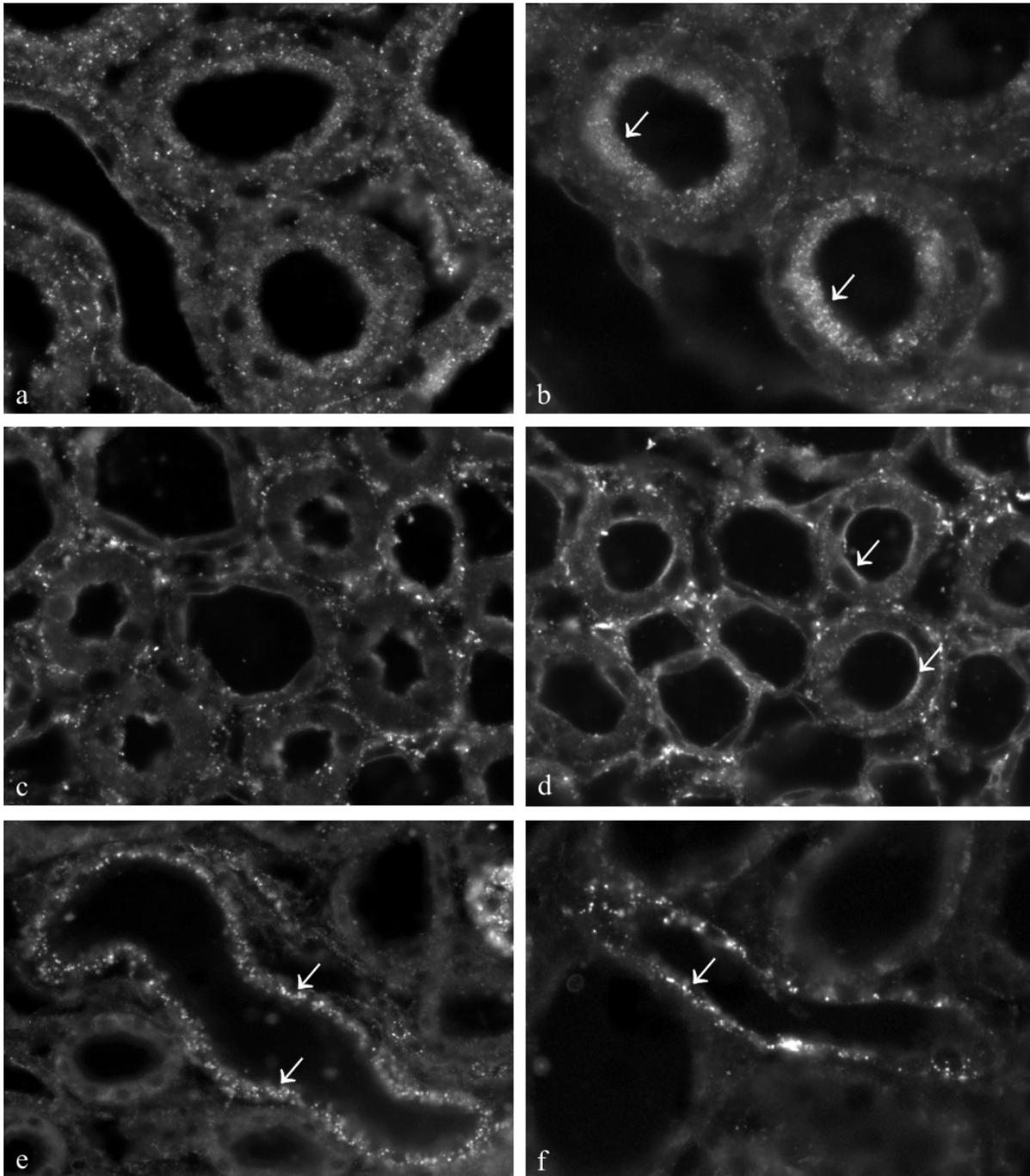
#### 4.8 Intrazelluläre Lipidablagerungen

Intrazellulär akkumulierte Lipide wurden durch Sudan-III-Färbungen registriert. In den anti-Thy1-glomerulonephritischen Rattennieren wurden Lipidablagerungen in Zellen des proximalen Tubulus sowie der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife lokalisiert. In den Tubuluszellen der gesunden Kontrollratten fehlten vergleichbare positive Signale (Abb. 14.).

Cholesterol-spezifische Filipin-Färbungen zeigten sowohl in den Nieren gesunder Kontrollen als auch in den Rattennieren mit Anti-Thy1-GN positive Signale. Im Vergleich zum Kontrollzustand war allerdings die Markierung in den glomerulonephritischen Nieren deutlich intensiver, lokalisiert in den Epithelzellen der BBM sowie der distalen Tubulusmembran. In der medullären dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife erschien das Signal an der apikalen Membran akzentuiert (Abb. 15.).



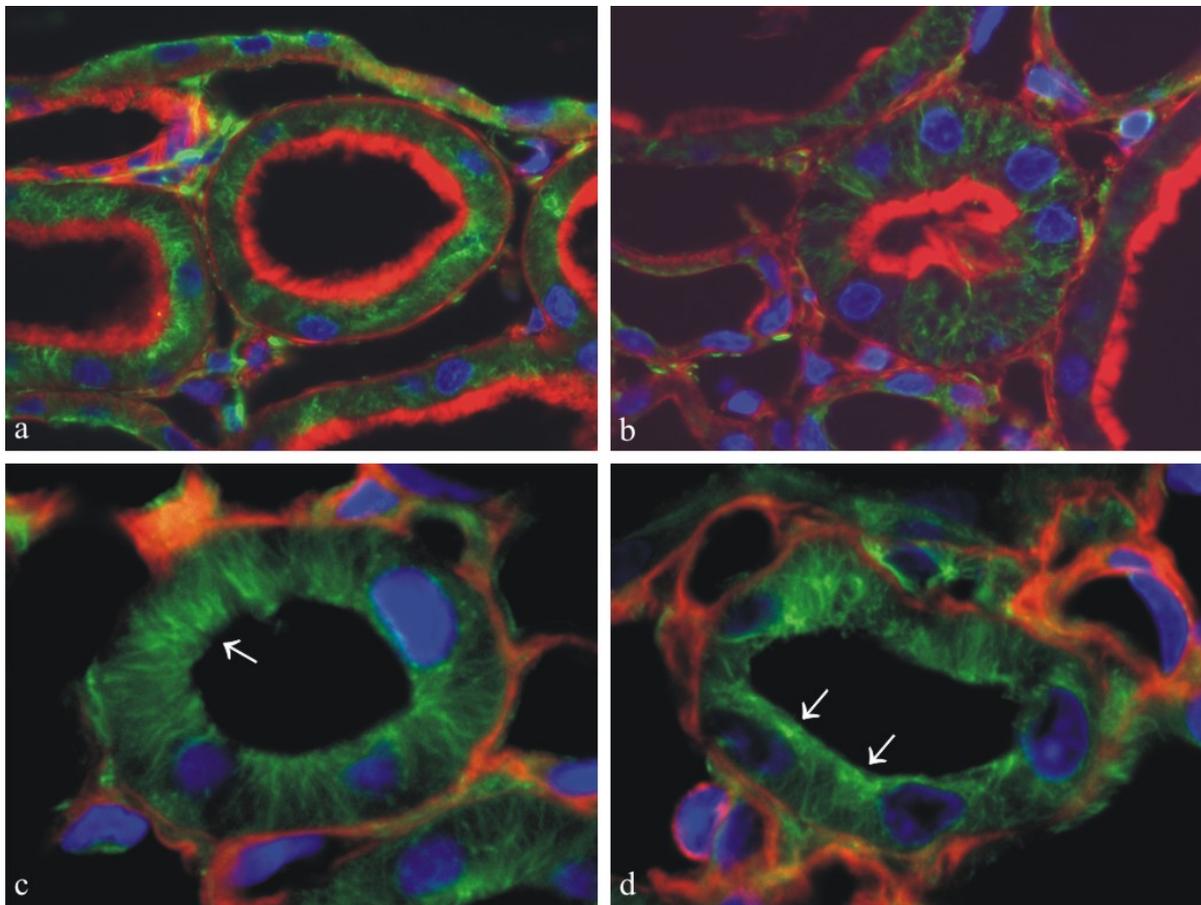
**Abb. 14. Intrazelluläre Akkumulation von Lipiden.** Die Sudan-III-Färbung gesunder Kontrollratten (a, c) zeigt weder im proximalen Tubulus (a) noch in der Henle'schen Schleife (c) positive Signale. Dagegen werden in der Niere der Ratte mit Anti-Thy1-GN (b, d) intrazelluläre Lipidablagerungen im proximalen Tubulus (b) sowie in den Epithelzellen der medullären dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife (d) markiert. (Vergrößerung [a-d] x 200).



**Abb. 15. Intrazelluläre Ablagerung von Cholesterol.** Fluoreszenz-gekoppelte Filipin-Färbungen zeigen in Nieren gesunder Kontrollratten (a, c) wenig abgelagertes Cholesterol in den Zellen des proximalen Tubulus (a) und kaum in Zellen des distalen Tubulus (c). Dagegen wird in der Rattenniere mit Anti-Thy1-GN (b, d - f) deutlich mehr Cholesterol in den Epithelzellen des proximalen Tubulus (b, e) sowie der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife (d, f) abgelagert (*Pfeile*). Positive Signale sind vor allem entlang der luminalen Membran nachweisbar (f). (Vergrößerung [a-b] x 250; [d-f] x 200).

#### 4.9 Veränderungen im mikrotubulären Netzwerk

Paraffinschnitte wurden mit Antikörpern, gerichtet gegen  $\alpha$ -Tubulin und Phalloidin gegen Aktin gefärbt und mit DAPI kernmarkiert, um die mikrotubuläre bzw. mikrovillöse BBM-Organisation zu untersuchen. Im Vergleich war in den proximalen Tubuluszellen der glomerulonephritischen Rattennieren das Signal für  $\alpha$ -Tubulin abgeschwächt. Die Strukturen machten den Eindruck einer Rarifizierung. In der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife der Nieren mit Anti-Thy1-GN war die Anordnung von  $\alpha$ -Tubulin irregulärer als bei den Kontrollen. Das Signal erschien zudem an der apikalen Membran konzentriert. Aktin als Element der BBM-Mikrovilli blieb unverändert (Abb. 16.).



**Abb. 16. Veränderungen im mikrotubulären Netzwerk.** Die Immunhistochemie mit  $\alpha$ -Tubulin (grün), Aktin (rot) und DAPI (blau) zeigt in der Kontrollniere (a, c) im (a) proximalen Tubulus eine regelmäßige Anordnung von Aktin und  $\alpha$ -Tubulin sowie in der (c) dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife von  $\alpha$ -Tubulin (*Pfeil*). In der Niere mit Anti-Thy1-GN (b, d) ist im (b) proximalen Tubulus das  $\alpha$ -Tubulin-Signal abgeschwächt, Aktin bleibt unverändert. In der medullären dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife (d) erscheint das Signal für  $\alpha$ -Tubulin unregelmäßig und an der apikalen Tubulusmembran akkumuliert (*Pfeile*). (Vergrößerung [a-d] x 400).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Klinische und laborchemische Veränderungen**

In dieser Arbeit wurden intrarenal epitheliale Veränderungen untersucht, die mit einer primären Volumenretention beim nephritischen Syndrom im Zusammenhang stehen. Vergleichbar dem nephrotischen Syndrom (Ibrahim et al. 2000), sind auch nephritische Symptomkomplexe als Folge akuter Glomerulonephritiden mit einer massiven Volumenretention assoziiert (Brunkhorst et al. 2000; Haller und Gross 2003). Postuliert wurde, dass systemische Einflüsse weitgehend ausgeschlossen und in den nephritischen Nieren tubulo-epitheliale Veränderungen als Ursache von Antinatriurese gezeigt werden können. Dafür wurden Wistar-Ratten Antikörper, gerichtet gegen glomeruläre Thy1-Epitope injiziert, um ein nephritisches Krankheitsbild, eine akute Anti-Thy1-GN zu induzieren (Jefferson und Johnson 1999; Kriz et al. 2003). Erwartungsgemäß entwickelten die behandelten Tiere die charakteristische Proteinurie und Albuminurie mit einem Maximum am sechsten Tag nach Krankheitsinduktion (vgl. Nakayama et al. 1998). Außerdem schieden die Tiere mit Anti-Thy1-GN signifikant weniger Natrium im Urin aus als gesunde Kontrolltiere, obwohl die alimentäre Natriumaufnahme in beiden Gruppen gleich war. Besonders im distalen Tubulusabschnitt dieser antinatriuretischen Tiere wurden verändert exprimierte Natriumtransporter registriert, die Ausdruck einer primären Volumenretention sein können. Aber auch im proximalen Tubulus der glomerulonephritischen Nieren traten Veränderungen auf.

Das Modell der Anti-Thy1-GN der Ratte wurde bereits in Studien zur renalen Volumenretention eingesetzt. Im Rahmen von Untersuchungen zur experimentellen Hypertonie entwickelten anti-Thy1-glomerulonephritische Versuchstiere hypertensive Blutdruckwerte, die 15 bis 25 mmHg über denen der gesunden Kontrollen lagen (Liebler et al. 2004; Dechow et al. 2001). Dennoch wurde bei den anti-Thy1-behandelten Tieren der vorliegenden Arbeit noch keine Veränderung des Blutdrucks festgestellt. Die signifikant reduzierte Natriumausscheidung weist allerdings auf die gestörte Volumenhomöostase mit Natriumretention hin. Es ist daher anzunehmen, dass sich bei diesen Tieren erst im zeitlichen Verlauf Blutdruckanstieg und Ansammlung interstitieller Flüssigkeitsmengen entwickeln, wie für proteinurische Syndrome mit Volumenstörungen typisch ist (Luft 2003). Hypertensive Blutdruckwerte können bei Messung nach längerer anti-Thy1-glomerulonephritischer Krankheitsdauer angenommen werden.

Tubulo-epitheliale Dysfunktionen weisen auf eine primäre Natriumretention bei den anti-Thy1-glomerulonephritischen Tieren hin. Allerdings kann ein Einfluss der eingeschränkten GFR auf die reduzierte Natriumausscheidung nicht ausgeschlossen werden. Die GFR korreliert mit der Filtrationsfläche, also mit der Anzahl funktionsfähiger Nephrone. Eine Reduktion der GFR bewirkt die Abnahme des glomerulär filtrierte Natriums und so eine verminderte Natriuresis. Auch die verminderte Ausscheidung anderer Elektrolyte wie Kalium und Chlorid ist durch die eingeschränkte GFR erklärbar.

Demgegenüber haben Mikropunktionsstudien entlang des Nephrons gezeigt, dass bei Ratten mit unilateralem nephrotischen Syndrom die reduzierte Natriumausscheidung trotz eingeschränkter GFR auf eine gesteigerte tubuläre Rückresorption zurückzuführen war (Ichikawa et al. 1983). Die GFR-Verminderung führte zunächst zur Abnahme der glomerulären Natriumfiltration und zur reduzierten Rückresorption im proximalen und frühdistalen Tubulus. Allerdings waren im spät-distalen Tubulus die Natriummengen in der nephrotischen Niere und in der gesunden Kontrollnieren immer mehr angeglichen und schließlich gleich (ebd.). Die um zwei Drittel reduzierte Natriumausscheidung im Urin der nephrotischen Niere konnte daher nur mit einer erhöhten Rückresorption im spät-distalen Tubulus oder Sammelrohr zusammenhängen. Auch die medikamentöse Anhebung der GFR auf Ausgangsniveau führte dementsprechend nicht zur Normalisierung der Natriumexkretion (ebd.). Diese Beobachtung könnte auf den nephritischen Symptomkomplex übertragbar sein.

Isoliert tubuläre Ursachen für Antinatriuresis führen zur Steigerung der berechneten fraktionellen Natriumexkretion. Allerdings verliert dieser Parameter der tubulären Funktion an Aussagekraft, wenn die Natriumausscheidung durch eine reduzierte GFR beeinflusst ist, wie bei den Ratten mit Anti-Thy1-GN. Auch eine kompensatorisch gesteigerte Ausscheidung von Natrium in einzelnen, noch uneingeschränkt funktionstüchtigen Nephronen würde diesen Wert verändern.

Die parallel reduzierte Ausscheidung von Chlorid ist dagegen im Zusammenhang mit Natriumgekoppelten Transportprozessen erklärbar. Die tubulo-epitheliale Aufnahme von Chlorid-Ionen wird über die Aktivität des Natriumtransports bestimmt bzw. auch über die gleichen tubulären Transporter bewirkt (Luft 2003). Eine gesteigerte Natriumresorption ist so mit einer reduzierten Ausscheidung auch anderer Elektrolyte verbunden (ebd.). Die Urinosmolalität der nephritischen Ratten bei kaum erhöhter Urinausscheidung weist auf einen renalen Konzentrierungsdefekt hin.

Eine gängige Hypothese führt die Natriumretention im proteinurischen Krankheitszustand auf einen Zustand des Volumenmangels zurück (*underfill-hypothesis*). Durch den Proteinverlust im Urin resultiere eine Abnahme des kolloidosmotischen Drucks im Gefäßsystem. Folge sei ein Flüssigkeitsübertritt aus dem intravasalen in den extravasal-interstitiellen Raum (Ibrahim et al. 2000). Die renale Retention von Volumen erfolge daraufhin sekundär-reaktiv, vor allem über die Aktivierung des RAAS. Alle glomerulonephritischen Tiere dieser Arbeit entwickelten eine signifikante Proteinurie mit Albuminurie, blieben aber unverändert normoproteinämisch. Dieser fehlende Einfluss auf den Blutproteingehalt macht Veränderungen des kolloidosmotischen Drucks bzw. des korrekterweise zu betrachtenden transkapillären onkotischen Druckgradienten unwahrscheinlich (vgl. Burton und Rose 2007; Ellison 1999; Koomans et al. 1987). Auch die unveränderten Urinvolumina der glomerulonephritischen Tiere sprechen gegen den Zustand einer Volumendepletion. Ein zirkulatorischer Volumenmangel wird typischerweise über eine Aktivierung der systemischen Gegenregulation mit einer oligo- bis anurischen statt normurischen Ausscheidung beantwortet (Shapiro et al. 1986). Dies wäre auch entsprechend der genannten Volumenmangel-Hypothese zu erwarten. Damit wird eine sekundär-reaktiv verursachte Volumenretention im Zustand der Anti-Thy1-GN unwahrscheinlich.

## 5.2 Histopathologische Veränderungen

Histopathologische Veränderungen in den Nieren der anti-Thy1-glomerulonephritischen Tiere wurden an PAS-gefärbten Schnitten untersucht. Es konnten charakteristische Merkmale der zeitlich aufeinander folgenden Krankheitsstadien der Anti-Thy1-GN nachgewiesen werden. Als typische Frühschäden traten zelluläre Mesangiolyse mit ödembedingter Ballonierung sowie glomeruläre Hypertrophie mit Kapillarverbreiterung auf (vgl. Kriz et al. 2003). Typische Spätzeichen wurden in mesangialer Matrixverbreiterung und zellulärer Halbmondformierung (engl. *creascent*s) erkennbar (vgl. Jefferson und Johnson 1999). Während die frühen, isoliert glomerulären Schädigungen potentiell reversibel sind und in regenerative Prozesse einmünden können (Kriz et al. 2003), sind kollabierte, atubuläre oder zystisch modifizierte Glomeruli funktionslos und meist irreversibel geschädigt (Kriz und LeHir 2005). Die Progression beginnt im Glomerulum mit einem Separationsverlust zwischen Kapillarknäuel und Bowman-Kapsel. Diese von Podozyten und Parietalzellen ausgehenden Überbrückungen zwischen glomerulärer und parietaler Basalmembran erscheinen histologisch als sog. Halbmonde (ebd.). Dabei ist eine Differenzierung in proteinöse Halbmonde durch fehlgeleitete Filtration und zelluläre Halbmonde durch epitheliale Zellproliferation (*proteinaceous* bzw. *cellular crescents*) möglich.

Neben diesem direkten Übergreifen der Schädigung vom Glomerulum auf das Tubulussystem durch Halbmondbildung (LeHir und Besse-Eschmann 2003; Kriz et al. 2003) kann auch fehlgeleitetes Filtrat, welches proximal den Raum zwischen Epithel und tubulärer Basalmembran erweitert, zu Obstruktion und tubulärer Degeneration führen (Kriz et al. 2001). Resultat sind funktionslose atubuläre Glomeruli bzw. Glomeruli-Reste (Kriz und LeHir 2005), die in den glomerulonephritischen Nieren dieser Arbeit ebenfalls zu finden waren. Primäre Schädigungen des Tubulussystems sollten allerdings ausgeschlossen werden, um gezielt die Veränderungen zu identifizieren, die aus glomerulärer Barrierestörung und Proteinurie resultieren können.

Im Tubuluslumen wurden PAS-positive Ablagerungen (*tubular casts*) gefunden, die Zeichen der tubulären Proteinüberladung sind. PAS-positive Reaktionen innerhalb der Tubulusepithelzellen weisen auf eine endozytotische Wiederaufnahme der glomerulär filtrierten Proteine hin. Die Anreicherungen wurden hauptsächlich in den Zellen des proximalen Tubulus sowie der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife gefunden. In diesen Segmenten scheint eine gesteigerte endozytotische Proteinaufnahme stattzufinden.

In den glomerulonephritischen Rattennieren wurden neben geschädigten Nephronen auch nicht oder kaum beeinflusste Glomeruli zu finden. Diese tier- und nephron-individuellen Unterschiede sind für die Schädigung bei Anti-Thy1-GN typisch (Kriz et al. 2003), wurden aber auch für andere experimentelle Glomerulopathien gezeigt (Rosenberg et al. 1994). Die Ursachen dieses heterogenen Schädigungsmusters blieben bislang weitgehend unverstanden. Denkbar ist ein individuell unterschiedlich starkes Ansprechen auf die renale Schadensinduktion mit sensibleren und resistenteren Tieren bzw. Nephronen innerhalb eines Tieres.

### **5.3 Immunreaktion bei Anti-Thy1-GN**

Die Immunantwort der Anti-Thy1-GN verläuft komplementvermittelt (Yamamoto und Wilson 1987). Die Induktion der glomerulonephritischen Pathogenese wurde immunhistochemisch mit Antikörpern kontrolliert, die gegen Faktoren der Komplementkaskade gerichtet waren. Positive Signale bestätigten die Aktivierung des Komplementsystems über Faktor C6 zum Membranlyse-Komplex C5b-9. Besonders intensive Signalantworten im intraglomerulären Mesangium der anti-Thy1-nephritischen Nieren entsprechen dem Bild bei glomerulären Erkrankungen. Positive Signale im Tubuluslumen sind auf die Filtration von Komplementfaktoren durch geschädigte glomeruläre Strukturen zurückzuführen.

Diese unterliegen der endozytotischen Rückaufnahme, so dass auch innerhalb von Tubuluszellen positive Signale detektiert wurden. Schwach positive Signale im perivaskulären Bereich waren sowohl in glomerulonephritischen wie auch gesunden Nieren nachweisbar. Ursachen sind auch unter physiologischen Bedingungen stattfindende Komplementaktivierung und kapilläre Immunkomplexablagerung.

## **5.4 Expressionveränderungen tubulärer Transportproteine**

### 5.4.1 Veränderungen im proximalen Tubulus

Der Hauptanteil der Natriumrückresorption wird unter physiologischen Bedingungen durch den proximalen Tubulus gewährleistet. Inwieweit dieses Segment unter nephritischen Bedingungen für die gesteigerte Natriumretention verantwortlich ist, sollte getestet werden. In Westernblots waren in der BBM des proximalen Tubulus glomerulonephritischer Nieren die Expressionsraten von NHE3, NaPi-IIa und AQP1 signifikant reduziert. Diese Expressionsverminderung wurde immunhistochemisch bestätigt. Die drastische Reduktion der Transporterdichte von NHE3 und NaPi-IIa spricht zunächst deutlich gegen eine gesteigerte Natriumresorption im proximalen Segment. Beim Puromycin-Aminonukleosid (PAN)-induzierten nephrotischen Syndrom wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt und Abnahmen der proximal lokalisierten Natriumtransporter nachgewiesen (Kim et al. 2004; Besse-Eschmann et al. 2002). Allerdings ergaben anschließende Aktivitätsmessungen von NHE3 in Vesikelpräparationen signifikant gesteigerte Aktivitätsraten in den PAN-nephrotischen Nieren, trotz der reduzierten Gesamtproteinmenge von NHE3. Als direkt regulierender Faktor von NHE3 wurde glomerulär filtriertes Albumin diskutiert (ebd.). Nachgewiesen wurden Veränderungen von intrazellulären Vesikeltransporten mit vermehrter Reinsertion inaktiver Transporter sowie gesteigerter Exozytose neugebildeter NHE3-Transporter in die apikale Membran (Klasic et al. 2003). Gleichzeitig wurde die Transformation von einer inaktiven, mit Megalin assoziierten Form zu einer megalinfreien aktivierten Form von NHE3 postuliert (Besse-Eschmann et al. 2002; Biemesderfer et al. 2001).

NHE3 hat mit etwa 70 % den größten Anteil an der Natriumrückresorption im Tubulussystem. Werden die physiologische Bedeutung sowie die Beobachtungen beim nephrotischen Syndrom berücksichtigt, kann auch im nephritischen Zustand nicht direkt von Expressionsverminderung auf eine proximal reduzierte Natriumrückresorption geschlossen werden.

Neben Veränderungen der intrazellulären Vesikeltransporte (ebd.) nehmen endo- und parakrine Faktoren unmittelbaren Einfluss auf die Transportprozesse im tubulären Epithel. Wie inflammatorische Zytokine, die im glomerulonephritischen Zustand exprimiert werden (Benigni und Remuzzi 2001), stimuliert auch Ang II den Natrium- und Wassertransport im proximalen Tubulus unabhängig von Veränderungen der GFR (Leong et al. 2006). Allerdings wiesen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere lokal und systemisch verminderte Konzentrationen von Renin auf, welches als Schlüsselenzym in der Kaskade des RAAS mit der Bereitstellung von Ang II gilt. Die Blockade von Ang II bewirkt einen Abfall des proximalen Natriumtransports durch Aktivitätshemmung und verminderte Expression von NHE3 (Kwon et al. 2005; Kim et al. 2005). Die RAAS-Veränderungen bei den anti-Thy1-glomerulonephritischen Tieren könnten einen vergleichbaren negativen Effekt auf die Aktivität und Expression von NHE3 bewirken und damit die Kapazität des Natriumtransports im proximalen Tubulus deutlich reduzieren.

Um strukturelle Destruktionen der BBM in den glomerulonephritischen Nieren als Ursache der verminderten Transporterdichte im proximalen Tubulus auszuschließen, wurde die Expression von Megalin und Villin untersucht. Die minimalen Abweichungen beider Parameter weisen auf ausschließlich geringe Schäden der BBM hin und korrelieren nicht mit der Reduktion der proximalen Natriumtransporter. Immunhistochemisch mit Phalloidin-markiertem Aktin konnte ebenfalls keine Destruktion der BBM festgestellt werden. Allerdings lassen die Reduktion der GFR und die starke Expressionsabnahme von AQP1 eine Aktivierung des TGF vermuten. Analysen AQP1-defizienter Mäuse zeigten enorme Reduktionen der Wasserabsorptionskapazität im proximalen Tubulus, die mit der Aktivierung des TGF beantwortet wurde, um einen weiteren Verlust von Natrium und Wasser in das distale Nephron zu verhindern (Schnermann et al. 1998).

#### 5.4.2 Veränderungen im distalen Tubulus und Sammelrohr

Unter physiologischen Bedingungen sind der distale Tubulus und das Sammelrohr für die Feinregulation der Volumenhomöostase entscheidend (Rose 1994). Im nephrotischen Zustand dagegen wurden die distalen Tubulussegmente für die pathologisch gesteigerte Natriumretention verantwortlich gemacht (Ichikawa et al. 1983; Buerckert et al. 1991; Féraille et al. 1993; Deschenes et al. 2001). Motor der apikalen Rückresorption von Natrium ist proximal wie distal die Aktivität der NKA, die basolateral Natriumionen aktiv aus der Tubulusepithelzelle schleust (Luft 2003). In den anti-Thy1-glomerulonephritischen Rattennieren wurden in Westernblots und Immunhistochemie kortikal und medullär gesteigerte Expressionsraten der NKA nachgewiesen.

Diese könnten Grundlage einer erhöhten apikalen Natriumrückresorption bei der Anti-Thy1-GN sein. Auch in Tiermodellen mit unilateralem nephrotischen Syndrom wurde die gesteigerte Natriumretention auf eine Aktivitätssteigerung der NKA zurückgeführt (Ichikawa et al. 1983; Buerkert et al. 1991; Féraïlle et al. 1993), besonders im kortikalen Sammelrohr (ebd.). Mikropunktionsstudien kamen zum gleichen Ergebnis erhöhter Synthese- und Expressionsraten der NKA im Sammelrohr (Deschenes et al. 2001). Allerdings blieben die auslösenden Ursachen und Mechanismen dieser Aktivierung der NKA bislang noch unklar.

Im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife ist NKCC2 für die Rückresorption von Natrium verantwortlich (Luft 2003; Knepper und Brooks 2001). Medullär erschienen in den anti-Thy1-glomerulonephritischen Nieren mRNA und Protein von NKCC2 abschnittsweise deutlich vermehrt. Gleichzeitig wurden immunhistochemisch Zeichen einer zellulären Umverteilung mit Akkumulierung von NKCC2 in der apikalen Membran festgestellt. In der Pathogenese der Anti-Thy1-GN ist das Zytokin TGF- $\beta$  entscheidend beteiligt (Hartner et al. 2003), kritische Rollen werden diesem beispielsweise für die Induktion der Matrixexpansion und Fibrose zugeschrieben (Bassuk et al. 2000; Yamamoto et al. 1994). Beim nephrotischen Syndrom wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  auch den NKCC2-vermittelten Natriumtransport aktivieren kann (Lang et al. 2000). Dabei ist die Aktivierung einer Serin-Threonin-Kinase, der Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase (SGK) entscheidend beteiligt (ebd.). Es ist denkbar, dass eine Umverteilung von NKCC2 in die apikale Membran auch beim anti-Thy1-nephritischen Zustand durch TGF- $\beta$  bewirkt ist und daraus Veränderungen im Natriumtransport resultieren können. Eine solche Aktivitätssteigerung von NKCC2 in der Henle'schen Schleife würde zur Reduktion des Natriumangebots an der Macula densa und Enthemmung des TGF führen, schließlich mit der Folge einer gesteigerten GFR (Schnermann und Briggs 1982). Andererseits spielt NKCC2 eine bedeutende Rolle im Konzentrierungsmechanismus der renalen Medulla (Masilamani et al. 2000). Eine verminderte Osmolalität im Urin der glomerulonephritischen Tiere weist auf einen Konzentrierungsdefekt, also auf eine verminderte Aktivität von NKCC2 hin. Diese korreliert mit der abschnittsweise verminderten Expression von NKCC2 in der Henle'schen Schleife.

Die Spannweite der Ergebnisse von NKCC2 in In-Situ-Hybridisierung, Immunhistochemie und Westernblots sollte in weiteren Untersuchungen reevaluiert werden. Wie für histopathologische Schädigungen diskutiert, könnte das heterogene Expressionsmuster, welches nicht regelhaft einzelnen Segmenten der Henle'schen Schleife zuzuordnen war, auf ein unterschiedlich starkes Ansprechen einzelner Nephrone auf die Krankheitsinduktion zurückzuführen sein.

Im distalen Tubulus gewährleistet der aus drei homologen Untereinheiten bestehende ENaC ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC) den Natriumtransport im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (Meneton et al. 2004). Im pathologischen Zustand scheint ENaC für die gesteigerte Natriumrückresorption und Volumenretention im distalen Tubulus und Sammelrohr verantwortlich zu sein (Kim et al. 2004). In den anti-Thy1-glomerulonephritischen Rattennieren war die Expressionsrate von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in der kortikalen und medullären GM-Fraktion signifikant erhöht. Dies unterstützt die These einer pathologisch gesteigerten Natriumretention in Bereichen distal des Konvoluts (Kim et al. 2004; Deschenes et al. 2001). Besonders das Sammelrohr wurde als kritisches Segment identifiziert, in dem der ENaC-vermittelte apikale Natriumtransport massiv gesteigert war (ebd.). Daher konnte durch das Diuretikum Amilorid, welches isoliert die Natriumresorption durch ENaC hemmt, die Natriumbalance im kortikalen Sammelrohr nephrotischer Nieren Aldosteron-unabhängig wiederhergestellt werden (ebd.; Doucet et al. 2007; Lourdel et al. 2005).

Eine gesteigerte Expression von ENaC bei Proteinurie wurde nicht von allen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Yu et al. 2005; Audigé et al. 2003). Die Natriumrückresorption durch ENaC wird aber nicht allein durch eine gesteigerte Expression des Transporters bewirkt. An der Oberfläche der tubulo-epithelialen Membran scheinen aktive und inaktive Formen von ENaC parallel vorhanden zu sein (Hughey et al. 2007; Firsov et al. 1996; Masilamani et al. 1999). Im Westernblot war die Expression von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in den glomerulonephritischen Nieren mit dem Zuwachs von ENaC-Proteinen geringeren Molekulargewichts verbunden, für  $\alpha$ -ENaC von 65 kDa, für  $\gamma$ -ENaC von 70 kDa und 55 kDa. Diese Elektrophorese-Verschiebung kann durch eine enzymatische Spaltung der Hauptform von ENaC bewirkt werden (ebd.; Harris et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass Proteasen wie Trypsin (Vallet et al. 1997), Elastase (Harris et al. 2007) oder Proctasin (Hughey et al. 2007) durch enzymatische Abspaltung inhibitorischer Peptide die Reifung und Aktivierung von ENaC induzieren. Über einen rezeptorabhängigen Signalweg scheint Trypsin auch die Kanalöffnungswahrscheinlichkeit von ENaC positiv zu beeinflussen (Bengrine et al. 2007). Aber nicht nur lokale Proteasen aktivieren den Transporter ENaC, sondern auch proteolytische Enzyme im Harn wie glomerulär filtrierte Plasmin (Svenningsen et al. 2007). Eine Passage von Plasmaproteasen durch geschädigte Filterstrukturen findet auch bei einer akuten GN mit nephritischem Syndrom statt. Vergleichbare Vorgänge von enzymatischer Spaltung und Aktivierung von ENaC sind daher auch für die proteinurische Anti-Thy1-GN denkbar. So könnten die Westernblot-Ergebnisse einen größeren Pool aktiver  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC-Proteine anzeigen, die über proteolytische Spaltung der 83 kDa und 95 kDa-Hauptform entstanden sind. Diese würden mit einer gesteigerten Natriumrückresorption einhergehen.

Für  $\beta$ -ENaC wurden keine Veränderungen festgestellt, korrelierend mit der Resistenz gegenüber endogener bzw. exogener proteolytischer Spaltung (Harris et al. 2007).

Der signifikante Zuwachs der Gesamtproteinmenge sowie der Hauptformen von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in der medullären GM-Fraktion der anti-Thy1-glomerulonephritischen Nieren kann auf die Neusynthese sowie Rekrutierung vesikulär gespeicherter ENaC-Proteine hinweisen (Loffing et al. 2001; Kim et al. 2004; Deschenes et al. 2001). Neben der gesteigerten Expression wurden auch Dichtevermehrungen von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in der nach luminal gerichteten Tubulusepithelmembran gefunden. Diese Anreicherung in der apikalen Membran könnte das Ergebnis gerichteter Umverteilung von ENaC-Proteinen sein, um die Anzahl aktiver Transporter in der tubulären Membran zu vergrößern. Auch beim nephrotischen Syndrom wurde im distalen Konvolut, Verbindungstubulus und Sammelrohr erhöhte Akkumulationsdichten für ENaC in der apikalen Membran gezeigt und als Ergebnis zellulärer Umverteilung gewertet (Kim et al. 2004).

Wie für NKCC2 wurde auch für ENaC die Aktivierung durch die SGK (Chen et al. 1999; Náráy-Fejes-Tóth et al. 1999) sowie über SGK vermittelt durch TGF- $\beta$  gezeigt (Lang et al. 2000). Die erhöhte ENaC-Dichte im Epithel ist auf eine gesteigerte Insertionsrate zurückgeführt worden (De la Rosa et al. 1999). Postuliert wurde, dass die SGK über Phosphorylierung eines bislang noch nicht identifizierten Proteins die Umverteilung von ENaC aus einem intrazellulären Kompartiment in die epitheliale Membran und so eine gesteigerte Natriumpermeabilität bewirkt (ebd.). Die Natriumrückresorption durch ENaC war so direkt aktivierbar (Lang et al. 2000).

In Zellen des kortikalen Sammelrohrs wurde eine erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration als Hauptmodulator der basolateralen NKA gefunden (Blot-Chabaud et al. 1988). Denkbar wäre, dass die ENaC-vermittelte Natriumrückresorption im distalem Tubulus und Sammelrohr die basolateral lokalisierte NKA in den Epithelzellen aktiviert. Damit würde eine fortschreitende Natriumrückresorption aus dem Tubuluslumen entstehen und die massive Volumenretention beim nephritischen und nephrotischen Syndrom erklären. Derzeit sind aber die Ursachen und Mechanismen der NKA-Aktivierung im Tubulusepithel bei proteinurischen Erkrankungen noch nicht verstanden und bedürfen weiterer Untersuchung.

## 5.5 Einfluss systemischer Volumenregulationssysteme

Der spät-distale Tubulus und das Sammelrohr werden als die Aldosteron-sensitiven Abschnitte des Nephrons angesehen. Reguliert werden Transkription, Translation (Masilamani et al. 1999) sowie Translokation der ENaC-Untereinheiten (Löffing et al. 2001). Auch die Aktivierung von ENaC durch Aldosteron ist mit Veränderungen in der Mobilität einzelner ENaC-Untereinheiten verbunden (Kim et al. 2004). Die Expressionsveränderung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in den anti-Thy1-glomerulonephritischen Rattennieren hätte also, wenn über das Mineralokortikoid Aldosteron vermittelt, eine Aktivierung des RAAS nachweisbar machen müssen. Eine Aktivierung des RAAS erfolgt in erster Linie als Reaktion auf verminderte Plasmavolumina und den daraus resultierenden Natriumbedarf (Rodriguez-Iturbe et al. 1990). Die Aktivierung des RAAS in die entgegengesetzte, negative Richtung ist zu erwarten, sollten primäre, intrarenale Dysfunktionen zu einer unkontrollierten Natriumretention führen (ebd.), entsprechend der Volumenüberschuss-Hypothese. Die Induktion der Anti-Thy1-GN führte bei den betroffenen Tieren zu einer starken Abnahme der Transkription und Translation von Renin, die PRA war deutlich abgesunken. Die Ausschüttung von Renin aus den Zellen des JGA ist Schlüsselfaktor für die Bildung von Ang II und die Synthese und Sekretion von Aldosteron. Die reduzierten Renin-Parameter lassen daher auf die Reduktion anderer RAAS-Parameter wie Ang II und Aldosteron schließen. Beim nephrotischen Syndrom wurden vergleichbare Aktivitätsabnahmen gefunden (Rodriguez-Iturbe et al. 1990; Shapiro et al. 1990).

Um Aldosteron-analoge Effekte zu erklären, wurde eine Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors durch Glukokortikoide auf Grundlage einer gestörten Bereitstellung des Enzyms 11- $\beta$ -HSD2 postuliert (Vogt et al. 2002; Kim et al. 2006). Durch eine verminderte Synthese der 11- $\beta$ -HSD2 würden die Inaktivierung von 11-Hydroxysteroiden und damit der Schutz des nicht-selektiven Mineralokortikoid-Rezeptors vor Aktivierung durch Glukokortikoide entfallen (ebd.). Bei den Tieren mit Anti-Thy1-GN wurden keine Veränderungen der 11- $\beta$ -HSD2 festgestellt. Aber auch beim nephrotischen Syndrom sind die Veränderungen der 11- $\beta$ -HSD2 nicht konstant nachweisbar (Bstrup et al. 2005). Damit bleibt die Rolle glukokortikoid-verursachter Effekte am Mineralokortikoid-Rezeptor bei proteinurischen Symptomkomplexen nicht abschließend geklärt. Die Natriumretention bei Anti-Thy1-GN aber scheint nicht durch diese bewirkt zu sein.

Darüber hinaus wurden alternative, im Einzelnen noch nicht identifizierte Aktivierungswege von Aldosteron neben der „klassischen“ RAAS-Kaskade bei proteinurischen Erkrankungen postuliert

(Rosenberg et al. 1994; Correa-Rotter et al. 1992). Dechow et al. (2001) stellte bei Ratten mit Anti-Thy1-GN erhöhte intrarenale Aldosteron-Konzentrationen trotz reduzierter Renin-Synthese und PRA fest. Aldosteron-Effekte waren so auf Nephronenebene denkbar. Die Reduktion von Renin wurde auf die frühe Mesangiolyse im Rahmen der Anti-Thy1-GN mit Schädigung des JGA zurückgeführt. Über einen gestörten TGF wurde diese auch zur Erklärung der reduzierten GFR herangezogen (ebd.).

Eine pathologisch erhöhte Volumenretention auf Basis einer gesteigerten Wirkung von ADH am Sammelrohr ist bei den Tieren mit Anti-Thy1-GN ebenfalls ausgeschlossen. Die ADH-Plasmakonzentration blieb bei den nephritischen Tieren unbeeinflusst. Entsprechend fehlten immunhistochemische Veränderungen für den Wasserkanal AQP2 in den betroffenen Nieren.

## **5.6 Intrazelluläre Lipidablagerung und Membranzusammensetzung**

Zur klinischen Diagnose des nephrotischen Syndroms gehören Fettstoffwechselstörungen sowie Lipidurie (Marsh 2002). Entsprechende Beobachtungen finden sich im tierexperimentellen Versuch wie der PAN-induzierten Nephrose (Vaziri et Liang 1996; Streather et al. 1993). Auch die Ratten mit Anti-Thy1-GN entwickelten eine markante Lipidurie mit signifikant erhöhter Ausscheidung von Cholesterin und Cholesterin-Derivaten. Zusätzlich wurden durch spezifische Färbungen in Epithelzellen des proximalen Tubulus und der medullären Henle'schen Schleife Lipidanreicherungen festgestellt, die in den gesunden Kontrollnieren nicht vorhanden waren. Für Krankheitszustände mit Lipidurie werden im Tubulussystem Prozesse angenommen, die mit denen der endozytotischen Rückaufnahme von Proteinen vergleichbar sind. So wurde im Nierenkortex von Versuchstieren mit lipidurischer GN eine signifikant erhöhte Cholesterin-Menge nachgewiesen (Johnson et al. 2003). Diese konnte auf eine gesteigerte Aufnahme von Cholesterin aus dem Tubuluslumen zurückgeführt werden (ebd.). Bei Mäusen führte die tubuläre Überladung mit Fettsäuren und BSA zur zellulären Dysfunktion und systemischen Volumenretention (Kamijo et al. 2007).

Auch im anti-Thy1-glomerulonephritischen Zustand sind Veränderungen durch eine tubuläre Lipidüberladung denkbar. Intrazellulär akkumulierte Lipide könnten Transportweg und Oberflächenexpression neu synthetisierter Membranproteine stören und so mit der verminderten Expression von NHE3, NaPi-IIa und AQP1 im proximalen Tubulus sowie NKCC2 in der Henle'schen Schleife im Zusammenhang stehen.

Neben der Auftrennung der Membranen in der DC (vgl. Schmidt et al. 2001), wurden absolute Mengen von Membranlipidanteilen in der RP-HPLC bestimmt. In der BBM- und medullären GM-Fraktion der anti-Thyl-glomerulonephritischen Nieren waren Cholesterol und Cholesterol-Derivate signifikant erhöht. Sowohl eine gesteigerte intrazelluläre Syntheserate als auch eine vermehrte Aufnahme von filtriertem Cholesterol aus dem Tubuluslumen und dessen Einbau in die Membran könnte diesen Zuwachs bewirken (Johnson et al. 2003). Es ist bekannt, dass die Funktion epithelialer Transportsysteme durch Modifikation der Lipidbestandteile in der Zellmembran beeinflusst wird (Jentsch et al. 2004). Die registrierten Abweichungen in der Membranzusammensetzung könnten somit mit dem veränderten tubulären Natriumtransport im Zusammenhang stehen.

Für die Funktion der Transporter sind polare Sortierungsmuster und zelluläre Translokationen durch Endo- und Exozytose bzw. Insertion und Reinsertion bedeutend (ebd.). Dabei werden Transportproteine innerhalb von Membranen bzw. an Membranoberflächen in *lipid rafts* sortiert und konzentriert (Simons und Ikonen 2000). Für die Zusammensetzung und störungsfreie Funktion dieser Membrandomänen spielt wiederum Cholesterol die Schlüsselrolle (ebd.). Eine Abweichung der Cholesterol-Menge geht mit Veränderungen der Struktur (Simons und Ikonen 2000) sowie der Funktion wie Membranfluidität (Schuck und Simons 2004) einher. Dadurch werden Signalkaskaden und Transportmechanismen wie die Endo- und Exozytose beeinträchtigt (Murtazina et al. 2006; Pichler et al. 2004). Bereits vor vielen Jahren wurde der Einfluss der Cholesterol-Menge in der Membran auf die Aktivität von NaPi-IIa in der BBM (Levi et al. 1990) sowie auf die NKA in Vesikelfraktionen aus medullärem Nierenhomogenat (Yeagle et al. 1988) gezeigt. Die verminderte Expression von NHE3, NaPi-IIa und AQP1 im proximalen Tubulus könnte mit solchen Beeinträchtigungen zusammenhängen. Auch die veränderte Expression und Verteilung von Natriumtransportern in distalen Nephronabschnitten wie NKCC2, ENaC oder NKA können durch eine veränderte Lipidzusammensetzung der tubulären Membran beeinflusst sein. Für NKA (Welker et al. 2007), NKCC2 (Frühauf et al. 2007), ENaC (Hill et al. 2002) und NHE3 (Akhter et al. 2002; Murtazina et al. 2006) wurde die endgültige Prozessierung und funktionelle Bereitstellung in *lipid rafts* bereits nachgewiesen (Inoue et al. 2004; Schuck und Simons 2004).

## 5.7 Desorganisation im mikrotubulären Netzwerk

Die Rekrutierung von Membranproteinen in das Tubulusepithel erfolgt durch Transportprozesse, die durch eine ungestörte Organisation der Mikrotubuli gewährleistet werden (Pochynyuk et al. 2007). In den proximalen Tubuluszellen der anti-Thy1-glomerulonephritischen Ratten erschien das mikrotubuläre Netzwerk rarefiziert und fragmentiert, das immunhistochemische Signal von  $\alpha$ -Tubulin wirkte ungeordnet und war abgeschwächt. Gleichzeitig war die Expression von Transportern der BBM deutlich reduziert. Die Rarefizierung der Mikrotubuli erinnerte an die Behandlung proximaler Zellen mit Colchizin, das die Aggregation von Tubulin-Dimeren und damit die regelhafte Organisation des Netzwerkes unterbindet (Lötscher et al. 1999). Mit der Colchizin-Behandlung war eine Reduktion des BBM-Transporters NaPi-IIa verbunden (ebd.). Ähnliche Ergebnisse wurden für NHE3 (Chalumeau et al. 2001) und AQP1 (Baus et al. 2000; Elkjaer et al. 1995) gezeigt. Mikrotubuläre Störungen scheinen also mit einer verminderten Transporterexpression einherzugehen. Gleichzeitig korreliert das Ausmaß der mikrotubulären Unterbrechung mit der Stärke der Proteinurie (Osicka et al. 2003). Folge ist die eingeschränkte Transportkapazität der tubulären Membran.

Auch distal kann mikrotubuläre Desorganisation die Exo- und Endozytose bzw. Internalisierung tubulärer Transporter in die Membran stören (Sabolic et al. 2002). In der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife fielen fragmentierte und an der apikalen Zellmembran akkumulierte Mikrotubuli-Strukturen auf. Abschnittsweise wurde der Iontentransporter NKCC2 in In-Situ-Hybridisierung, Westernblot und Immunhistochemie vermindert gefunden. Auch für NKCC2 wurde die Bedeutung mikrotubulärer Strukturen auf die apikale Umverteilung bereits gezeigt (Lionetto und Schettino 2006).

Basolateral lokalisierte Transportsysteme wie die NKA scheinen nicht oder nur minimal betroffen zu sein (Efendiev et al. 2000). Diskutiert wird aber eine fortlaufende Störungskaskade im mikrotubulären System mit einem weiteren Funktionsverlust des Epithels sowie schließlich auch struktureller Destruktion von BBM und distaler Tubulusmembran (Sabolic et al. 2002).

## 6 Zusammenfassung

Proteinurische Nierenerkrankungen wie das nephrotische und nephritische Syndrom sind klinisch durch massive Natrium- und Volumenretention charakterisiert. In einem etablierten Tiermodell sollten tubulo-epitheliale Veränderungen registriert werden, die der gesteigerten Natriumretention beim nephritischen Syndrom zu Grunde liegen können. Es wurden Hypothesen geprüft, die als Ursachen der Volumenüberladung und Ödempathogenese beim nephrotischen Syndrom diskutiert werden. Wistar-Ratten wurden Antikörper gegen glomeruläre Thy1-Epitope injiziert, um eine akute Anti-Thy1-GN zu induzieren. Kontrolltiere erhielten PBS-Injektionen. Behandelte Tiere entwickelten Proteinurie und Lipidurie, blieben aber normoalbuminämisch. Die GFR war deutlich eingeschränkt. Ausdruck der nephritischen Natriumretention war eine stark reduzierte Natriumausscheidung im Urin. Histopathologisch und immunhistochemisch wurden typische Kennzeichen der Anti-Thy1-GN nachgewiesen.

Die veränderte Zusammensetzung des glomerulären Filtrats beeinträchtigte die Expression und Funktion tubulärer Transporter. In der BBM waren die Expressionsraten von NHE3, NaPi-IIa und AQP1 stark reduziert. In der Henle'schen Schleife wurde NKCC2 abschnittsweise erhöht sowie auch vermindert gefunden, die reduzierte Urinosmolalität wies auf den entsprechenden Konzentrationsdefekt hin. Intrazelluläre Protein- und Cholesterol-Ablagerungen im proximalen Tubulus und in der Henle'schen Schleife könnten damit assoziiert sein. Diese scheinen Ergebnis einer erhöhten endozytotischen Rückaufnahme zu sein. Zytoskelettäre Umbauten könnten die Insertion von Transportproteinen in das Tubulusepithel stören und so mit einer reduzierten Natriumrückresorption verbunden sein. Einige dieser Beobachtungen wurden auch bereits für das nephrotische Syndrom gezeigt. Allerdings wurden auch zelluläre Umverteilungen von NKCC2 mit Akkumulation in der apikalen Zellmembran festgestellt, die durch TGF- $\beta$  bzw. SGK vermittelt und auch mit einer Transporteraktivierung von NKCC2 verbunden sein könnten. In einem Zusammenhang könnten Veränderungen von Cholesterol in der Tubulusmembran stehen, die zu Abweichungen in der Funktion und Struktur von *lipid rafts* führen. In BBM und medullärer Membran waren die Mengen an Cholesterol bzw. Derivaten signifikant erhöht.

Eine systemisch-reaktive Volumenretention durch einen zirkulatorischen Volumenmangel wurde weitgehend ausgeschlossen. Renin als Schlüsselenzym im RAAS war in Protein, mRNA und PRA vermindert, ADH sowie die renale 11- $\beta$ -HSD2 blieben unverändert.

Wie für das nephrotische Syndrom diskutiert, scheinen für die Antinatriurese Veränderungen im spät-distalen Tubulus und Sammelrohr verantwortlich zu sein. So war die Expression von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC in den nephritischen Nieren signifikant erhöht. Umverteilung kann mit TGF- $\beta$  assoziiert sein. Zusätzliche Formen geringerer Proteingröße weisen auf proteolytische Spaltung hin, die im Zusammenhang mit Reifung und Aktivierung von ENaC stehen. Bei Proteinurie sind glomerulär filtrierte Plasmaproteasen denkbar, die diese Spaltung verursachen. Eine gesteigerte Expression der basolateral lokalisierten NKA im kortikalen und medullären Sammelrohr kann Grundlage des gesteigerten Natriumtransports im apikalen Tubulusepithel sein. Diese kann durch erhöhte ENaC-Aktivität sowie primäre, noch nicht ausreichend bekannte Aktivierungswege bewirkt sein.

Für die Volumenretention beim nephrotischen Syndrom wird die Volumenüberschuss- neben der Volumenmangel-Hypothese diskutiert (*overflow- bzw. underfill-hypothesis*). Für die nephritische Natrium- und Volumenretention im Modell der Anti-Thy1-GN wurden primäre, also intrinsische Veränderungen im Tubulusepithel, statt sekundär-reaktiv bewirkte Mechanismen gefunden. Einige der Erkenntnisse zur Pathophysiologie des nephrotischen Syndroms scheinen daher auf den nephritischen Zustand übertragbar zu sein. Dabei kann die Vielzahl der tubulo-epithelialen Veränderungen nicht zuletzt Ausdruck der Multikausalität von nephritischen Zuständen sein. Um die Fülle der Erkrankungen zu berücksichtigen, die zum nephritischen Syndrom führen, sollten neben dem Modell der Anti-Thy1-GN auch andere Tiermodelle berücksichtigt werden. Erst mit einem erweiterten Verständnis der pathogenetischen Abläufe können sich interventionelle und therapeutische Konzepte für die Humanmedizin ergeben. Dabei könnten Veränderungen, die im Modell der Anti-Thy1-GN registriert wurden, auch zur nephritischen Volumenretention beim Menschen mit Hypertonie und Ödemen führen. Allerdings setzt die Übertragung auf den Menschen fundiertes Wissen über die Entstehung und Aufrechterhaltung des pathologischen Zustandes sowie Kenntnisse aller Charakteristika des untersuchten Tiermodells voraus. Daher müssen Studien zur Funktions- und Molekularebene folgen, die den phänomenologischen Ansatz dieser Arbeit ergänzen und erweitern.

In dieser Arbeit wurden tubuläre Veränderungen beim nephritischen Syndrom gezeigt, die Ausdruck von epithelialer Dysfunktion und Natriumretention sind. Von besonderer Bedeutung für die nephritisch gesteigerte Rückresorption scheint der ENaC-vermittelte Natriumeintritt am distalen Tubulus und Sammelrohr zu sein. Durch gesteigerte Expression, Umverteilung sowie proteolytische Spaltung kann eine Aktivierung von ENaC die Volumenretention im Modell der nephritischen Anti-Thy1-GN bewirken.

## 7 Literaturverzeichnis

Akhter S, Kovbasnjuk O, Li X, et al. NHE3 is in large complexes in the centre of the apical surface of the proximal tubule-derived OK cells. *Am J Physiol Cel Physiol* 2002; 283:C927-40.

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

Audigé A, Yu ZR, Frey BM, Uehlinger DE, Frey FJ, and Vogt B. Epithelial sodium channel (ENaC) subunit mRNA and protein expression in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Clin Sci (Colch)* 2003; 104:389-95.

Bagchus WM, Hoedemaker PJ, Rozing J, Bakker WW. Glomerulonephritis induced by monoclonal Anti-thy-1.1 antibodies. *Lab Invest* 1986; 55:680-7.

Bassuk JA, Pichler R, Rothmier JD, et al. Induction of TGF-beta1 by the matricellular protein SPARC in a rat model of glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000; 57(1):117-28.

Baus M, Medjugorac-Popovski M, Brown D, Sabolic I. In colchicine-treated rats, cellular distribution of AQP-1 in convoluted and straight proximal tubule segments is differently affected. *Pflugers Arch* 2000; 439(3):321-30.

Bengrine A, Li J, Hamm LL, Awayda MS. Indirect activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by trypsin. *J Biol Chem* 2007; 282:26884-96.

Benigni A, Remuzzi G. How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:S21-4.

Besse-Eschmann V, Klisic J, Nief V, et al. Regulation of the proximal tubular sodium/proton exchanger NHE-3 in rats with Puromycin Aminonucleoside (PAN)- induces nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2199-206.

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* 1982; 647(2):169-76.

Biemesderfer D, DeGray B, Aronson PS: Active (9.6 S) and inactive (21 S) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *J Biol Chem* 2001; 276(30):10161-7.

Bistrup C, Thiesson HC, Jensen BL, Skøtt O. Reduced activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is not responsible for sodium retention in nephrotic rats. *Acta Physiol Scand* 2005; 184:161-9.

Blot-Chabaud M, Jaisser F, Gingold M, Bonvalet JP, Farman N. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-dependent sodium flux in cortical collecting tubule. *Am J Physiol* 1988; 255:F605-13.

Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 1995; 269:F793-805.

Brandt J, Pippin J, Schulze M, et al. Role of the complement membrane attack complex C5b-9 in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 49:335-43.

Brunkhorst R, Schulze M, Floege J. Klinische Verlaufsformen glomerulärer Erkrankungen. In: Koch (ed.). *Klinische Nephrologie*. Urban & Fischer München 2000: 168-175; 182-185.

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

Burton D, Rose MD. Mechanism and treatment of edema in nephrotic syndrome. UpToDate online 2007, (Accessed March 6, 2007, at: [http://www.uptodateonline.com/utd/cont...do?opicKey=glom\\_dis/12117.htm](http://www.uptodateonline.com/utd/cont...do?opicKey=glom_dis/12117.htm)).

Chalumeau C, du Cheyron D, Defontaine N, Kellermann O, Paillard M, Poggioli J. NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2):F283-90.

Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2514-9.

Christensen EI, Birn H. Megalin and Cubilin: Multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(4):256-66.

Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41(4):796-804.

Couser WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; 353:1509-15.

De la Rosa AD, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Canessa CM. The serum and glucocorticoid kinase SGK increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1999; 274(53):37834-9.

Dechow C, Morath C, Peters J, et al. Effects of all-trans retinoic acid on renin-angiotensin system in rats with experimental nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(5):F909-19.

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

Dorhout Mees EJ, Geers AB, Koomans HA. Blood volume and sodium retention in the nephrotic syndrome: a controversial pathophysiological concept. *Nephron* 1984; 36:201-11.

Doucet A, Favre G, Deschenes G. Molecular mechanism of edema formation in nephrotic syndrome: therapeutic implications. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:1983-90.

Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC. Cell-specific expression of epithelial sodium channel  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: Localization by in situ hybridisation and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1994; 127:1907-21.

Efendiev R, Bertorello AM, Pressley TA, Rousselot M, Feraille E, Pedemonte CH. Simultaneous phosphorylation of Ser11 and Ser18 in the alpha-subunit promotes the recruitment of Na(+),K(+)-ATPase molecules to the plasma membrane. *Biochemistry* 2000; 39(32):9884-92.

Elkjaer ML, Birn H, Agre P, Christensen EI, Nielsen S. Effects of microtubule disruption on endocytosis, membrane recycling and polarized distribution of Aquaporin-1 and gp330 in proximal tubule cells. *Eur J Cell Biol* 1995; 67(1):57-72.

Ellison DH. Disorders of sodium balance. In: Schrier. Atlas of diseases of the kidney. Current Medicine Philadelphia 1999; Vol. 2, 2<sup>nd</sup> sect., Chapt 2.

Férraille E, Vogt B, Rousselot M, et al. Mechanism of enhanced Na-K-ATPase activity in cortical collecting duct from rats with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1993; 91(4):1295-1300.

Fernández-Llama P, Andrews P, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA. Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: Altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na transporters. *Kidney Int* 1998; 54:170-9.

Firsov D, Schild L, Gautschi I, Méritat AM, Schneeberger E, Rossier BC. Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:15370-5.

Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Relat Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int* 1991; 40(3):477-88.

Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006. QuaSi-Niere gGmbH Berlin 2006.

Frühaufl JH, Welker P, Salanova M, et al. Trafficking of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) depends on lipid rafts. Zur Publikation eingereicht, 2008.

Füllekrug J, Simons K. Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1014:164-9.

Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Schwerdt G, Silbernagl S. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 2):F668-77.

Haller H, Gross WL: Glomerulonephritis. *Internist* 2003; 44:1073-4.

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* 2007; 282 (1):58-64.

Hartner A, Hilgers KF, Bitzer M, Veelken R, Schocklmann HO: Dynamic expression patterns of transforming growth factor-beta(2) and transforming growth factor-beta receptors in experimental glomerulonephritis. *J Mol Med* 2003; 81(1):32-42.

Hierholzer K, Fromm M. Funktionen der Nieren. In: Schmidt, Lang & Thews (ed.) *Physiologie des Menschen*. Springer Heidelberg; 29<sup>th</sup> ed. 2005: 737-54.

Hill WG, An B, Johnson JP Endogenously expressed epithelial sodium channel is present in lipid rafts in A6 cells. *J Biol Chem* 2002; 277(37):33541-4.

Hughey RP, Carattino MD, Kleyman TR. Role of proteolysis in the activation of epithelial sodium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16:444-50.

Ibrahim HN, Rosenberg ME, Hostetter TH. Proteinurie. In: Seldin (ed.). *The Kidney*. Raven Press New York; 3<sup>rd</sup> ed. 2000: pp. 2269-94.

Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR, et al. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1983; 71:91-103.

Inoue M, Digman MA, Cheng M, et al. Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity. *J Biol Chem* 2004; 279(47):49160-71.

Jefferson JA, Johnson RJ. Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy1.1 model). *J Nephrol* 1999; 12:297-307.

Jentsch TJ, Hubner CA, Fuhrmann JC. Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nat Cell Biol* 2004; 6:1039-47.

Johnson ACM, Yabu JM, Hanson S, Shah VO, Zager RA. Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression. *Am J Pathol* 2003, 162:283-91.

Kamijo Y, Hora K, Kono K, et al. PPARalpha protects proximal tubular cells from acute fatty acid toxicity, *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:3089-100.

Kim EJ, Jung YW, Kwon TH. Angiotensin II AT1 receptor blockade changes expression of renal sodium transporters in rats with chronic renal failure. *J Korean Med Sci* 2005; 20(2):248-55.

Kim SW, de Seigneux S, Sassen MC, et al. Increased apical targeting of renal ENaC subunits and decreased expression of 11 $\beta$ HSD2 in HgCl<sub>2</sub>-induced nephrotic syndrome in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:F674-87.

Kliscic J, Zhang J, Nief V, Reyes L, Moe OW, Ambuhl PM. Albumin regulates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in OKP cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:3008-16.

Kim SW, Wang W, Nielsen J, et al. Increased expression and apical targeting of renal ENaC subunits in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: 922-35.

Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:655-9.

Knotek M, Rogachev B, Ohara M, Schrier RW. Mechanisms of renal retention of sodium and water in heart failure, cirrhosis and pregnancy. *Lijec Vjesn* 2000; 122(1-2):20-6.

Koomans HA, Boer WH, Dorhout Mees EJ. Renal function during recovery from minimal lesions nephrotic syndrome. *Nephron* 1987; 47:173.

Koomans HA, Braam B, Geers AB, Roos JC, Dorhout Mees EJ. The importance of plasma protein for blood volume and blood pressure homeostasis. *Kidney Int* 1986; 30:730-5.

Kriz W, Hähnel B, Hosser H, et al. Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(7):1904-26.

Kriz W, Hartmann I, Hosser H, et al. Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(3):496-506.

Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67(2):404-19.

Kwon TH, Nielsen J, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 Apr; 288(4):F673-84.

Lang F, Klingel K, Wagner CA, et al. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8157-62.

LeHir M, Besse-Eschmann V. A novel mechanism of nephron loss in a murine model of crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2003; 63:591-9.

Leong PK, Devillez A, Sandberg MB, et al. Effects of ACE inhibition on proximal tubule sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(4):F854-63.

- Levi M, Baird BM, Wilson PV. Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport. *J Clin Invest* 1990; 85(1):231-7.
- Levine BS, Ho K, Kraut JA, Coburn JW, Kurokawa K. Effect of metabolic acidosis on phosphate transport by the brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1983; 727:7-12.
- Liang CT, Sacktor B. Preparation of renal cortex basal-lateral and brush border membranes. Localization of adenylate cyclase and guanylate cyclase activities. *Biochim Biophys Acta* 1977; 466(3):474-87.
- Liebler S, Überschär B, Kübert H, et al. The renal retinoid system: time-dependent activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F458-65.
- Lionetto MG, Schettino T. The Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter and the osmotic stress response in a model salt transport epithelium. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187(1-2):115-24.
- Liu FY, Cogan MG. Role of angiotensin II in glomerulotubular balance. *Amer J Physiol* 1990; 259:F72.
- Loffing J, Zecevic M, Féraille E, et al. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F675-82.
- Lötscher M, Scarpetta Y, Levi M, et al. Rapid downregulation of rat renal Na/P(i) cotransporter in response to parathyroid hormone involves microtubule rearrangement. *Clin Invest* 1999; 104(4):483-94.
- Lourdel S, Loffing J, Favre G, et al. Hyperaldosteronemia and activation of the epithelial sodium channel are not required for sodium retention in puromycin-induced nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:3642-50.
- Luft FC. Salz- und Wasserhaushalt für den klinischen Alltag. *Urologe* 1999; 38:493-501.
- Luft FC. Störungen der Wasser- und Natriumbilanz. In: Kuhlmann, Walb & Luft (ed.). *Nephrologie*. Thieme Stuttgart; 4<sup>th</sup> ed. 2003: pp. 176-203.
- Marsh JB. Lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Front Biosci* 2002; 1(7):326-38.

- Masilamani S, Kim GH, Carter M, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999; 104:R19-23.
- Masilamani S, Knepper MA, Burg MB. Urine concentration and dilution. In: Brenner (ed.). *The kidney*. Saunders Philadelphia; 6<sup>th</sup> ed. 2000: 595-638.
- 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* 2004; 287:F593-601.
- Murtazina R, Kovbasnjuk O, Donowitz M, Li X. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid Raft-dependent. *J Biol Chem* 2006; 281(26):17845-55.
- Nakayama H, Oite T, Kawachi H, et al. Comparative nephritogenicity of two monoclonal antibodies that recognize different epitopes of rat Thy-1.1 molecule. *Nephron* 1998; 78:453-63.
- Nangaku M, Pippin J, Couser W. Complement membrane attack complex (C5b-9) mediates interstitial disease in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2323-31.
- Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Tóth G. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 1999; 274:16973-8.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. Water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 1993, 120:371-83.
- Obermüller N, Bernstein P, Valéquez H, et al. Expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol* 1995; 269:F900-10.
- Obermüller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest* 1996; 98:635-40.
- Oliver WJ, Owings CL. Sodium excretion in the nephrotic syndrome: relation to serum albumin concentration, glomerular filtration rate, and aldosterone secretion rate. *Am J Dis Child* 1967; 113:352-62.
- Orth SR, Ritz E. Das nephrotische Syndrom. *Internist* 1998; 39:1246-52.

Osicka TM, Russo LM, Qiu ML, et al. Additive effects of hypertension and diabetes on renal cortical expression of PKC-alpha and -epsilon and alpha-tubulin but not PKC-beta 1 and -beta 2. *J Hypertens* 2003; 21(12):2399-407.

Perico N, Remuzzi G. Edema of the nephrotic syndrome: The role of the atrial peptide system. *Am J Kidney Dis* 1993; 22:355-66.

Peters H, Wang Y, Loof T, Martini S, Kron S, Kramer S, Neumayer HH. Expression and activity of soluble guanylate cyclase in injury and repair of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int* 2004; 66:2224-36.

Pichler H, Riezman H: Where sterols are required for endocytosis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1666:51-61.

Pochynyuk O, Staruschenko A, Bugaj V, Lagrange L, Stockand JD. Quantifying RhoA facilitated trafficking of the epithelial Na<sup>+</sup> channel toward the plasma membrane with total internal reflection fluorescence-fluorescence recovery after photobleaching. *J Biol Chem* 2007; 282(19):14576-85.

Porth CM. Disorders of renal function. In: Porth. *Essentials of Pathophysiology*. Lipincott Williams & Wilkins; 2<sup>nd</sup> ed. 2007: pp. 459-79.

Rodriguez-Iturbe B, Colic D, Parra G, Gutkowska J. Atrial natriuretic factor in the acute nephritic and nephrotic syndromes. *Kidney Int* 1990; 38(3):512-7.

Rose BD, Fletcher SW. Proteinuria: The primary care approach 2007, (Accessed March 6, 2007 at: [http://www.uptodateonline.com/utd/cont...ic.do?topicKey=pc\\_neph/2853.htm](http://www.uptodateonline.com/utd/cont...ic.do?topicKey=pc_neph/2853.htm)).

Rose BD. Regulation of the effective circulating volume. In: McGraw-Hill (ed.). *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. New York; 4th ed. 1994: 247.

Rosenberg ME, Smith LJ, Correa-Rotter R, Hostetter TH. The paradox of the renin-angiotensin system in chronic renal disease. *Kidney Int* 1994; 45(2):403-10.

Sabolic I, Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Brown D. Cd-MT causes endocytosis of brush-border transporters in rat renal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(6):F1389-402.

Schmidt K, Schrader M, Kern HF, Kleene R. Regulated Apical Secretion of Zymogens in Rat Pancreas. *JBC* 2001; 276(17):14315-14323.

Schnermann J, Briggs J. Concentration-dependent sodium chloride transport as the signal in feedback control of glomerular filtration rate. *Kidney Int Suppl* 1982 Aug; 12:S82-9.

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* 1998; 95:9660-4.

Schuck S, Simons K. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 2004; 117:5955-5964.

Shapiro MD, Hasbargen J, Hensen J, Schrier RW. Role of aldosterone in the sodium retention of patients with nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1990; 10:44-48.

Shapiro MD, Nicholls KM, Groves BM, Schrier RW. Role of glomerular filtration rate in the impaired sodium and water excretion of patients with the nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1986; 8(2):81-7.

Shimizu F, Kawachi H, Orikasa M. Role of mesangial cell damage in progressive renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22(1-2):5-12

Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290:1721-6.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1):31-9.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1987; 163(1):279. In: *Instructions of Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit*, Pierce Biotechnology, Rockford, USA, 2002.

Streather CP, Varghese Z, Moorhead JF, Scoble JE. Lipiduria in renal disease. *Am J Hypertens* 1993; 6:S353-5.

Svenningsen P, Jensen BL, Skøtt O. Plasmin stimulates the epithelial sodium channel via interaction with prostasin, *J Am Soc Nephrol (Suppl.)* 2007: 18.

Tsao B, Curthoys NP. Evidence that the hydrophobic domain of rat renal gamma-glutamyltransferase spans the brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1982; 690(2):199-206.

Valentin JP, Qiu C, Muldowney WP, Ying WZ, Gardner DG, Humphreys MH. Cellular basis for blunted volume expansion natriuresis in experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1992; 90:1302-12.

Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 1997; 389:607-10.

Vaziri ND, Liang KH. Down-regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis. *Kidney Int* 1996; 50(3):887-93.

Vogt B, Dick B, Marti HP, Frey FJ, Frey BM. Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in experimental nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(5):753-8.

Walther M, Wiesner R, Kuhn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. *J Biol Chem* 2004; 279(5):3717-25.

Welker P, Geist B, Frühauf JH, et al. Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, thick ascending limb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292(3):R1328-37.

Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45:916-27.

Yeagle PL, Young J, Rice D. Effects of cholesterol on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 1988; 27(17):6449-52.

Yu Z, Schumacher M, Frey BM, Frey FJ, Vogt B. Regulation of epithelial sodium channel in puromycin aminonucleoside-induced unilateral experimental nephrotic syndrome in normal and analbuminemic rats. *Nephron Physiol* 2005; 101:51-62.

## **Erklärung**

„Ich, Juliane Gadau, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Tubulo-epitheliale Einflüsse auf die Volumenretention bei akuter Anti-Thy1-Glomerulonephritis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 08. April 2008

(Juliane Gadau)

## **Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## **Publikationen**

### **Originalarbeiten**

Gadau J, Peters H, Kastner C, Kühn H, Krämer S, Castrop H, Bachmann S, Theilig F. Tubular involvement in volume retention during acute experimental glomerulonephritis. Zur Publikation eingereicht, 2008.

Mühlinghaus I, Scheffer S, Antolic A, Gadau J, Ortwein H. Teamarbeit und Fehlermanagement als Inhalte des Medizinstudiums. GMS Z Med Ausbild. 2007; 24(4):Doc184.

### **Kongressbeiträge**

Gadau J, Theilig F, Krämer S, Peters H, Bachmann S. Beeinflussung des epithelialen Transports durch experimentelle Proteinurie. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2005, Nephro News 2005: 76.

Theilig F, Gadau J, Krämer S, Peters H, Willnow T, Bachmann S. Experimental proteinuria interferes with epithelial transport. JASN 16: 350A, 2005.

Theilig F, Gadau J, Castrop H, Krämer S, Kurtz A, Peters H, Bachmann S. Experimentelle Proteinurie und renal-tubuläre Volumenretention. 29. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie 2005“ Berlin, 2005.

Gadau J, Tariverdian N. HIV-/ AIDS-Prävention durch Problemorientiertes Lernen (POL) an Sekundarschulen in Tansania. Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ), Initiative Zwischen Hörsaal und Projekt, Berlin, 2006.