

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

DISSERTATION

Epitheliale und endotheliale Effekte der Caveolin-1-Deletion in
der Niere

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yan Willièrè

aus Luxemburg (Luxemburg)

Datum der Promotion: 13. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Zusammenfassung	1
1.1. Abstract	2
2. Manteltext	4
2.1. Darstellung des Forschungsstandes	4
2.1.1 Struktur und Funktionen von Caveolen.....	4
2.1.2 Caveolen und ihre Interaktion mit verschiedenen Stoffwechselprozessen.....	5
2.1.3. Caveolen und die Niere.....	5
2.1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	5
2.2. Material und Methoden	6
2.2.1 Material.....	6
2.2.1.1. Versuchstiere.....	6
2.2.1.2 Zellmodelle.....	7
2.2.1.3 Antikörper.....	7
2.2.2 Methoden.....	8
2.2.2.1 Tierversuche.....	8
2.2.2.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten.....	9
2.2.2.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten.....	10
2.2.2.1.3 Epon-Einbettung.....	10
2.2.2.1.4. Präparation der Nierenhomogenate.....	10
2.2.2.1.5 Analyse der Plasma- und Urinparameter.....	10
2.2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	11
2.2.2.2.1 Proteinisolierung aus Zellen und Mäusenieren.....	11
2.2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	11
2.2.2.2.3 Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese (SDS- <i>Page</i>).....	12
2.2.2.2.4 <i>Western Blot</i> und Immundetektion.....	12
2.2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie.....	13
2.2.2.2.6 NADPH-Diaphorase Reaktion.....	14
2.2.2.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie.....	15
2.2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.2.3.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe.....	16
2.2.2.3.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription.....	16
2.2.2.3.3 Analyse der Genexpression mittels quantitativer <i>real-time</i> -PCR (qRT-PCR).....	16
2.2.2.4 Zellbiologische Methoden.....	17
2.2.2.4.1 Überexpression von eNOS in Fibroblasten.....	17
2.2.2.5 Physiologische Methoden.....	18
2.2.2.5.1 Renale vaskuläre Kontraktilität.....	18
2.2.3 Statistische Auswertung.....	19

2.3. Wesentliche neue Ergebnisse.....	19
2.3.1 Die renale Verteilung von Cav1 und Caveolen.....	19
2.3.2 Plasma- und Urinauswertung von Cav1 ^{-/-} Mäusen.....	19
2.3.3 Epitheliale Effekte der Cav1-Deletion	20
2.3.4 Endotheliale Effekte der Cav1-Deletion	20
2.3.5 Zellversuche	21
2.4. Klinische Anwendung und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen.....	22
2.5. Literaturverzeichnis	23
2.6. Anhang	26
2.6.1. Tabellenverzeichnis.....	26
3. Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten	
Publikation	27
4. Auszug aus Journal Summary List (ISIS Web of KnowledgeSM).....	29
5. Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption	32
6. Lebenslauf.....	46
7. Publikationsliste	52
8. Danksagung.....	53

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADH	Vasopressin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP1	Aquaporin 1
AQP2	Aquaporin 2
AQP4	Aquaporin 4
BCA	Bicinchoninsäure
BP	<i>bandpass</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Cav1	Caveolin-1
Cav1 ^{-/-}	Caveolin-1 defizient, Caveolin-1- <i>knockout</i>
Cav2	Caveolin-2
Cav3	Caveolin-3
CD	Sammelrohr, <i>collecting duct</i>
Cd	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGL4	kongenitale generalisierte Lipodystrophie Typ 4, <i>congenital generalized lipodystrophy type 4</i>
CGL4 Fibroblasten	humane PTRF-defiziente Fibroblasten
CGL4 <i>fibroblasts</i>	<i>cultured human fibroblasts lacking caveolae</i>
CNT	Verbindungstubulus, <i>connecting tubule</i>
CRC	Konzentrations-Antwort-Kurve
Cu ²⁺	Kupfer
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
DCT2	spätes distales Konvolut, <i>late distal convoluted tubule</i>
DI-Ratten	Vasopressin-defiziente Brattleboro-Ratten
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
eNaC	epithelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
Fe	fraktionelle Exkretion
FKS	fetales Kalbsserum
fw	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
KHS	Krebs-Henseleit Lösung
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin Methylester
LAGESO	Landesamt für Gesundheit und Soziales
mRNA	Boten-RNA
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NCC	Na ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter, <i>Na⁺-Cl⁻-cotransporter</i>
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter Typ 1
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter Typ 2
NO	Stickstoffmonoxid, <i>nitric oxide</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
pS256-AQP2	an Serin 256 phosphoryliertes Aquaporin 2
pS71-NCC	an Serin 71 phosphorylierter Na ⁺ -Cl ⁻ Kotransporter
pT96/pT101-NKCC2	an Threonin 96 und 101 phosphorylierter Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter Typ 2

PTRF	<i>polymerase I and transcript release factor</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natrium-Nitroprussid
Temed	Tetramethylethylendiamin
U	<i>unit</i>
V2R	Vasopressin V2 Rezeptor
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1. Zusammenfassung

Caveolen, cholesterin- und glycosphingolipidhaltige Einstülpungen der Plasmamembran, sind an wichtigen zellulären Leistungen wie der Endozytose und Signaltransduktion beteiligt. Darüber hinaus haben sie einen Einfluss auf die Regulation des vaskulären Tonus und der vaskulären Reaktivität. Zwei Proteinfamilien, Caveolin und Cavin, sind für deren Ausbildung verantwortlich, wobei Caveolin-1 (Cav1) und Cavin-1 die entscheidenden Strukturproteine von Caveolen sind. Die genetische Inaktivierung von Cav1 beeinträchtigt die Lungenfunktion und beeinflusst das kardiovaskuläre System. Über die Rolle von Cav1 in der Niere ist wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit verfolgt die Hypothese, dass Cav1 eine Rolle beim renalen Wasser- und Elektrolythaushalt spielt. Um der Fragestellung nachzugehen, wurden *Wildtyp*- (WT) Mäuse bezüglich des renalen Vorkommens von Cav1 untersucht und anschließend mit Cav1-defizienten- (Cav1^{-/-}) Mäusen hinsichtlich der renalen physiologischen Eigenschaften, des Profils der renalen Transporter und der renalen vaskulären Kontraktilität verglichen. In WT-Nieren konnte Cav1 im Endothel, im späten distalen Konvolut (DCT2) sowie in den Hauptzellen des Verbindungstubulus (CNT) und des Sammelrohres (CD) nachgewiesen werden, wohingegen in Cav1^{-/-}-Nieren kein Cav1 nachweisbar war. Bei den Cav1^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine gesteigerte Urinausscheidung (+126%, p<0,05) in Kombination mit einer erhöhten fraktionellen Natrium-Ausscheidung (+81%, p<0,05). Biochemische Analysen ausgewählter distaler Transporter und Kanäle zeigten eine um 40% verringerte Anzahl an phosphoryliertem und dementsprechend aktivem Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC) im distalen Konvolut der Cav1^{-/-}- verglichen mit den WT-Mäusen. Alle weiteren untersuchten Kanäle und Transporter wiesen keine Unterschiede zwischen Cav1^{-/-}- und WT-Nieren auf. Die Sensitivität der isolierten, renalen interlobulären Arterien gegenüber Phenylephrin war in den Cav1^{-/-}-Nieren auf circa ein Viertel reduziert (p<0,05). Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Verringerung der maximalen Kontraktilität der renalen Arterien in Cav1^{-/-}-Mäusen (-13%, p<0,05) hinweisend auf eine erhöhte Verfügbarkeit

an Stickstoffmonoxid (NO). Erklärbar ist die womöglich erhöhte Verfügbarkeit an NO durch eine gesteigerte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) in Cav1^{-/-}-Nieren (+213%, p<0,05). Als möglicher kompensatorischer Ausgleich für die stimulierte NO-Komponente zeigte sich in Cav1^{-/-}-Nieren eine Zunahme der Expression an alpha-adrenergen Rezeptoren (+63%, p<0,05). Zellversuche an humanen Fibroblasten mit gestörter Caveolen-Ausbildung aufgrund einer Cavin-Mutation zeigten ebenfalls eine intrazelluläre Anreicherung an eNOS mit erhöhter NOS-Enzymaktivität, dargestellt durch die NADPH-Diaphorase Reaktion, gegenüber Kontroll-Fibroblasten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Caveolen über den Einfluss auf die NCC- und eNOS-Aktivität die renale Resorption von Elektrolyten und Wasser beeinflussen könnten. Studien mit weiteren Charakterisierungen der funktionellen Effekte von Cav1 auf die renalen Transporter und Kanäle können möglicherweise weitere Einblicke gewähren und zukünftige klinische Einsatzgebiete bei Störungen des renalen Wasser- und Elektrolythaushaltes eröffnen.

1.1. Abstract

Caveolae, cholesterol- and glycosphingolipid-rich invaginations of the plasma membrane are involved in multiple cell functions such as endo- and transcytosis as well as signal transduction. Members of the caveolin and cavin protein families are essential for caveolae biogenesis. Caveolin-1 (Cav1) and Cavin-1 are indispensable structural components of caveolae. Little is known about their role in the kidney. In this study we tested the hypothesis that caveolae interfere with renal salt and water reabsorption. For evaluation Wild-type (WT) and Cav1-deficient (Cav1^{-/-}) mice were studied for their kidney morphology, physiologic kidney performance, profile of renal transporters and channels, as well as for their renal vascular contractility. Renal epithelial expression of Cav1 was limited to the late distal convoluted tubule (DCT2) and principal connecting tubule (CNT) and collecting duct (CD) principal cells in WT

mice. Furthermore Cav1 and caveolae were present in vascular cells. Evaluation of urinary volume and electrolyte excretion showed an increase in urine flow (+126%, $p < 0.05$) as well as an increased fractional sodium excretion by 81% ($p < 0.05$). Under water deprivation for 18h no significant differences could be observed. By analysing key distal epithelial transporters and channels under normal conditions a decrease in phosphorylated and thereby activated Na^+ - Cl^- -cotransporter (NCC) by 40% was shown in the distal convoluted tubule of Cav1^{-/-} mice. All other investigated transporters and channels revealed no significant differences by comparing both mouse strains. Caveolae have been shown to regulate vascular tone and reactivity to physiologic stimuli. The sensitivity of isolated, renal interlobular arteries to phenylephrine was therefore studied in both strains. Compared to WT mice, sensitivity in Cav1^{-/-} was reduced to 25% ($p < 0.05$). The maximal contractile response was significantly decreased in Cav1^{-/-} renal arteries (-13%, $p < 0.05$) along with increased abundance (+213%, $p < 0.05$) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Renal expression of alpha-adrenergic receptors was enhanced (+63%, $p < 0.05$), possibly compensating for enhanced vascular nitric oxide (NO) availability. Cultured human fibroblasts lacking caveolae (CGL4 fibroblasts) showed intracellular accumulation of eNOS compared to WT fibroblasts which revealed its concentration at the plasma membrane. Histochemical NADPH diaphorase reaction, reflecting NOS activity, correspondingly displayed enhanced intracellular signal in CGL4 fibroblasts. Our results suggest that renal caveolae promote renal water and salt reabsorption by modulating NCC-mediated Na^+ - Cl^- reabsorption and eNOS activity.

2. Manteltext

2.1. Darstellung des Forschungsstandes

2.1.1 Struktur und Funktionen von Caveolen

Caveolen wurden in den 1950er-Jahren zum ersten Mal mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beschrieben [1, 2]. Diese Strukturen stellen cholesterin- und glycosphingolipidhaltige Einstülpungen der Plasmamembran dar und besitzen im Mittel einen Durchmesser von 60 bis 80 nm [3]. Caveolen lassen sich zumeist an Endothelzellen und glatten Muskelzellen wiederfinden. Darüber hinaus besitzen auch einige Epithelzellen Caveolen [4, 5]. Caveolen sind an der Endozytose, Transzytose und an diversen anderen Signaltransduktionen in der Zelle beteiligt [6-8]. Für die Bildung von Caveolen ist die Expression von Caveolin, eine Proteinfamilie mit 3 Vertretern [Caveolin-1 (Cav1), Caveolin-2 (Cav2) und Caveolin-3 (Cav3)] [3, 9] notwendig, wobei Cav1 für die Ausbildung der Caveolen unerlässlich ist.

Cav1-Knockout ($Cav1^{-/-}$)-Mäuse besitzen keine Caveolen [10-14]. Der Phänotyp von $Cav1^{-/-}$ -Mäusen ist sehr komplex: Die Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar, zeigen allerdings eine verkürzte Lebensdauer auf. Des Weiteren zeigt sich ein Einfluss der Caveolindefizienz auf verschiedene Organsysteme: unter anderem konnte für die Lunge eine vermehrte Fibrose wie auch eine vermehrte endotheliale Zellproliferation nachgewiesen werden [15]. Bei Patienten, welche an einer Lipodystrophie, Dyslipidämie oder einer Insulin-Resistenz erkrankt sind, konnte ein Zusammenhang mit einer homozygoten Nonsense-Mutation des Cav1 Gens aufgezeigt werden [15]. Ferner zeigte sich ein Einfluss bei verschiedenen Karzinomen (u.a. Brustkrebs und Metastasierung bei Adenokarzinomen der Lunge und des Pankreas) [16]. Eine Deletion von Cav2 in Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung von Caveolen [10-14]. Im Muskelgewebe ist Cav3 entscheidend für die Caveolen-Entstehung. Cav3-Mutationen sowie der Verlust von Cav3 führten zu Dystrophien [17-19].

Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren eine weitere Proteinfamilie identifiziert, welche an der Biogenese der Caveolen beteiligt ist. Deren Vertreter werden mit Cavin-1 bis -4 bezeichnet [20]. *Polymerase I and transcript release factor* (PTRF), auch Cavin-1 genannt, ist ein entscheidender Faktor für die Bildung der Caveolen. Bei *PTRF-Knockout*-Mäusen kam es zu einem kompletten Verlust der Caveolen sowie zu einer Verminderung der Protein-Expression von Cav1-3, obwohl keine Veränderungen auf der Caveolin-mRNA-Ebene zu beobachten waren [21]. Unterschiedliche Mutationen, u.a. eine homozygote Deletionsmutation und eine

Insertionsmutation von humanem PTRF [22] stehen im Zusammenhang mit der kongenitalen generalisierten Lipodystrophie Typ 4 (CGL4).

2.1.2 Caveolen und ihre Interaktion mit verschiedenen Stoffwechselprozessen

Caveolen sind an bedeutenden Stoffwechselprozessen beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) über die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase, NOS) und die Calcium-Signalvermittlung [15]. Darüber hinaus wurde eine Interaktion von Cav1 mit einer Anzahl von Signalproteinen wie dem Insulin-Rezeptor, H-Ras und Tyrosinkinase Src beschrieben [23].

Obwohl sich Caveolen in fast allen Organen von Säugetieren wiederfinden lassen, konzentrierte sich ein Großteil der Untersuchungen bisher auf Funktionen der respiratorischen und kardiovaskulären Organe [24]. So wurde zum Beispiel die Pathogenese des Asthma bronchiale und der pulmonalen Hypertension in Verbindung mit Caveolen gebracht [25]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Caveolen einen Einfluss auf die Regulierung des vaskulären Tonus, des Herzrhythmus, der Atemfunktion sowie des Lipidstoffwechsels haben [10, 22, 26].

2.1.3. Caveolen und die Niere

Über die Funktion der Caveolen in der Niere ist aktuell wenig bekannt. Vorangegangene Veröffentlichungen erbrachten den Nachweis von Caveolen und Cav1 in renalen Gefäßen sowie im renalen distalen Epithelgewebe [27]. Darüber hinaus erfolgte auch bereits eine Phenotypisierung von Cav1-defizienten Mäusen. Es zeigte sich ein moderater Verlust an Calcium, Magnesium und Kalium über den Urin. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse entstand der Eindruck, dass Caveolen an der renalen Regulation dieser Elektrolyte beteiligt sind [28, 29]. Man geht davon aus, dass der beobachtete Effekt des Elektrolytverlustes auf der Interaktion zwischen Cav1 und den basolateralen Calcium- und Kalium-Transporterproteinen beruht [28, 29]. Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung an Vasopressin-defizienten Brattleboro-Ratten (DI-Ratten) mit einem zentralen Diabetes insipidus [30]. Hier wurde ein Einfluss von Cav1 auf den Harnkonzentrierungsprozess postuliert. Bei der Stimulation der DI-Ratten mit dem Vasopressin V2 Rezeptoragonisten Desmopressin zeigte sich eine eingeleitete apikale Translokation von Cav1 in den Hauptzellen des Sammelrohres. Der Bezug zwischen Caveolen und der renalen Reabsorption von Wasser und Salzen ist allerdings aktuell noch nicht geklärt.

2.1.4 Zielsetzung der Arbeit

Als Grundlage der Untersuchungen dienten Cav1^{-/-}- und *Wildtyp*- (WT) Mäuse. Primär sollte die

renale Verteilung von Caveolen bzw. von Cav1 sowie deren Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt untersucht werden. Dabei sollten sowohl epitheliale wie auch endotheliale Einflüsse von Cav1 untersucht werden. Bei einem vermuteten Einfluss von Caveolen/Cav1 auf die renale Regulation der Elektrolyte [28-30] sollten die Harnkonzentrierungseigenschaften der beiden Mauslinien verglichen werden, sowohl bei Normalbedingungen wie auch bei einem Durstversuch. Zur Abklärung der hieraus gewonnenen Ergebnisse sollten die Mäuse hinsichtlich der Biosynthese der renalen Transporter charakterisiert werden. Bei einem bekannten Einfluss der Caveolen auf die Regulation des vaskulären Tonus und der vaskulären Reaktivität [10, 26] sollten die beiden Mauslinien bezüglich der durch Caveolen bzw. Cav1 regulierten renal vaskulären Antwort untersucht werden. Humane PTRF-defiziente Fibroblasten (CGL4-Fibroblasten) sowie humane Kontrollfibroblasten sollten zur Untersuchung zellulärer Mechanismen im Hinblick auf die Interaktion zwischen den Caveolen bzw. Cav1 und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) dienen. Laut der aufgestellten Hypothese könnten Caveolen und Cav1 sowohl die epithelialen als auch die vaskulären Komponenten des Harnkonzentrierungsmechanismus modulieren.

2.2. Material und Methoden

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den entsprechenden Leitlinien und Vorschriften durchgeführt. Hierzu zählen unter anderem die Standards der Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und die Richtlinien des *National Institute of Health*. Zudem wurde die Erlaubnis zur Durchführung der Tierversuche bei der lokalen Behörde eingeholt.

2.2.1 Material

2.2.1.1. Versuchstiere

Die durchgeführten Experimente an den Mäusen erfolgten auf der Grundlage der Erlaubnis durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGESO, Tierversuchsantragsnummer G0220/12). Die Mäuse wurden am Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik (Dresden) gezüchtet und uns freundlicherweise von Herrn Dr. Wunderlich zur Verfügung gestellt. Die Generierung der Cav1^{-/-}-Mäuse wurde bereits vorab publiziert [10]. Standardfutter und Leitungswasser stand den Mäusen zur freien Verfügung im Rahmen eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Mäuse waren in geschlossenen, klimatisierten Räumen bei 22 bis 24 °C untergebracht.

2.2.1.2 Zellmodelle

Die Untersuchungen erfolgten an humanen Kontrollfibroblasten und CGL4-Fibroblasten (aus Patient FI:201, [22]), die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld überlassen wurden. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Inkubator (Binder C150, BINDER GmbH, Tuttlingen) bei 37 °C mit 5% CO₂. Als Kulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach) mit dem Zusatz von 15% fetalem Kalbsserum (FKS, PAN-Biotech GmbH) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech GmbH) verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage.

2.2.1.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot und Immunhistochemie/Immunfluoreszenz sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Die Antikörper waren bezüglich ihrer Spezifität validiert und gut charakterisiert. Die Antikörper gegen an Serin 256 phosphoryliertem Aquaporin 2 (pS256-AQP2), den Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC), an Serin 71 phosphoryliertem NCC (pS71-NCC), den Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter Typ 2 (NKCC2), an Threonin 96 und 101 phosphoryliertem NKCC2 (pT96/pT101-NKCC2) und Vasopressin V2 Rezeptor (V2R) wurden in vorangegangenen Studien [31-35] charakterisiert.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Isotyp (IgG)	Hersteller Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Konzentration WB	IF
AQP1	Kaninchen	Alpha diagnostic international	AQP11	1:250	
AQP2	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-9882	1:1000	1:500
AQP4	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-9888	1:500	
Phospho-AQP2 (S256) [31]	Kaninchen	Radboud University Nijmegen Medical Centre		1:200	
β-Actin	Maus	Sigma-Aldrich	A5441	1:5000	
eNaCa	Kaninchen	Biotrend	ENACb11-A	1:100	
eNOS	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-654	1:500	1:200
Cav1	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-894	1:200	1:100
Cd31	Maus	DAKO	M0823		1:100
Na ⁺ /K ⁺ ATPase (α)	Kaninchen	Millipore	05-369	1:300	
NCC [32]	Kaninchen	Oregon		1:500	1:500

		Health&Science University			
Phospho-NCC (S71) [33]	Kaninchen	laboreigene Herstellung		1:100	
NKCC1/2	Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank	T4	1:500	
NKCC2 [34]	Meerschweinchen	laboreigene Herstellung		1:300	1:2000
Phospho-NKCC2 (T96/T101) [34]	Kaninchen	laboreigene Herstellung		1:1000	
Vasopressin V2 Rezeptor [35]	Kaninchen	laboreigene Herstellung		1:500	

WB: *Western Blot*, **IF:** Immunofluoreszenz

AQP: Aquaporin, **eNaC:** epithelialer Natriumkanal, **Cd:** *Cluster of differentiation*

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Konzentration	
			WB	IF
<i>polyclonal rabbit anti goat IgG/HRP</i>	DAKO	P0449	1:2000	
<i>polyclonal rabbit anti guinea pig IgG/HRP</i>	DAKO	P0141	1:2000	
<i>polyclonal goat anti mouse IgG/HRP</i>	DAKO	P0447	1:2000	
<i>polyclonal swine anti rabbit IgG/HRP</i>	DAKO	P0399	1:2000	
<i>CyTM2 donkey anti rabbit IgG</i>	Jackson Immuno Research Laboratories	711-225-152		1:300
<i>CyTM3 donkey anti goat IgG</i>	Jackson Immuno Research Laboratories	705-154-147		1:300
<i>CyTM3 donkey anti mouse IgG</i>	Jackson Immuno Research Laboratories	715-165-150		1:300
<i>CyTM3 donkey anti guinea pig IgG</i>	Jackson Immuno Research Laboratories	706-165-148		1:300
<i>CyTM3 donkey anti rabbit IgG</i>	Jackson Immuno Research Laboratories	711-165-152		1:300

WB: *Western Blot*, **IF:** Immunofluoreszenz, **IgG:** Immunglobulin G, **HRP:** Meerrettichperoxidase, **Cy:** Cyanin

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Tierversuche

Nach einer Akklimatisierungszeit im Tierstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (Berlin) erfolgte zur Durchführung der Untersuchung der renalen physiologischen

Eigenschaften die individuelle Unterbringung der 10 bis 14 Wochen alten Tiere in metabolischen Käfigen für 24 Stunden. Der Urin der 12 Tiere (WT n=6; Cav1^{-/-} n=6) wurde über die 24 Stunden aufgefangen. Am Ende des Versuchs wurde eine Anästhesie der Mäuse mittels Isofluran eingeleitet. Nach anschließender zervikaler Dislokation wurde den Mäusen Blut entnommen und die Nieren asserviert.

Eine zweite Kohorte an Tieren, 5 WT- und 6 Cav1^{-/-}-Mäuse, wurde einem Durstversuch über 18 Stunden zum Sammeln von Urin mit freiem Zugang zu Standardfutter in metabolischen Käfigen unterzogen.

Eine dritte Kohorte von 34 Mäusen (WT n=18; Cav1^{-/-} n=16) im Alter zwischen 16 und 20 Wochen wurde bezüglich der Regulation des renalen vaskulären Tonus und der Reaktivität auf vasoaktive Substanzen untersucht. Die Tiere wurden mittels Isofluran betäubt und dekapitiert. Anschließend wurden die Nieren gewonnen, welche in einer eisgekühlten Krebs-Henseleit Lösung (KHS; 118,6 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25,1 mM NaHCO₃, 11,1 mM Glukose und 0,02 mM EDTA) für die Zeit der Präparation gehalten wurden. Die Präparation der Arterien erfolgte in einer Präparationslösung mit geringem Calciumgehalt, um die Gefäße zu schonen. Pro Tier konnten bis zu 4 renale Interlobulararterien gewonnen werden.

Eine vierte Kohorte wurde für die Analyse der renalen Morphologie eingesetzt. 4 WT- und 4 Cav1^{-/-}-Mäuse erhielten eine Anästhesie mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (100 mg/kg Körpergewicht) und wurden anschließend perfusionsfixiert [36]. Durch retrograde Perfusion mit 3%igem Paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline* (PBS); für 10xPBS: 400 g NaCl, 12 g KH₂PO₄, 89 g Na₂HPO₄, 10 g KCl auf 5 l H₂O) über die Aorta abdominalis konnte das Kollabieren der Nierentubuli verhindert und somit die natürliche Morphologie der Niere erhalten bleiben. Nach der Nierenentnahme wurden diese weiter aufgearbeitet. Hierbei kamen 3 verschiedene Methoden zum Einsatz: die Kryokonservierung, die Paraffin-Einbettung und die Einbettung mit LR-White Harz. Die Perfusionsfixierungen wurden von Herrn Prof. Dr. Bachmann durchgeführt.

Alle verwendeten Mäuse waren männlich.

2.2.2.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Vermeidung von Gefrierartefakten wurden perfusionsfixierte Nieren über Nacht bei 4 °C in Sucrosepuffer (pH 7,3-7,4; 800 mosmol Sucrose/PBS) eingelegt. Es erfolgte die anschließende

Schockfrostung in stickstoffgekühltem 2-Methyl-Butan und die Lagerung bei -80 °C. Mit Hilfe eines Kryostaten (Gefriermikrotom Leica CM3050S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) wurden 5 bis 7 µm dünne Gefrierschnitte des Kryogewebes angefertigt. Diese wurden auf beschichtete Objektträger aufgebracht und nach einer Lufttrocknung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Über Nacht erfolgte eine Nachfixierung der perfusionsfixierten Nieren bei 4 °C in der Perfusionslösung. Vor der Einbettung wurde das Gewebe in 330 mosmol Sucrose/PBS mit 0,02% Natriumazid gelagert. Am Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Standort Campus Mitte erfolgte die automatisierte Paraffineinbettung. Gelagert wurde das Paraffingewebe anschließend bei Raumtemperatur (RT) oder 20 °C. Bevor die Anfertigung der Paraffinschnitte eingeleitet werden konnte, wurde das eingebettete Gewebe für mindestens 2 Stunden bei -20 °C gekühlt, um dies im Anschluss besser schneiden zu können. Im Verlauf wurden 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica RM 2125RT, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) angefertigt. In einem 37 bis 40 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte gestreckt und auf einen Objektträger aufgezogen.

2.2.2.1.3 Epon-Einbettung

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der renalen Morphologie wurde eine weitere Fixierung der perfusionsfixierten Nierengewebe in 0,5% Glutaraldehyd/PBS über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die weitere Einbettung nach Herstellerangabe mit dem *Epoxy Embedding Medium kit* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) durchgeführt. Ultradünnschnitte von Nierengewebe wurden mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (Zeiss EM 905, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena und FEI Tecnai™ G2, FEI Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) untersucht.

2.2.2.1.4. Präparation der Nierenhomogenate

Unfixiert entnommene Nieren wurden in Stücke geschnitten und im Anschluss schockgefroren. Zur weiteren Aufbereitung wurden die schockgefrorenen Nierenstücke mit Hilfe eines Pistills und einem Mörser in flüssigem Stickstoff fein gemahlen.

2.2.2.1.5 Analyse der Plasma- und Urinparameter

Die Untersuchung der Plasma- und Urinparameter erfolgte nach automatisierter photometrischer Methodik (Cobas 8000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die fraktionelle Exkretion (Fe)

(z.B. $Fe_{\text{Natrium}} = 100 \times \frac{(\text{Natrium}_{\text{Urin}} \times \text{Kreatinin}_{\text{Plasma}})}{(\text{Natrium}_{\text{Plasma}} \times \text{Kreatinin}_{\text{Urin}})}$), das Urinvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht, die Elektrolytausscheidung bezogen auf das Körpergewicht pro 24 Stunden, das Kreatinin im Verhältnis zum Körpergewicht, die Elektrolyte im Verhältnis zum Kreatinin wie auch das Natrium im Verhältnis zum Kalium wurden berechnet.

2.2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.2.1 Proteinisolierung aus Zellen und Mäusenieren

Zur Gewinnung von Proteinen für den *Western Blot* wurden die Zellen auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Jeder Petrischale wurde 1 ml Sucrosepuffer [250 mM Sucrose, 10 mM Trietholamin und Proteaseinhibitor (1 Tablette auf 50 ml; cOmplete™, Roche, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)] zugeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die überführten Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 g pelliert, der Überstand abpipettiert und zum Zellpellet 100 µl Sucrosepuffer gegeben. Das Pellet-Sucrosepuffer-Gemisch wurde 4 Mal für 70 Millisekunden mit Ultraschall lysiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 800 g für 10 Minuten, um die Kerne und die restlichen, nicht lysierten Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser konnte im Anschluss direkt weiterverwendet werden oder zur Lagerung bei -20 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden.

Zur Proteingewinnung wurden die Mäusenierenhomogenate in Sucrosepuffer aufgetaut. Anschließend erfolgte zum Erwerb eines Lysats eine Ultraschall-Behandlung (3 mal 3 Impulse). Zur Entfernung der Zellkerne und der nicht lysierten Gewebereste wurde eine 10-minütige Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C durchgeführt. Der gewonnene Überstand entsprach dem Proteinlysatsat und konnte entweder direkt weiterverarbeitet werden oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die absolute Proteinkonzentration wurde gemäß der Bicinchoninsäure- (BCA) Methode mit einem *Pierce™ BCA Protein assay kit* (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) bestimmt. Bei dieser Methode bilden Proteine und Kupfer (Cu^{2+}) in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Cu^{2+} wird zu Cu^+ reduziert und bildet mit BCA einen violetten Farbkomplex [37]. Die Farbintensität wird bei 562 nm mit einem Photometer bestimmt. Anhand einer mitgeführten

Standardreihe kann die Proteinkonzentration der Zelllysate berechnet werden, um einheitliche Ausgangskonzentrationen herzustellen.

2.2.2.2.3 Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen und ermöglicht die Aufteilung nach den Molekulargewichten. Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine und löst Protein-Protein-Wechselwirkungen auf. SDS und Protein bilden einen negativ geladenen Komplex, der zum Plus-Pol (Anode) wandert. Im Polyacrylamid-Gel trennen sich die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf [37]. Für unsere Untersuchungen wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die Proteinproben wurden mit Sucrosepuffer auf eine Konzentration von 50 µg eingestellt und unter Zusatz von 4-fach konzentriertem Laemmli Probenpuffer (252 mM Tris/HCl, 40% Glycerol, 8% SDS, 0,04% Bromphenolblau, 20% β-Mercaptoethanol; pH 6,8) für 15 Minuten bei 65 °C erwärmt. Das Erwärmen der Proben ermöglicht die vollständige Auflösung der Sekundärstrukturen und die Inaktivierung von Proteasen [37]. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 2 bis 3 Stunden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des 10%igen Polyacrylamidgels (für insgesamt 4 Gele)

Trenngel		Sammelgel	
Acrylamid	7 ml	Acrylamid	1 ml
Gelpuffer	7 ml	Gelpuffer	2 ml
Aqua dest.	4 ml	Aqua dest.	5 ml
Glycerol	2,5 ml	Bromphenolblau	20 µl
APS	200 µl	APS	100 µl
Temed	10 µl	Temed	10 µl

APS: Ammoniumperoxodisulfat, **Temed:** Tetramethylethylendiamin

2.2.2.2.4 Western Blot und Immundetektion

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine des SDS-Gels auf eine Nitrozellulosemembran im *Semi-dry*-Verfahren bei 90 mA pro Gel für 1 Stunde und 30 Minuten geblottet. Die Überprüfung der erfolgreichen Proteinübertragung auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit 0,1%iger Ponceaurot-Färbung, welche die Proteine reversibel färbt. Anschließend wurden die Membranen für 20 Minuten in 5%iger entfetteter Milch (*skim milk*) in PBS bzw. in 5%igem bovinen Serumalbumin (BSA) in PBS geblockt. Über Nacht bei 4 °C oder für eine

Stunde bei RT wurden die Membranen mit dem Primärantikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnung für die verschiedenen *Western Blots* sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach mindestens 20-minütigem Waschen in PBS-Tween und in PBS wurden die Membranen für etwa 2 Stunden bei RT mit einem mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (DAKO, Hamburg) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang in PBS-Tween und PBS, ehe die Membranen mit 1 ml ECL-Lösung (Amersham, GE Healthcare, München) für 1 Minute inkubiert wurden. Anschließend erfolgte in der Dunkelkammer die Exposition der Membran mit einem Röntgenfilm (*Fujifilm Medical X-Ray Film 100NIF*, FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf). Im Anschluss konnte der Röntgenfilm entwickelt werden (Agfa Curix 60, Agfa HealthCare GmbH, Bonn). Bei allen *Western Blots* wurde β -Aktin als Referenzprotein mitgeführt und zur Normalisierung der Daten verwendet.

Die belichteten Röntgenfilme wurden unter Verwendung der Software *Analyzer* von Applied Biosystems (Darmstadt) densitometrisch ausgewertet.

2.2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte wurden mittels Xylol für immunhistochemische Analysen entparafiniert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte über eine absteigende Ethanolreihe (100% bis 70%) und zur Erhöhung der Antigenverfügbarkeit wurden die Schnitte im Anschluss für 6 Minuten in Citratpuffer (0,02 M Citronensäure-Monohydrat; 0,08 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat; pH 6) gekocht.

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden mit 3%igem PFA für 10 Minuten bei 4 °C fixiert und anschließend 3 Mal mit einfach konzentriertem PBS gewaschen. Anschließend wurden diese ebenso wie Kryostatschnitte für 30 Minuten in 0,5% Triton X-100/PBS inkubiert. Über diesen Schritt konnte die Antigenverfügbarkeit erhöht werden.

Der weitere Ablauf war für alle Gewebe und Zellen identisch. Es erfolgte eine 30-minütige Blockierung mit 5%iger *skim milk* in PBS zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen. Die anschließende Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, gelöst in 5%iger *skim milk* in PBS, erfolgte bei RT über 1 Stunde, gefolgt von einer Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst eine einstündige Akklimatisation bei RT mit anschließendem PBS-Waschvorgang. Es folgte eine Behandlung mit dem Spezies-spezifischen Cyanin2- (Cy2-) oder Cyanin3- (Cy3-) gekoppeltem Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova, Hamburg) in PBS für 1 Stunde. Neben den Cyanin-gekoppelten

Antikörper wurden auch HRP-konjugierte Sekundärantikörper (DAKO) verwendet. Zur Anfärbung der Zellkerne erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI, D9542, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurden die Gewebeschnitte mit Glycerin eingedeckelt bzw. die Deckgläschen mit *Fluoromount-G* (SouthernBiotech, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) auf Objektträger aufgebracht. Zum Nachweis der Ko-Lokalisation von Cav1 und NCC im DCT2 wurden die beiden Proteine an konsekutiven Schnitten markiert und korrelativ ausgewertet. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanningmikroskop (siehe 2.2.2.5.1). Die verwendeten Antikörper und ihre jeweilige Verdünnung sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

2.2.2.2.5.1 Konfokales-Laser-Scanningmikroskop

Unter Anwendung eines konfokalen Laser-Scanningmikroskops (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss Microscopy GmbH) mit Multilasersystem (Dioden-Laser, 405 nm; Ar-Laser, 488 nm; HeNe-Laser, 543 nm und HeNe-Laser, 633 nm) konnte die Detektion der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgen. Die Betrachtung der Präparate erfolgte durch ein 40x und 63x EC Plan NEOFLUAR-Ölobjektiv. Die Filter für die Extinktion-/Emission-Wellenlängen wurden wie folgt eingestellt: 488 nm/ *bandpass* (BP) 505-550 nm für Cy2, 543 nm/BP 560-615 nm für Cy3 und 405 nm/BP 420-480 nm für DAPI. Dabei wurden von allen Färbungen repräsentative Zellen und Gewebeabschnitte fotografiert, unter Beibehaltung gleicher Einstellungen.

Zur Auswertung der eNOS-Signalintensität in den renalen Gefäßen von WT- und Cav1^{-/-}-Mäusen (n=3 für jede Gruppe; mindestens 10 Gefäßporträts pro Maus) wurde die Software *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) verwendet. Das aufgenommene Hintergrundsignal über den Zellkernen diente als Schwelleneinstellung und wurde für die jeweiligen Signalstufen abgezogen.

2.2.2.2.6 NADPH-Diaphorase Reaktion

Um Hinweise über die unterschiedliche Aktivität der NO-Synthasen zu erhalten, wurde die NADPH-Diaphorase Reaktion zum Einsatz. Es erfolgte die Anwendung der Reaktion wie in [38] beschrieben. Kontroll- und CGL4-Fibroblasten wurden mit einer 3%igen PFA-Lösung fixiert und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Nach der Behandlung mit dem Detergens (0,5% Triton X-100) und weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte eine Äquilibrierung in 0,1 M Phosphatpuffer (23 ml 0,5 M NaH₂PO₄ und 77 ml 0,5 M Na₂HPO₄ in 400 ml H₂O). Anschließend wurden die Zellen mit der Entwicklungslösung (0,5 mg Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 5 mg NADPH, 15 µl Triton X-100 in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer) bedeckt

und bei 37 °C inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug 25 Minuten für ein optimiertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Nach weiteren Waschvorgängen in Phosphatpuffer und PBS konnte die Auswertung mittels eines mit einer SPOT 32 Kamera ausgestatteten Leica DMRB Mikroskops (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) sowie der Software *MetaView 3.6a* (Diagnostic Instruments; Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA) durchgeführt werden.

2.2.2.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.2.2.7.1 Präparation von Plasmamembran-Sheets und Immunogoldmarkierung

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Plasmamembran und deren Strukturen wird durch die Anwendung der RipFlip-Methode ermöglicht [39]. Hierzu wurden konfluente Kontroll- und CGL4-Fibroblasten auf Deckgläschen für 15 Minuten in 0,5% PFA/PBS bei RT vorfixiert. Gleichzeitig erfolgte die Vorbereitung der Netzträger (Grids , *square mesh grids* G2300N, Agar-Scientific, Stansted, UK): Für 30 Minuten wurden diese in 0,8 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung inkubiert, um die spätere Haftung auf den Zellen zu ermöglichen. Die Grids wurden anschließend mit Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet.

Es erfolgten mehrere Waschvorgänge mit PBS. *Coverslips* wurden mit der bewaschenen Seite auf die Grids platziert. Bei RT erfolgte die Inkubation für 15 Minuten. Anschließend wurden die *Coverslips* mit einer Pinzette auf die Grids gedrückt, gefolgt vom Abreißen der *Coverslips*. Durch diese Anwendung konnte ein Teil der apikalen Plasmamembran an den Grids haften bleiben und die Zellen wurden aufgerissen, so dass die Innenseite der Plasmamembran für weitere Untersuchungen zugänglich war. Eine Nachfixierung wurde für 20 Minuten mit 2% PFA/HEPES (HEPES-Puffer: 25 mM HEPES, 25 mM KCl, 2,5 mM Magnesiumacetat, pH 7,2) bei RT durchgeführt.

Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen eine Inkubation in 0,1% BSA/PBS für 10 Minuten, gefolgt von einem erneuten Waschen in PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Cav1, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Verdünnung 1:50) erfolgte bei RT für 60 Minuten. Die 10 nm Gold-konjugierten Sekundärantikörper (Abcam, Berlin) wurden anschließend für 60 Minuten bei RT inkubiert, ehe eine Fixierung mit 2% Glutaraldehyd/PBS für 20 Minuten erfolgte. Im Anschluss wurden die Grids für die selektive Kontrastierung für 1 Minute mit 1% Tanninsäure in Aqua dest. und für 10 Minuten mit 1% Uranylacetat in Aqua dest. behandelt. Alle Schritte wurden nacheinander durchgeführt, getrennt durch jeweils 3 Waschvorgänge mit Aqua dest.. Zum Abschluss wurden

die Grids getrocknet und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Zeiss EM 905) ausgewertet.

2.2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.3.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe

Das gemörserte Nierengewebe wurde mit 0,5 ml *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH) versetzt. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte entsprechend der Herstellerangaben von Invitrogen (Darmstadt) nach der Trizol/Isopropanol-Methode. Die Bestimmung der Konzentration der RNA wurde mit einem Nanophotometer (Implen GmbH, München) bei 260 nm durchgeführt.

2.2.2.3.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Mittels einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, erfolgte die Umschreibung der RNA in eine stabilere cDNA. Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg isolierte Gesamt-RNA mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₈ Primer (*Random Hexamer Primer*, Bioline GmbH, Luckenwalde) versetzt und dann mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die 10-minütige Inkubation bei 70 °C bewirkt die Denaturierung der RNA und die gleichzeitige Hybridisierung der Oligo(dT)₁₈ Primer am 3`-Ende der mRNA. Die Zugabe von 10 mM dNTPs (Bioline GmbH), 10 *units* (U) *RiboLock RNase Inhibitor* (Fisher Scientific GmbH), 50 U BioScript Polymerase (Bioline GmbH) und der dazugehörigen BioScript-Pufferlösung (4 µl, Bioline GmbH) erhöht das Gesamtvolumen der Ansätze auf 20 µl. Bei einer Inkubation der Proben über 2 Stunden bei 37 °C erfolgte die Synthese der cDNA. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte über eine Inaktivierung der reversen Transkriptase durch ein 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C. Gelagert wurde die synthetisierte cDNA bei -20 °C.

2.2.2.3.3 Analyse der Genexpression mittels quantitativer *real-time*-PCR (qRT-PCR)

Die Erfassung der Amplifikation einer Zielsequenz in Echtzeit wird mit dem Verfahren der quantitativen *real-time*-PCR ermöglicht. Der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Solis BioDyne, Tartu, Estland) interkaliert hierbei in die doppelsträngige DNA während der Elongation der PCR. Mit zunehmender Zyklenzahl steigt aufgrund der Proportionalität nicht nur die Anzahl synthetisierter Amplifikate, sondern in gleichem Maße auch die Fluoreszenz. Der 20 µl Ansatz beinhaltete 10 µl 1:10 verdünnter cDNA, 2 µl 5xHOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne), 2 µl des Primers (Tabelle 4) sowie 6 µl nukleasefreies Wasser. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, welche anstelle des Templates nukleasefreies Wasser

enthielt. Alle Proben wurden dreifach bestimmt. Die während der qPCR freiwerdenden Emissionen konnten mit Hilfe des *Fast Real-Time PCR 7500 System* (Applied Biosystems[®], Fisher Scientific GmbH) gemessen werden und die anschließende Datenanalyse erfolgte mit der SDS 2.1 Software (Applied Biosystems[®], Fisher Scientific GmbH). Der Dissoziationslauf, welcher der Ermittlung der Schmelztemperaturen der Produkte diente, erlaubte den Ausschluss von unspezifischen Amplifikationen. Mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, normalisiert auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), konnte die Auswertung wie in [40] beschrieben erfolgen. Zur Normalisierung der Daten diente das endogene Referenzgen GAPDH.

Tabelle 4: verwendete Primer

Richtung	Sequenz
alpha 1A/D receptor <i>fw</i>	CTGCCATTCCTCGTGAT
alpha 1A/D receptor <i>rv</i>	GGCTGGAGCATGGGTATATG
GAPDH <i>fw</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH <i>rv</i>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

fw: forward, *rv*: reverse

Tabelle 5: qPCR-Programm

	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiation	50 °C	2 Minuten	
Denaturierung	95 °C	10 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	40 Zyklen
Elongation	60 °C	1 Minute	

2.2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.2.4.1 Überexpression von eNOS in Fibroblasten

Kontroll- und CGL4-Fibroblasten wurden auf Deckgläschen mit DMEM und 15% FKS gezüchtet, um anschließend eine transiente Überexpression der endothelialen NO-Synthase durch Transfektion zu erzeugen. Die Transfektion des pcDNA3 Plasmids mit dem GFP-markierten eNOS (Plasmid #22444; Addgene, Cambridge, MA, USA) erfolgte mittels jetPEI[®] Transfektionsreagenz nach Anleitung des Herstellers (Polyplus, Illkirch, Frankreich). Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert bevor weitere Analysen folgten.

2.2.2.5 Physiologische Methoden

2.2.2.5.1 Renale vaskuläre Kontraktilität

Zur Untersuchung der gewonnenen Gefäßsegmente (siehe 2.2.2.1) wurde ein automatisierter Myograph (Modell 500A, DMT, Aarhus, Dänemark) verwendet. Zur Untersuchung ihrer funktionellen Eigenschaften wurden Gefäßabschnitte von 2 mm Länge auf einen 40 µm dünnen Draht aufgefädelt und in einer Kammer mit einer Umgebungstemperatur von 37 °C in einem Gasgemisch von 95% O₂ und 5% CO₂ unter isometrischen Bedingungen untersucht. Die KHS des Organbades hatte folgende Zusammensetzung: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄*7H₂O, 6,1 mM Glukose, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂*2H₂O; pH 7,4. Die anschließende Datenerfassung erfolgte über einen Powerlab 4/25 T (ADInstruments Ltd, Oxford, UK). Anhand des Mulvany Normalisierungsverfahrens wurde die Ruhespannung festgesetzt. Der Beginn der Untersuchung erfolgte bei einem inneren Gefäßdurchmesser von 80% des IC₁₀₀. Der IC₁₀₀ entspricht dem Zustand, bei dem ein Gefäßsegment so gespannt wird, dass die Dehnung einem transmuralen Druck von 100 mmHg entspricht. Es erfolgte keine Gabe einer relaxierenden Substanz. Am Beginn des Versuchs wurde in jedem Gefäß eine Depolarisationskonstruktion durch die Gabe einer Lösung mit 100 mM KCl erzeugt. Diese Lösung wurde nach Erreichen des Maximalwertes der Kontraktion wieder gründlich ausgewaschen. Die Amplitude dieser KCl-Kontraktion wurde als Normierung aller folgenden, durch vasoaktive Substanzen induzierte Kontraktionen verwendet. Eine kumulative Applikation von Phenylephrin (PE) in ansteigender Konzentration (10⁻¹⁰ bis 3*10⁻⁷ M) diente zur Erstellung der PE-Konzentrations-Antwort-Kurven (CRC) für die renalen Interlobararterien.

Die Messung der dilatativen Kapazität der Gefäße erfolgte in vorkontrahierten Arterien. Es wurde PE in steigender Dosis verabreicht und das Gefäß zu etwa 50% der maximalen Kontraktion kontrahiert. Die Endothel-abhängige Relaxation wurde anhand der CRC für Acetylcholin (ACh; 10⁻⁹ bis 10⁻⁶ M) bewertet.

Die Rolle von NO für den Gefäßtonus der renalen Interlobararterien wurde durch Inhibition der NO-Synthase mittels N^G-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) in einer Konzentration von 10⁻⁴ M (15 Minuten Inkubation) untersucht. Nach Vorkonstriktion mit PE wurde wieder eine CRC für ACh erstellt. Die Endothel-unabhängige Dilatation wurde mit Hilfe einer CRC für Natrium-Nitroprussid (SNP; 10⁻⁹ bis 10⁻⁴ M), ebenfalls bei vorkontrahierten Gefäßen, gemessen.

2.2.3 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit der Standardabweichung (+/- SD) präsentiert. Die Messwerte wurden unter der Annahme der Normverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk Test und dem Quantil-Quantil Diagramm (*RStudio Version 1.0.143*, RStudio, Boston, MA, USA) oder der Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet.

Zum Vergleich von 2 Gruppen kam der unpaarige t-Test zum Einsatz: bei der Auswertung der Plasma- und Urinparameter, der *Western Blot*, der Immunfluoreszenzfärbung und der qRT-PCR. Die statistische Prüfung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) erfolgte anhand des unpaarigen *Mann-Whitney-U-Tests*. Der Verlauf der CRC wurde mit Hilfe eines ANOVA-ähnlichen Testverfahrens für wiederholte Messungen mit einer nicht-Normalverteilung (Brunner Test; das angewandte Programm ist online verfügbar: *The R-project*, <http://www.r-project.org>) erfasst. Die p-Werte unterhalb von 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

2.3. Wesentliche neue Ergebnisse

2.3.1 Die renale Verteilung von Cav1 und Caveolen

Dass Caveolen und damit Cav1 als einer der essentiellen Faktoren für die Bildung der Plasmamembraneinstülpungen in den Nieren vorhanden sind, war bereits bekannt [27]. Cav1 konnte bisher sowohl im renalen Endothel sowie auch an der basolateralen Membran im Verbindungstubulus (CNT) und im Sammelrohr (CD) nachgewiesen werden [27]. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass Cav1 auch im späten distalen Konvolut (DCT2) an der basolateralen Membran vorhanden ist. Der Nachweis gelang anhand der Ko-Lokalisation von Cav1 mit dem NCC unter der gleichzeitigen Darstellung der Nephronabschnitte DCT2 und CNT bzw. DCT2, CNT und CD.

2.3.2 Plasma- und Urinauswertung von Cav1^{-/-} Mäusen

In den Stoffwechselkäfiguntersuchungen zeigten die Cav1^{-/-}-Mäuse eine signifikant höhere Urin- (+126%, $p < 0,05$) und Natriumausscheidung (+142%, $p < 0,05$) im Vergleich zu den WT-Mäusen. Darüber hinaus war bei den Cav1^{-/-}-Tieren das Natrium/Kreatinin-Verhältnis (+94%, $p < 0,05$), die fraktionelle Natrium- (+81%, $p < 0,05$) und Chloridausscheidung (+107%, $p < 0,05$) gegenüber den WT-Mäusen gesteigert. Diese Werte lassen auf einen abgeschwächten Harnkonzentrierungsmechanismus schließen. Kein Unterschied konnte in Bezug auf die Plasmaelektrolyt- und Kreatininwerte nachgewiesen werden.

Allerdings konnten die Cav1^{-/-}-Mäuse unter Bedingung der Wasserdeprivation ihren Urinkonzentrierungsdefekt kompensieren. Das Urinvolumen zeigte dann keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Es konnten lediglich Trends in Richtung einer gesteigerten Urinausscheidung und einer gesteigerten Ausscheidung von Natrium, Chlorid und Calcium bei Cav1^{-/-}-Tieren beobachtet werden.

2.3.3 Epitheliale Effekte der Cav1-Deletion

Zur Ermittlung des Einflusses von Cav1 auf die Epithelien wurde mit Hilfe des Immunoblot-Verfahrens von Nierengewebe die Menge an verschiedenen Transportern und Kanälen analysiert. Hierzu gehörten die luminalen Transporter NCC und NKCC2, die luminalen Kanäle AQP2 und eNaC, die basolateralen Transporter Na⁺/K⁺-ATPase und NKCC1, der basolaterale Kanal AQP4, der basolaterale Vasopressin V2 Rezeptor sowie der an der luminalen und basolateralen Membran präsente Kanal AQP1. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und Cav1^{-/-}-Nieren. Weiterhin wurden die phosphorylierten und dementsprechend aktiven Proteinformen von NCC, NKCC2 und AQP2 analysiert. Der an Serin 71 phosphorylierte NCC zeigte sich in Cav1^{-/-}-Nieren gegenüber WT-Nieren um 40% verringert. Hingegen konnte kein Unterschied hinsichtlich an Serin 256 phosphoryliertem AQP2 sowie an Threonin 96 und 101 phosphoryliertem NKCC2 zwischen beiden Mausgruppen nachgewiesen werden.

2.3.4 Endotheliale Effekte der Cav1-Deletion

Caveolen haben einen Einfluss auf den vaskulären Tonus und dessen Reaktivität [10, 26]. Mit Hilfe konstriktorischer und dilatativer Reaktionen auf verschiedene Substanzen erfolgte die Analyse dieses Einflusses in renalen Interlobulararterien.

Hinsichtlich der Testung der konstriktorischen Eigenschaften kam eine um ein Viertel reduzierte Sensitivität gegenüber PE in den Cav1^{-/-}-Gefäßen zum Vorschein. Die maximale Konstriktion war in Cav1^{-/-}-Arterien im Vergleich zu den WT-Arterien reduziert. Die Unterdrückung der NO-Bioverfügbarkeit mit Hilfe von L-NAME vor der Stimulation mit PE steigerte die vaskuläre Kontraktilität. Dieses Ergebnis lässt eine erhöhte Bioverfügbarkeit an NO in Cav1-defizienten Gefäßen vermuten.

Des Weiteren wurde die Endothel-abhängige und -unabhängige Dilatation unter Verwendung von ACh bzw. SNP untersucht. Beide Genotypen zeigten ähnliche Endothel-abhängige Dilatationsreaktionen auf ACh nach einer vorangegangenen Konstriktion mit PE. Nach einer

Vorinkubation mit L-NAME konnte dieser Effekt aufgehoben werden, wobei der L-NAME-Einfluss in den Cav1^{-/-}-Arterien ausgeprägter war als in denen der WT-Arterien. Die Endothel-unabhängige Dilatationsreaktion, welche mit Hilfe von SNP untersucht wurde, brachte keinen Unterschied der beiden Genotypen hervor.

In Kongruenz mit den oben geschilderten Ergebnissen bei den vaskulären Versuchen unter einer Vorinkubation mit L-NAME ergab das Immunoblotting der Nierengewebe einen deutlich stärkeren Nachweis an eNOS in Cav1^{-/-}- gegenüber WT-Nieren (+213%, p<0,05). Bekräftigt wurde dieses Ergebnis mit dem Nachweis eines Zuwachses an immunoreaktivem eNOS-Signal entlang des Cav1^{-/-}-Endothels gegenüber dem WT-Endothel in der konfokalen Laser-Scanningmikroskopie (+133% in den Interlobararterien und +47% in den Vasa recta).

Zusätzlich konnte unter Verwendung der qRT-PCR ein Zuwachs an alpha-adrenergen Rezeptoren in Cav1^{-/-}- im Vergleich zu WT-Nieren (+63%, p<0,05) nachgewiesen werden.

In Zusammenschau der Untersuchungen sprechen diese Ergebnisse für eine abgeschwächte Vasokonstriktion in Kombination mit einer vermutlich erhöhten Bioverfügbarkeit an NO unter einer Cav1-Deletion. Dieser Mechanismus könnte die renale Harnkonzentrierung abschwächen und somit als Erklärung für den renalen Volumenverlust dienen.

2.3.5 Zellversuche

Zur Ergänzung der Tierversuche erfolgten zelluläre Versuche mit Hilfe von Kontroll- und CGL4-Fibroblasten. Aufgrund einer Mutation von PTRF kommt es in CGL4-Fibroblasten nicht zur Ausbildung von Caveolen und somit bietet sich die Möglichkeit, auf zellulärer Ebene den Einfluss der Caveolen auf eNOS zu untersuchen. Unter Anwendung der RipFlip-Methode konnte bestätigt werden, dass CGL4-Fibroblasten an ihrer Plasmamembran keine Caveolen ausbilden. Die Transfektion mit GFP-konjugiertem eNOS erbrachte in den Kontrollfibroblasten den Nachweis der endothelialen NO-Synthase entlang der Plasmamembran, wohingegen in den CGL4-Fibroblasten die eNOS eher intrazellulär zu finden war. Mittels der NADPH-Diaphorase Reaktion gelang der indirekte Nachweis einer gesteigerten eNOS-Aktivität in den CGL4-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten. Die Befunde suggerieren, dass ein Verlust an Caveolen zu einer Zunahme der zytoplasmatischen eNOS-Fraktion und damit womöglich zu einer vermehrten NO Biosynthese führt [41]. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Tierversuchen und bestätigen die Interaktionen zwischen Caveolen und der NO-Synthase.

2.4. Klinische Anwendung und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Die Untersuchung der Funktion der Caveolen beziehungsweise von Cav1 in der Niere war bislang wenig fortgeschritten. In den vorangegangenen Publikationen erfolgte der Nachweis von Caveolen und Cav1 in renalen Gefäßen sowie im renalen distalen Epithelgewebe sowie eine Phenotypisierung von Cav1-defizienten Mäusen. Das Ziel der Arbeit war, neben der Verifizierung dieser Ergebnisse, den Einfluss von Caveolen und Cav1 auf die renale Reabsorption von Wasser und Salzen näher zu untersuchen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Deletion von Cav1 einen Einfluss auf verschiedenen Ebenen auf das renale Organsystem hat. Aufgrund der nachgewiesenen Polyurie und des Salzverlustes im *steady state*-Versuch bei Cav1^{-/-}-Mäusen kann ein Einfluss von Cav1 auf die renale Reabsorption von Wasser und Salzen diskutiert werden.

Die nachgewiesene erhöhte Natriumausscheidung in Cav1^{-/-}-Mäusen kann in Teilen durch den moderaten Rückgang an pS71-NCC erklärt werden. Allerdings gilt es zu bedenken, dass bisher kein Nachweis einer molekularen Interaktion zwischen dem apikalen NCC und dem basolateralen Cav1 erfolgte und die Ko-Expression der beiden Proteine auf einen kurzen Abschnitt im DCT2 begrenzt ist. Um die Beeinflussung der renalen Harnkonzentrierung durch die Caveolen bzw. Cav1 besser zu verstehen, ist es wichtig die Effekte von Caveolen und Cav1 auf die renalen Kanäle und Transporter noch näher zu untersuchen.

Hierzu zählt sicherlich eine Charakterisierung der Interaktion zwischen Cav1 und dem epithelialen Natriumkanal (eNaC). In der vorliegenden Arbeit konnte kein quantitativer Unterschied bezüglich des Vorhandenseins von eNaC α nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Urin-Na⁺/K⁺-Verhältnisses, was für eine aufrechterhaltende Funktion des eNaC spricht. Allerdings gilt es zu bedenken, dass in einer vorangegangenen Arbeit in Cav1^{-/-}-Mäusen entlang des distalen Nephrons eine Veränderung des basolateralen Kaliumtransports beobachtet werden konnte [29]. Somit ist davon auszugehen, dass ein erhaltenes Urin-Na⁺/K⁺-Verhältnis allein nicht als ausreichende Grundlage für die Erklärung einer erhaltenen eNaC-Funktion herangezogen werden kann.

Bei der Stimulation der Harnkonzentrierung mit Hilfe eines Durstversuchs zeigten sich bezüglich des Verlustes an Elektrolyten und Wasser keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mauslinien. Somit ist davon auszugehen, dass ein Kompensationsmechanismus vorliegen muss, der es erlaubt, in Abwesenheit von Cav1 eine ausreichende Konzentrierung des Harns zu

gewährleisten. In Durstsituationen kommt es zu einem Anstieg an endogenem Vasopressin (ADH), was dazu führt, dass über die Aktivierung des Vasopressin V2 Rezeptor (V2R) entlang des distalen Nephrons und der Hauptzellen im CD die Salz- und Wasserrückresorption gesteigert werden kann [34, 42, 43]. In den Untersuchungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von V2R. Ein Anstieg des ADH unter einem Wasserentzug und dem daraus resultierenden Kompensationsmechanismus könnte womöglich eine Erklärung für das erzielte Ergebnis sein, bedarf jedoch in der Zukunft weiterer Untersuchungen, um dies als gesichert nachweisen zu können.

Die Untersuchungen der endothelialen Effekte der Cav1-Deletion zeigten unter anderem eine Zunahme der Genexpression der alpha-adrenergen Rezeptoren in Cav1^{-/-}-Nieren, was womöglich als Kompensation für die vermutete erhöhte Bioverfügbarkeit an NO zu deuten ist. Diesbezüglich ist in zukünftigen Studien allerdings noch zu klären, ob sich die Menge an alpha-adrenergen Rezeptoren auf der Proteinebene in renalen Gefäßen bestätigen lässt.

In vorangegangenen Publikationen wurde bereits diskutiert, dass Caveolen und Cav1 mögliche Ziele einer pharmakologischen Therapie sein könnten [44, 45]. Ziel zukünftiger Studien könnte es sein, die Ansätze einer möglichen pharmakologischen Anwendung weiter voranzutreiben. Darüberhinaus könnten nachfolgende Studien eine weitere Charakterisierung der renalen Caveolen/Cav1-Funktion durchführen. Die Ergebnisse zukünftiger Studien könnten die Grundlage einer Caveolen/Cav1-basierten pharmakologischen Therapie bei Störungen des renalen Wasser- und Elektrolythaushaltes darstellen.

2.5. Literaturverzeichnis

1. Palade, G. E., *Fine structure of blood capillaries*. J. Appl. Phys., 1953. **24**: p. 1424.
2. Yamada, E., *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. J Biophys Biochem Cytol, 1955. **1**(5): p. 445-58.
3. Parton, R. G. and Simons, K., *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
4. Anderson, R. G., *The caveolae membrane system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 199-225.
5. Lajoie, P. and Nabi, I. R., *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **282**: p. 135-63.
6. Lisanti, M. P., Tang, Z., Scherer, P. E., Kubler, E., Koleske, A. J. and Sargiacomo, M., *Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation*. Mol Membr Biol, 1995. **12**(1): p. 121-4.
7. Kurzchalia, T. V. and Parton, R. G., *Membrane microdomains and caveolae*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(4): p. 424-31.
8. Williams, T. M. and Lisanti, M. P., *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(3): p. C494-506.

9. Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M. R., Gygi, S. P., Vinten, J., Walser, P. J., North, K. N., Hancock, J. F., Pilch, P. F. and Parton, R. G., *MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes*. *J Cell Biol*, 2009. **185**(7): p. 1259-73.
10. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H. and Kurzchalia, T. V., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. *Science*, 2001. **293**(5539): p. 2449-52.
11. Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M. and Hancock, J. F., *Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 5): p. 787-96.
12. Razani, B., Zhang, X. L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E. P. and Lisanti, M. P., *Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): p. 6727-38.
13. Williams, T. M. and Lisanti, M. P., *The Caveolin genes: from cell biology to medicine*. *Ann Med*, 2004. **36**(8): p. 584-95.
14. Razani, B., Wang, X. B., Engelman, J. A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X. L., Kneitz, B., Hou, H., Jr., Christ, G. J., Edelmann, W. and Lisanti, M. P., *Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(7): p. 2329-44.
15. Parat, M. O., *The biology of caveolae: achievements and perspectives*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009. **273**: p. 117-62.
16. Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W. and Lisanti, M. P., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
17. Galbiati, F., Volonte, D., Chu, J. B., Li, M., Fine, S. W., Fu, M., Bermudez, J., Pedemonte, M., Weidenheim, K. M., Pestell, R. G., Minetti, C. and Lisanti, M. P., *Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9689-94.
18. McNally, E. M., de Sa Moreira, E., Duggan, D. J., Bonnemann, C. G., Lisanti, M. P., Lidov, H. G., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Hoffman, E. P., Zatz, M. and Kunkel, L. M., *Caveolin-3 in muscular dystrophy*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(5): p. 871-7.
19. Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P. and Zara, F., *Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy*. *Nat Genet*, 1998. **18**(4): p. 365-8.
20. Briand, N., Dugail, I. and Le Lay, S., *Cavin proteins: New players in the caveolae field*. *Biochimie*, 2011. **93**(1): p. 71-7.
21. Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H., Ravid, K. and Pilch, P. F., *Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance*. *Cell Metab*, 2008. **8**(4): p. 310-7.
22. Rajab, A., Straub, V., McCann, L. J., Seelow, D., Varon, R., Barresi, R., Schulze, A., Lucke, B., Lutzkendorf, S., Karbasiyan, M., Bachmann, S., Spuler, S. and Schuelke, M., *Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(3): p. e1000874.
23. Hnasko, R. and Lisanti, M. P., *The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease*. *Mol Interv*, 2003. **3**(8): p. 445-64.
24. Le Lay, S. and Kurzchalia, T. V., *Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1746**(3): p. 322-33.
25. Thompson, M. A., Prakash, Y. S. and Pabelick, C. M., *The role of caveolae in the pathophysiology of lung diseases*. *Expert Rev Respir Med*, 2014. **8**(1): p. 111-22.

26. Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W. and Lisanti, M. P., *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38121-38.
27. Breton, S., Lisanti, M. P., Tyszkowski, R., McLaughlin, M. and Brown, D., *Basolateral distribution of caveolin-1 in the kidney. Absence from H⁺-atpase-coated endocytic vesicles in intercalated cells*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(2): p. 205-14.
28. Cao, G., Yang, G., Timme, T. L., Saika, T., Truong, L. D., Satoh, T., Goltsov, A., Park, S. H., Men, T., Kusaka, N., Tian, W., Ren, C., Wang, H., Kadmon, D., Cai, W. W., Chinault, A. C., Boone, T. B., Bradley, A. and Thompson, T. C., *Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1241-8.
29. Wang, L., Zhang, C., Su, X., Lin, D. H. and Wang, W., *Caveolin-1 Deficiency Inhibits the Basolateral K⁺ Channels in the Distal Convolutated Tubule and Impairs Renal K⁺ and Mg²⁺ Transport*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(11): p. 2678-90.
30. Paunescu, T. G., Lu, H. A., Russo, L. M., Pastor-Soler, N. M., McKee, M., McLaughlin, M. M., Bartlett, B. E., Breton, S. and Brown, D., *Vasopressin induces apical expression of caveolin in rat kidney collecting duct principal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(12): p. F1783-95.
31. Trimpert, C., van den Berg, D. T., Fenton, R. A., Klusmann, E. and Deen, P. M., *Vasopressin increases S261 phosphorylation in AQP2-P262L, a mutant in recessive nephrogenic diabetes insipidus*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(12): p. 4389-97.
32. McCormick, J. A., Mutig, K., Nelson, J. H., Saritas, T., Hoorn, E. J., Yang, C. L., Rogers, S., Curry, J., Delpire, E., Bachmann, S. and Ellison, D. H., *A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure*. Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 352-64.
33. Saritas, T., Borschewski, A., McCormick, J. A., Paliege, A., Dathe, C., Uchida, S., Terker, A., Himmerkus, N., Bleich, M., Demaretz, S., Laghmani, K., Delpire, E., Ellison, D. H., Bachmann, S. and Mutig, K., *SPAK differentially mediates vasopressin effects on sodium cotransporters*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(3): p. 407-18.
34. Mutig, K., Paliege, A., Kahl, T., Jons, T., Muller-Esterl, W. and Bachmann, S., *Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(4): p. F1166-77.
35. Mutig, K., Borowski, T., Boldt, C., Borschewski, A., Paliege, A., Popova, E., Bader, M. and Bachmann, S., *Demonstration of the functional impact of vasopressin signaling in the thick ascending limb by a targeted transgenic rat approach*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(2): p. F411-23.
36. Bachmann, S., Peters, J., Engler, E., Ganten, D. and Mullins, J., *Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model*. Kidney Int, 1992. **41**(1): p. 24-36.
37. Rehm, Hubert and Letzel, Thomas, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7 ed. Experimentator. 2016: Springer Spektrum. 406.
38. Bosse, H. M., Bohm, R., Resch, S. and Bachmann, S., *Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. F793-805.
39. Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Zhang, J., Samelson, L. E., Yang, L. H., Kotula, P. G. and Oliver, J. M., *Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2580-92.

40. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
41. Shaul, P. W., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 749-74.
42. Rieg, T., Tang, T., Murray, F., Schroth, J., Insel, P. A., Fenton, R. A., Hammond, H. K. and Vallon, V., *Adenylate cyclase 6 determines cAMP formation and aquaporin-2 phosphorylation and trafficking in inner medulla*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21**(12): p. 2059-68.
43. Pedersen, N. B., Hofmeister, M. V., Rosenbaek, L. L., Nielsen, J. and Fenton, R. A., *Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule*. *Kidney Int*, 2010. **78**(2): p. 160-9.
44. Sellers, S. L., Trane, A. E. and Bernatchez, P. N., *Caveolin as a potential drug target for cardiovascular protection*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 280.
45. Sun, J., Nguyen, T., Kohr, M. J. and Murphy, E., *Cardioprotective Role of Caveolae in Ischemia-Reperfusion Injury*. *Transl Med (Sunnyvale)*, 2013. **3**(1).

2.6. Anhang

2.6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper	7
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper	8
Tabelle 3: Zusammensetzung des 10%igen Polyacrylamidgels (für insgesamt 4 Gele).....	12
Tabelle 4: verwendete Primer.....	17
Tabelle 5: qPCR-Programm	17

3. Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yan Willière, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Epitheliale und endotheliale Effekte der Caveolin-1-Deletion in der Niere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

04.12.2018

Yan Willière

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: Willière Y*, Borschewski A*, Patzak A, Nikitina T, Dittmayer C, Daigeler AL, Schuelke M, Bachmann S, Mutig K, Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption, Scientific Reports volume 8, Article number: 545 (2018)

* Doppel-Erstautorenschaft

ISI Impact Factor 2017: 4,122

Eigenfactor Score 2017: 0,718960

Beitrag im Einzelnen:

Bei dieser Publikation habe ich die Tierversuche in den metabolischen Käfigen inklusive der Gewinnung und Aufbereitung der Urine sowie Plasmaproben durchgeführt. Zusätzlich habe ich bei der Vorbereitung der vaskulären Versuche unterstützend geholfen und die Nieren für die biochemischen Untersuchungen aufbereitet. Die Zellkulturen wurden von mir in Zusammenarbeit mit unserer MTA für die aufgeführten Versuche vorbereitet. Aus meiner Durchführung sind die Bilder (engl. *figures*) 1c-h, 3a-b, 5a/h-i, 6e-f sowie die Tabellen (engl. *tables*) 1 und 2 entstanden. Vorbereitende Versuche wurden von mir für die Bilder 2a-b, 5b-g sowie 6c-d durchgeführt. Darüberhinaus war ich an der Auswahl der Bilder 2e-j beteiligt.

Die aufgeführten Versuche habe ich mitgeplant und hatte wesentlichen Anteil an der Erstellung der Bildtafeln für die Publikation. Auch bei der Erstellung des Manuskriptes habe ich wesentlich mitgewirkt.

Yan Willière

Prof. Dr. S. Bachmann

4. Auszug aus Journal Summary List (ISIS Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 64 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	710,766	41.577	1.355810
2	SCIENCE	645,132	41.058	1.127160
3	Nature Communications	178,348	12.353	0.926560
4	Science Advances	10,194	11.511	0.057080
5	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	637,268	9.504	1.108220
6	National Science Review	952	9.408	0.004340
7	GigaScience	1,694	7.267	0.011030
8	Scientific Data	1,567	5.305	0.008550
9	Journal of Advanced Research	1,843	4.327	0.003820
10	Annals of the New York Academy of Sciences	46,160	4.277	0.033270
11	Science Bulletin	1,952	4.136	0.005900
12	Scientific Reports	192,841	4.122	0.718960
13	Journal of the Royal Society Interface	11,357	3.355	0.030960
14	Research Synthesis Methods	1,374	3.218	0.006030
15	PLoS One	582,877	2.766	1.862350
16	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,807	2.746	0.028220
17	Royal Society Open Science	2,145	2.504	0.009260
18	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,157	2.410	0.018270
19	PeerJ	7,377	2.118	0.031600
20	NPJ Microgravity	94	2.000	0.000350
21	SCIENCE AND ENGINEERING ETHICS	1,496	1.859	0.002520
22	COMPLEXITY	1,369	1.829	0.002380
23	Science of Nature	324	1.789	0.001260

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
24	PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY SERIES B-PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES	1,355	1.771	0.001950
25	Proceedings of the Romanian Academy Series A-Mathematics Physics Technical Sciences Information Science	375	1.752	0.000940
26	FRACTALS-COMPLEX GEOMETRY PATTERNS AND SCALING IN NATURE AND SOCIETY	1,077	1.629	0.000870
27	SCIENTIFIC AMERICAN	6,410	1.579	0.003880
28	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIFURCATION AND CHAOS	6,094	1.501	0.007220
29	Symmetry-Basel	777	1.256	0.001630
30	SOUTH AFRICAN JOURNAL OF SCIENCE	2,332	1.191	0.001950
31	Jove-Journal of Visualized Experiments	10,616	1.184	0.034680
32	JOURNAL OF THE INDIAN INSTITUTE OF SCIENCE	375	1.151	0.000640
33	JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF NEW ZEALAND	682	1.147	0.000380
34	Mathematical Modelling of Natural Phenomena	627	1.101	0.002110
35	SCIENCE PROGRESS	458	1.098	0.000410
36	ARABIAN JOURNAL FOR SCIENCE AND ENGINEERING	2,678	1.092	0.005250
37	ISSUES IN SCIENCE AND TECHNOLOGY	400	1.030	0.000860
38	RENDICONTI LINCEI-SCIENZE FISICHE E NATURALI	549	0.986	0.001220
39	ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS	2,362	0.956	0.003040
40	Frontiers in Life Science	125	0.907	0.000310
41	CURRENT SCIENCE	10,146	0.883	0.007220
42	Proceedings of the Estonian Academy of Sciences	534	0.843	0.000540
43	ADVANCES IN COMPLEX SYSTEMS	614	0.769	0.000760
44	DISCRETE DYNAMICS IN NATURE AND SOCIETY	1,726	0.757	0.003940
44	Iranian Journal of Science and Technology Transaction A-Science	313	0.757	0.000470

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
46	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES INDIA SECTION A-PHYSICAL SCIENCES	226	0.754	0.000550
47	Kuwait Journal of Science	118	0.693	0.000170
48	Sains Malaysiana	1,216	0.565	0.001510
49	SCIENTIST	247	0.537	0.000520
50	AMERICAN SCIENTIST	2,360	0.525	0.001360
51	NATIONAL ACADEMY SCIENCE LETTERS-INDIA	390	0.519	0.000780
52	DEFENCE SCIENCE JOURNAL	837	0.510	0.000610
53	ENDEAVOUR	479	0.500	0.000460
53	TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF SOUTH AUSTRALIA	414	0.500	0.000110
55	HERALD OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES	314	0.472	0.000330
56	Maejo International Journal of Science and Technology	183	0.469	0.000270
57	SCIENCEASIA	536	0.447	0.000590
58	Chiang Mai Journal of Science	455	0.409	0.000570
59	NEW SCIENTIST	917	0.386	0.001120
60	INTERDISCIPLINARY SCIENCE REVIEWS	238	0.311	0.000080
61	JOURNAL OF THE NATIONAL SCIENCE FOUNDATION OF SRI LANKA	213	0.305	0.000240
62	COMPTES RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES	570	0.270	0.000410
63	ACTA SCIENTIARUM-TECHNOLOGY	246	0.231	0.000400
64	R&D MAGAZINE	19	0.109	0.000000

Copyright © 2018 Clarivate Analytics

5. Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption

Yan Willière¹, Aljona Borschevski¹, Andreas Patzak², Tatiana Nikitina², Carsten Dittmayer¹, Anna L. Daigeler¹, Markus Schuelke³, Sebastian Bachmann¹ & Kerim Mutig¹

Received: 5 June 2017
 Accepted: 19 December 2017
 Published online: 11 January 2018

Caveolin-1 (Cav1) is essential for the formation of caveolae. Little is known about their functional role in the kidney. We tested the hypothesis that caveolae modulate renal salt and water reabsorption. Wild-type (WT) and Cav1-deficient (Cav1^{-/-}) mice were studied. Cav1 expression and caveolae formation were present in vascular cells, late distal convoluted tubule and principal connecting tubule and collecting duct cells of WT but not Cav1^{-/-} kidneys. Urinary sodium excretion was increased by 94% and urine flow by 126% in Cav1^{-/-} mice ($p < 0.05$). A decrease in activating phosphorylation of the Na-Cl cotransporter (NCC) of the distal convoluted tubule was recorded in Cav1^{-/-} compared to WT kidneys (-40% ; $p < 0.05$). Isolated intrarenal arteries from Cav1^{-/-} mice revealed a fourfold reduction in sensitivity to phenylephrine ($p < 0.05$). A significantly diminished maximal contractile response (-13% ; $p < 0.05$) was suggestive of enhanced nitric oxide (NO) availability. In line with this, the abundance of endothelial NO synthase (eNOS) was increased in Cav1^{-/-} kidneys $+213\%$; $p < 0.05$ and cultured caveolae-deprived cells showed intracellular accumulation of eNOS, compared to caveolae-intact controls. Our results suggest that renal caveolae help to conserve water and electrolytes via modulation of NCC function and regulation of vascular eNOS.

Caveolae are flask-like, 60 to 80 nm-size, cholesterol- and sphingolipid-enriched invaginations of the plasma membrane. They are typically found in endothelial and smooth muscle cells as well as in some epithelia^{1,2}. Previous work has demonstrated their ability to provide plasma membrane reservoirs during mechanical stress such as osmotic swelling or axial stretching³. Apart from this role, caveolae have been implicated in multiple cell functions such as signal transduction, vesicular trafficking, endocytosis, and functional modulation of plasma membrane proteins⁴. Major pathways such as nitric oxide release or calcium signaling have been associated with caveolae^{1,4}. Caveolae have been implicated in regulation of vascular tone, cardiac rhythm, respiratory function, and overall lipid metabolism⁵⁻⁷.

Caveolin-1 (Cav1) and Cavin-1 (also known as Polymerase I and Transcript Release Factor; PTRF) are essential for the biogenesis of caveolae. Genetic deletion of either Cav1 or PTRF in mice leads to impaired caveolae formation with resulting functional disorders primarily affecting blood vessels, lungs, and fat tissue^{5,6,8}. Human PTRF mutations have been linked with congenital generalized lipodystrophy type 4 (CGL4) characterized by markedly reduced body fat mass, muscle weakness, and life-threatening cardiac arrhythmia⁷. Although caveolae are abundant in virtually all organs, previous studies were mainly focused on their functional relevance in the respiratory and cardiovascular systems⁹. Caveolae have been implicated in the pathogenesis of pulmonary diseases such as asthma, obstructive disease, and fibrosis, as well as cardiovascular disease including pulmonary hypertension¹⁰. Less is known about the role of caveolae in the kidney, where earlier studies described the presence of Cav1 and caveolae in the vasculature and distal renal epithelia¹¹. Phenotyping of Cav1-deficient mice (Cav1^{-/-}) revealed moderate urinary loss of calcium, magnesium, and potassium, suggesting that caveolae may play a role in renal handling of these electrolytes^{12,13}. These effects are believed to depend on functional interactions of Cav1 with basolateral calcium and potassium transport proteins^{12,13}. A recent study in vasopressin-deficient Brattleboro rats with central diabetes insipidus (DI) proposed a role for Cav1 in the urinary concentration process; stimulation of DI rats with the vasopressin V2 receptor agonist desmopressin (dDAVP) induced a sustained apical translocation of Cav1 in principal cells of collecting ducts¹⁴. The functional significance of caveolae for renal reabsorption of salt and water, however, remained to be elucidated further^{11,14}. In this study we therefore utilized

¹Department of Anatomy, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ²Department of Physiology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ³Department of Neuropediatrics, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. Yan Willière and Aljona Borschevski contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.M. (email: kerim.mutig@charite.de)

Cav1-deficient (Cav1^{-/-}) mice to assess the contribution of caveolae to renal water and electrolyte handling. Epithelial as well as endothelial functions of Cav1 in the kidney have been addressed.

Results

Renal distribution of Cav1 and caveolae in WT and Cav1^{-/-} mice. In light of the scarce information available on Cav1 distribution in the mouse kidney, we first analyzed overall Cav1 expression in the renal parenchyma of WT mice. In an overview approach, anti-Cav1 immunoperoxidase staining showed a significant basolateral signal in a subpopulation of cortical distal tubules as well as in blood vessels such as the outer medullary vascular bundles (Fig. 1a,b). Double immunofluorescence staining for Cav1 and Na,K,2Cl-cotransporter (NKCC2) of the thick ascending limb (TAL) showed that the entire TAL and macula densa were negative for Cav1; beyond the macula densa, the transition between TAL and DCT showed that the initial distal convoluted tubule (DCT1) was Cav1-negative as well (Fig. 1c,d). On consecutive sections, co-staining of Cav1 and Na,Cl-cotransporter (NCC) demonstrated the onset of Cav1 expression in the late portion of the DCT (DCT2), and a stronger signal was also found in ensuing, NCC-negative connecting tubule (CNT) principal cells which were identified by morphological criteria (Fig. 1e,f). Double immunofluorescence staining for Cav1 and aquaporin 2 (AQP2) showed an additional, substantial Cav1 signal in the collecting duct (CD) principal cells (Fig. 1g,h). Cav1^{-/-} kidneys showed no significant Cav1 signals in DCT2 or in CNT and CD principal cells (Fig. 2a,b). Renal blood vessels showed a Cav1 immunofluorescent signal in the arteries, arterioles, medullary vascular bundles, and capillaries of WT kidneys. There was pronounced staining of the arteriolar smooth muscle layer, and endothelia were positive throughout the vasculature, including glomerular capillaries, as revealed by double immunofluorescence staining with the endothelial marker CD31 (Fig. 2c). Cav1 staining was absent from the entire vasculature in Cav1^{-/-} kidney (Fig. 2d). Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy showed densely packed rows of caveolae along plasma membranes of vascular smooth muscle cells and endothelia in WT, but none in Cav1^{-/-} kidneys (Fig. 2e,f). Caveolae were also found attached to the basolateral membrane of CNT and CD principal cells of WT, but not Cav1^{-/-} kidneys (Fig. 2g,h). In line with this, pre-embedding labeling of Cav1 and detection by transmission electron microscopy produced a signal along the basolateral membrane of principal CNT and CD cells in WT but not in Cav1^{-/-} kidneys (Fig. 2i,j).

Urine and blood analysis of Cav1^{-/-} mice. For steady state analysis, mice were placed in metabolic cages to obtain 24 h urine samples. Plasma samples were obtained when mice were sacrificed for organ removal. Analysis of plasma electrolytes and creatinine levels revealed no significant differences between WT and Cav1^{-/-} mice (Table 1). Urinary sodium excretion (+142%, $p < 0.05$), sodium/creatinine ratio (+94%, $p < 0.05$), fractional sodium excretion (+81%, $p < 0.05$), fractional chloride excretion (+107%, $p < 0.05$), as well as urine volume (+126%, $p < 0.05$) were significantly increased in Cav1^{-/-} compared to WT mice (Table 1). There were no significant differences between WT and Cav1^{-/-} mice with respect to potassium, calcium, urea, and creatinine levels; although a strong trend towards augmented calcium excretion and a moderate trend towards potassium wasting were observed. A parallel cohort of WT and Cav1^{-/-} mice was subjected to water deprivation for 18 h to challenge their urinary concentrating ability. This experiment produced no statistical differences in urinary electrolyte excretion between the strains, showing only trends towards increased urinary volume and urinary levels of sodium, chloride, potassium and calcium in Cav1^{-/-} mice (Table 2).

Epithelial effects of Cav1 deficiency. Next, we tested effects of Cav1-deficiency on the abundance of relevant distal transporters and channels by immunoblotting of whole kidney lysates. Protein levels of basolateral and luminal transporters and channels, including Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, aquaporin 1 (AQP1), NKCC2, NCC, aquaporin 2 (AQP2), aquaporin 4 (AQP4), and the alpha subunit of the epithelial sodium channel (ENaCo), as well as of the basolateral vasopressin V2 receptor (V2R) did not differ between WT and Cav1^{-/-} kidneys (Fig. 3a,b). Since the activities of AQP2, NKCC2 and NCC primarily depend on their phosphorylation at conserved threonine- or serine residues^{15–17}, we further applied antibodies recognizing their phosphorylated species. AQP2 phosphorylation at S256 and NKCC2 phosphorylation at T96/T101 were not affected by Cav1-deficiency, whereas NCC phosphorylation at S71 was significantly decreased in Cav1^{-/-} compared to WT mice (-40%, $p < 0.05$; Fig. 3a,b).

Vascular effects of Cav1 deficiency. Since caveolae have been implicated in the regulation of vascular tone and reactivity, we evaluated contractile and dilatory responses in renal interlobular arteries obtained from WT and Cav1^{-/-} kidneys. Cumulative addition of phenylephrine (PE) to the bath solution revealed significantly reduced sensitivity (EC_{50} : 422 ± 65 nM in WT vs. 105 ± 9 nM in Cav1^{-/-}, $p < 0.05$) and reduced maximum contractile responses in Cav1^{-/-} arteries compared to WT arteries (119 ± 6% in WT vs. 106 ± 5% in Cav1^{-/-}, $p < 0.05$; Fig. 4a). Pre-incubation of vessels with L-NAME to inhibit the production of nitric oxide (NO) improved the contractile response to PE in Cav1^{-/-} arteries, suggesting increased NO bioavailability upon Cav1 disruption (EC_{50} : 112 ± 41 nM, $p < 0.05$; Fig. 4a). Further, we tested endothelium-dependent and independent relaxation responses using acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP), respectively. ACh applied after precontraction with PE produced similar relaxation responses in both genotypes, which could be abolished by preincubation of the arteries with L-NAME ($p < 0.05$), but the effect of L-NAME was more pronounced in Cav1^{-/-} compared to WT arteries ($p < 0.05$), again suggesting increased NO levels in Cav1^{-/-} arteries (Fig. 4b,c). The endothelium-independent relaxation tested by cumulative application of SNP was not different in WT and Cav1^{-/-} arteries (Fig. 4d). In line with the increased response of Cav1^{-/-} arteries to the NOS-inhibitor L-NAME, immunoblotting of kidney lysates showed enhanced abundance of the endothelial nitric oxide synthase isoform (eNOS) in Cav1^{-/-} compared to WT kidneys (+213%, $p < 0.05$; Fig. 5a,h). This result was corroborated by confocal microscopic evaluation of WT and Cav1^{-/-} kidneys showing enhanced eNOS

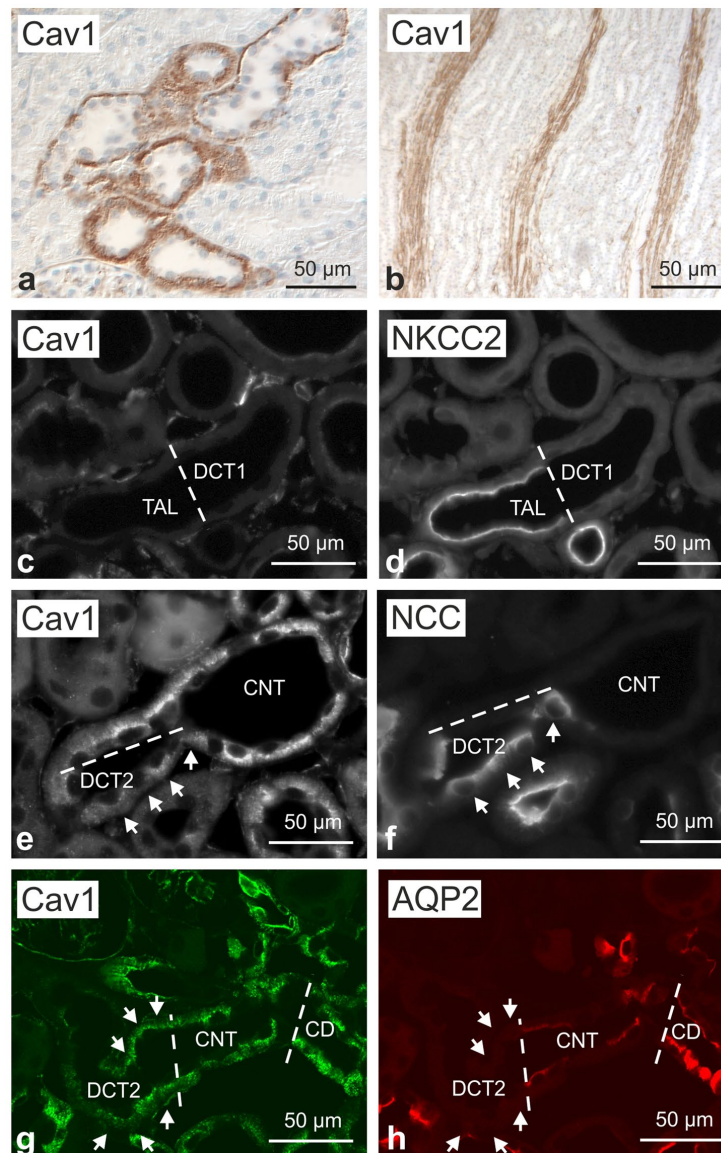


Figure 1. Renal distribution of caveolin 1 in wild-type mouse kidney. (a,b) Representative bright-field images showing basolateral caveolin 1 (Cav1) distribution along renal distal epithelia (a) as well as a Cav1 signal in medullary vasculature (b); immunoperoxidase/hematoxylin staining, interference contrast. (c,d) Double immunofluorescence staining for Cav1 and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) shows the transition between NKCC2-positive thick ascending limb (TAL) and NKCC2-negative early distal convoluted tubule (DCT1; bar); TAL and DCT1 are Cav1-negative. (e,f) Immunofluorescence staining for Cav and, on a consecutive section, for DCT-specific Na-Cl cotransporter (NCC) showing the transition between NCC-positive late DCT (DCT2) and ensuing NCC-negative connecting tubule (CNT); moderate basolateral Cav1 signal is detected in DCT2 (arrows); stronger Cav1 signal is observed in CNT principal cells. (g,h) Double immunofluorescence staining for Cav1 and aquaporin 2 (AQP2) shows a moderate Cav1 signal in AQP2-negative DCT2 (arrows) and a stronger Cav1 signal in CNT and collecting duct (CD) principal cells (bars indicate DCT2/CNT and CNT/CD transitions).

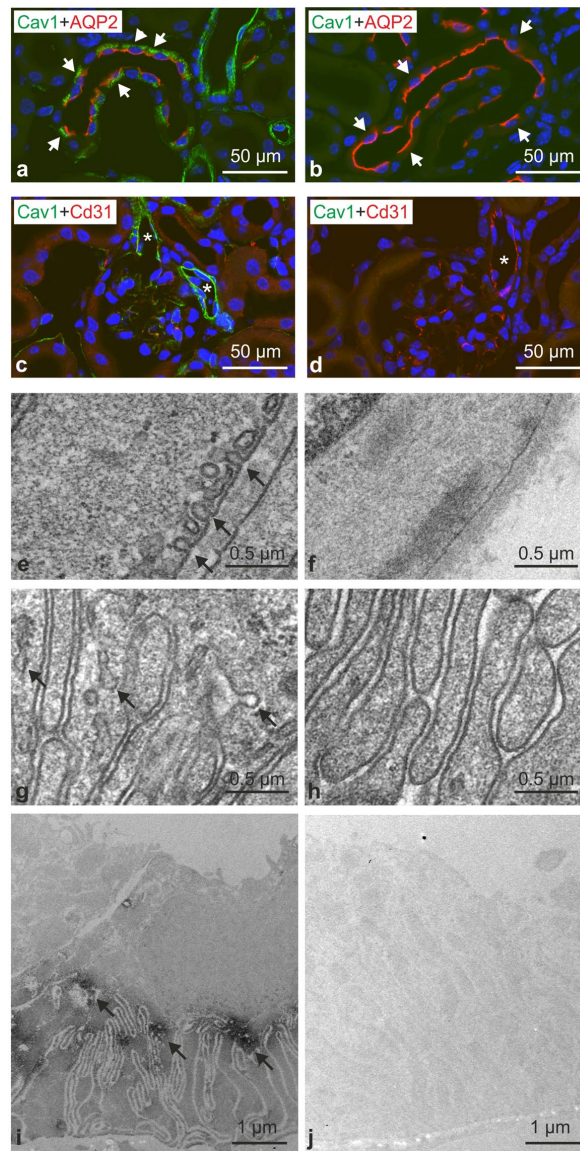


Figure 2. Verification of caveolin-1 deficiency. **(a,b)** Representative confocal images of control WT (**a**; $n=4$) and Cav1-deficient kidneys (**b**; $n=4$) after double immunofluorescence staining for Cav1 (green signal) and AQP2 (red signal) showing strong basolateral Cav1 labeling in WT CD principal cells identified by positive luminal AQP2 signals (exemplified by arrows); no corresponding Cav1 signal was detected in Cav1 $^{-/-}$ kidneys (arrows). **(c,d)** Double staining for vascular Cav1 signal (green; arterioles marked with asterisks) and endothelial marker CD31 (red) in WT (**c**) and Cav1 $^{-/-}$ kidneys (**d**); note strong Cav1 signal in WT but not in Cav1 $^{-/-}$ vessels. **(e-h)** Representative transmission electron microscopy images of WT (**e,g**) and Cav1-deficient kidneys (**f,h**) documenting caveolae (arrows) in the plasma membrane of WT vascular smooth muscle (**e**) and CD principal cells (**g**), and absence of caveolae in Cav1-deficient vascular smooth muscle (**f**) and CD principal cells (**h**). **(i,j)** Pre-embedding labeling of WT and Cav1 $^{-/-}$ kidney sections for Cav1 detected by transmission electron microscopy shows basolateral Cav1 labeling of principal CD cells in WT (arrows) but not in Cav1 kidneys.

	WT (n = 6)	Cav1 ^{-/-} (n = 6)
<i>Plasma parameters (mean ± SD)</i>		
Na ⁺ , mmol/L	152.1 ± 1.5	143.7 ± 12.0
K ⁺ , mmol/L	5.9 ± 0.3	6.2 ± 0.8
Cl ⁻ , mmol/L		
Ca ²⁺ , mmol/L	1.88 ± 0.05	1.90 ± 0.03
Creatinine, mg/dl	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Urea, mg/dl	54.5 ± 4.4	55.4 ± 7.4
<i>Urinary analysis (mean ± SD)</i>		
Body weight, g	28.3 ± 0.8	29.8 ± 0.8
Urinary volume, g/g body weight	0.023 ± 0.005	0.052 ± 0.010*
Na ⁺ excretion, mmol/kg*24 h	2.6 ± 1.5	6.3 ± 1.5*
K ⁺ excretion, mmol/kg*24 h	5.2 ± 1.6	8.2 ± 1.9
Cl ⁻ excretion, mmol/kg*24 h	3.6 ± 0.9	7.7 ± 2.1
Ca ²⁺ excretion, mmol/kg*24 h	0.07 ± 0.01	0.16 ± 0.06
Creatinine, mg/dl	41.2 ± 4.2	24.7 ± 5.1
Creatinine, mg/g body weight	0.009 ± 0.002	0.011 ± 0.001
Na ⁺ /creatinine ratio	33.7 ± 4.2	65.4 ± 12.1*
K ⁺ /creatinine ratio	66.4 ± 10.7	85.1 ± 17.2
Cl ⁻ /creatinine ratio	45.9 ± 4.6	80.6 ± 19.0
Ca ²⁺ /creatinine ratio	0.95 ± 0.09	1.64 ± 0.62
<i>Renal function (mean ± SD)</i>		
Fractional Na ⁺ excretion, %	0.22 ± 0.03	0.40 ± 0.06*
Fractional K ⁺ excretion, %	10.83 ± 1.68	12.68 ± 1.75
Fractional Cl ⁻ excretion, %	0.42 ± 0.04	0.87 ± 0.13*
Fractional Ca ²⁺ excretion, %	0.49 ± 0.05	0.86 ± 0.28
Na ⁺ /K ⁺ ratio	0.57 ± 0.12	0.78 ± 0.06

Table 1. Physiological steady state parameters, WT vs. Cav1^{-/-} mice. *p < 0.05.

	WT (n = 5)	Cav1 ^{-/-} (n = 6)
<i>Urinary analysis (mean ± SD)</i>		
Body weight, g	28.5 ± 0.7	29.2 ± 0.7
Urinary volume, g/g body weight	0.028 ± 0.003	0.041 ± 0.008
Na ⁺ excretion, mmol/kg *18 h	4.2 ± 1.1	5.9 ± 0.9
K ⁺ excretion, mmol/kg *18 h	7.2 ± 1.2	8.1 ± 1.0
Cl ⁻ excretion, mmol/kg *18 h	6.9 ± 1.1	8.0 ± 1.4
Ca ²⁺ excretion, mmol/kg *18 h	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.03
Creatinine, mg/dl	38.2 ± 1.7	30.3 ± 3.5
Creatinine, mg/g body weight	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Na ⁺ /creatinine ratio	45.1 ± 2.6	58.2 ± 6.4
K ⁺ /creatinine ratio	75.3 ± 6.6	81.2 ± 6.5
Cl ⁻ /creatinine ratio	72.7 ± 5.1	79.3 ± 12.7
Ca ²⁺ /creatinine ratio	0.72 ± 0.14	1.23 ± 0.24
Na ⁺ /K ⁺ ratio	0.63 ± 0.07	0.73 ± 0.07

Table 2. Physiological parameters of WT vs. Cav1^{-/-} mice upon water deprivation. *p < 0.05.

immunoreactive signal in vascular endothelia including interlobar arteries and vasa recta (+133% in interlobar arteries and +47% in vasa recta; Fig. 5b–g). We further evaluated the renal expression of alpha-adrenergic receptors by quantitative PCR and found a significant increase in Cav1^{-/-} compared to WT kidneys (+63%, p < 0.05; Fig. 5i) which may reflect a compensatory response to enhanced NO bioavailability. Together, these results point to an attenuated vasoconstriction along with increased endothelial NO bioavailability under Cav1^{-/-} deficiency.

Effects of CGL4-causing PTRF mutation in cell culture. Next, we utilized fibroblasts from patients with a CGL4-causing mutation of PTRF (CGL4-fibroblasts) to study effects of caveolar disruption on the cellular distribution of eNOS. To this end, CGL4- and wild type (WT) fibroblasts were transfected with eNOS. Ultrastructural analysis of plasma membrane fragments obtained by the rip/flip method¹⁸ and labeled for

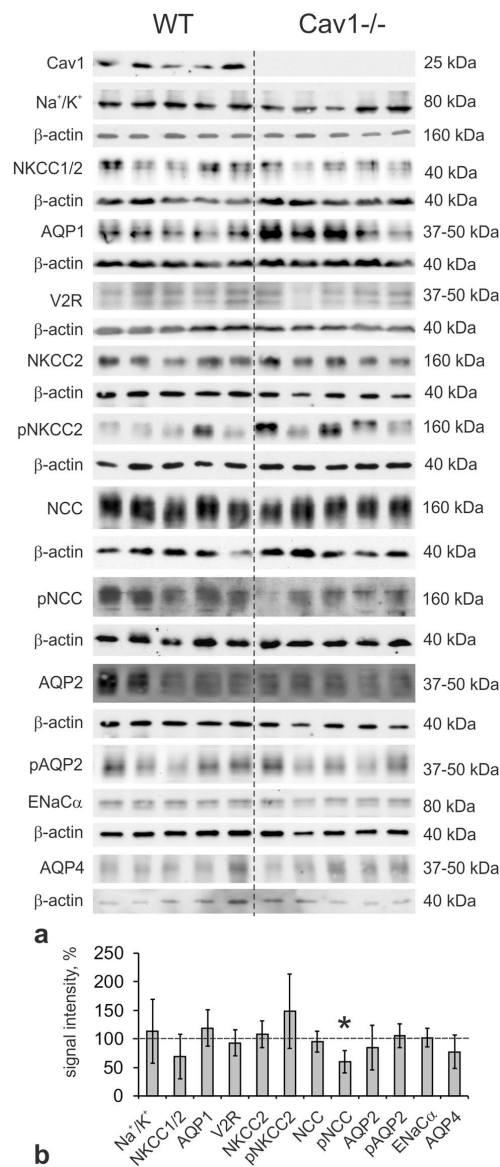


Figure 3. Effects of caveolin-1 deficiency on epithelial parameters by immunoblotting. **(a)** Representative immunoblots of WT (n = 6) and Cav1-deficient (Cav1^{-/-}; n = 6) kidney lysates detected by antibodies to Cav1, alpha subunit of Na/K-ATPase (Na⁺/K⁺), NKCC1/2 (antibody recognizes both NKCC isoforms), AQP1, V2R, NKCC2, phosphorylated (p) NKCC2 (pT96/T101-NKCC2), NCC, pNCC (pS71-NCC), AQP2, pAQP2 (pS256-AQP2), alpha subunit of epithelial sodium channel (ENaC α) and aquaporin 4 (AQP4); β -actin serves as loading control below the respective blots; all molecular weight levels are approximate. **(b)** Densitometric quantification of the immunoreactive signals normalized to the respective loading controls. Data is expressed as the mean \pm standard deviation; *p < 0.05 (Student's t test for normal distribution); original immunoblot scans are available in Supplementary Data.

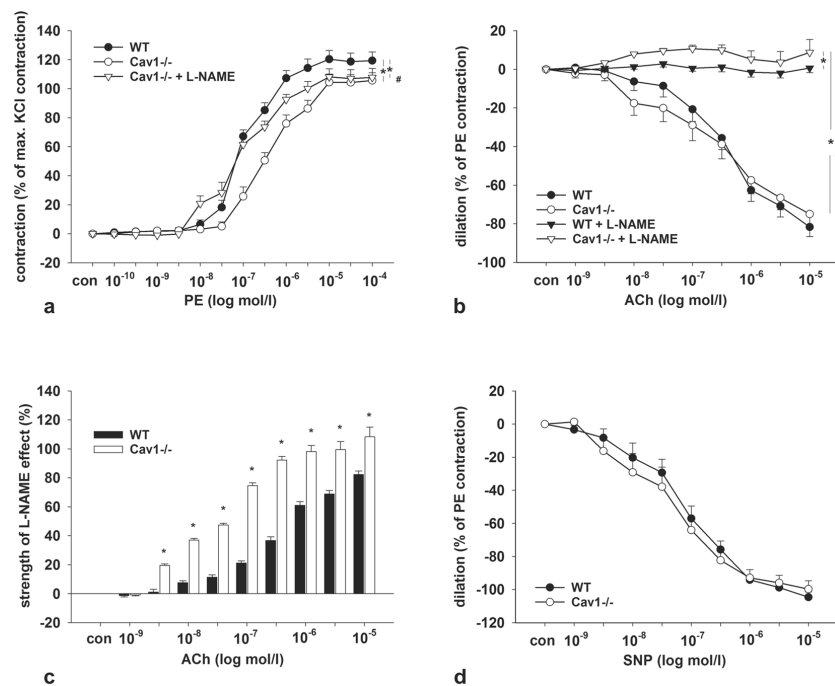


Figure 4. Effects of caveolin 1-deficiency on arterial contraction and relaxation. (a) Phenylephrine (PE) cumulative concentration response curves (10^{-10} to 10^{-4} mol/l) in WT ($n = 13$) and Cav1-deficient mice (Cav1 $^{-/-}$; $n = 12$) with and without L-NAME pretreatment ($n = 10$ and $n = 13$, respectively). (b) Acetylcholine (ACh, 10^{-9} to 10^{-5} mol/l) cumulative concentration response curves in WT ($n = 16$) and Cav1 $^{-/-}$ ($n = 14$) with and without L-NAME pretreatment ($n = 10$ and $n = 9$, respectively). (c) Effects of L-NAME pretreatment on the vascular tone during ACh application (calculated from data in Fig. 4b). (d) Sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9} to 10^{-40} mol/l) cumulative concentration response curves for WT ($n = 18$) and Cav1 $^{-/-}$ ($n = 15$). Data are expressed as the mean values \pm standard deviations, * $p < 0.05$. *Indicates significant differences between groups (ANOVA like Brunner Test for non-normal distribution), # Indicates significant differences between Cav1 $^{-/-}$ and Cav1 $^{-/-}$ + L-NAME. (ANOVA, Student's test for normal distribution and post hoc Mann Whitney test for independent groups).

Cav1 revealed abundant Cav1-positive domains in the plasma membrane of WT but not of CGL4-fibroblasts (Fig. 6a,b). This result therefore confirms that the CGL4-causing mutation of PTRF is associated with impaired formation of caveolae, as reported previously⁷. Transfecting the cells with GFP-tagged eNOS resulted in a substantial association of eNOS with plasma membrane in WT cells, whereas CGL4-cells showed predominantly intracellular accumulation of eNOS (Fig. 6c,d). Evaluation of NOS activity using the histochemical NADPH diaphorase reaction produced stronger signal in CGL4-fibroblasts as compared to control cells (Fig. 6e,f). This data suggests that depletion of caveolae enhances the cytoplasmic eNOS fraction, which probably facilitates NO biosynthesis¹⁹.

Discussion

The present results expand upon previous work on the renal distribution of Cav1 and caveolae and suggest that Cav1-deletion may affect renal performance at multiple levels. High-resolution immunohistochemistry revealed abundant Cav1 expression in the renal epithelia and vasculature. The epithelial Cav1 signal was restricted to the distal nephron epithelia comprising the late DCT and CNT/CD principal cells, which mediate reabsorption of divalent cations and participate in renal potassium handling^{20,21}. Previous evaluation of an alternative Cav1-knockout mouse line reported significant urinary calcium and potassium losses in Cav1-deficient mice, whereas in the present study only a trend towards enhanced urinary calcium and potassium excretion was observed upon Cav1 disruption^{12,13}. We believe that the lack of statistical significance for calcium and potassium values is due to relatively small sample sizes in our animal experiments (6 animals per group). The milder phenotype of Cav1-deletion in our study may also be related to inherent differences between the distinct knockout-strains^{5,12,13}. Steady state polyuria and urinary salt loss in our Cav1 $^{-/-}$ mice suggest that Cav1 may

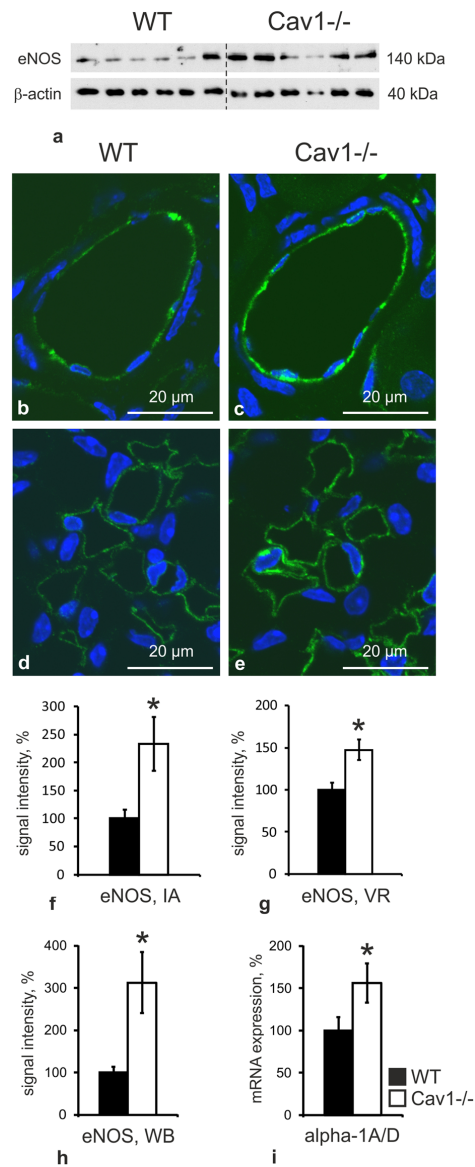


Figure 5. Effects of caveolin 1 deficiency on eNOS and alpha-1 adrenergic receptors. **(a)** Representative immunoblot of WT (n = 6) and Cav1-deficient (Cav1^{-/-}; n = 6) kidney lysates detected by antibodies to endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and β-actin as loading control; indicated molecular weights are approximate. **(b,c)** Representative confocal images of interlobar arteries showing increased endothelial eNOS signal (green) in Cav1^{-/-} (n = 4) compared to WT kidneys (n = 4). **(d,e)** Vasa recta also show an enhanced eNOS signal in Cav1^{-/-} kidney. Nuclei are counter-stained with DAPI (blue). **(f,g)** Quantification of confocal eNOS signals in interlobar arteries (IA) and vasa recta (VR) by intensity. **(h)** Densitometric quantification of eNOS immunoblots shown in A, normalized to loading controls. **(i)** Evaluation of alpha-1 adrenergic receptor mRNA expression in WT vs. Cav1^{-/-} kidneys using quantitative PCR. Data is expressed as the mean values ± standard deviations, *p < 0.05 (Student's t test for normal distribution); WB – Western blot, IF – immunofluorescence.

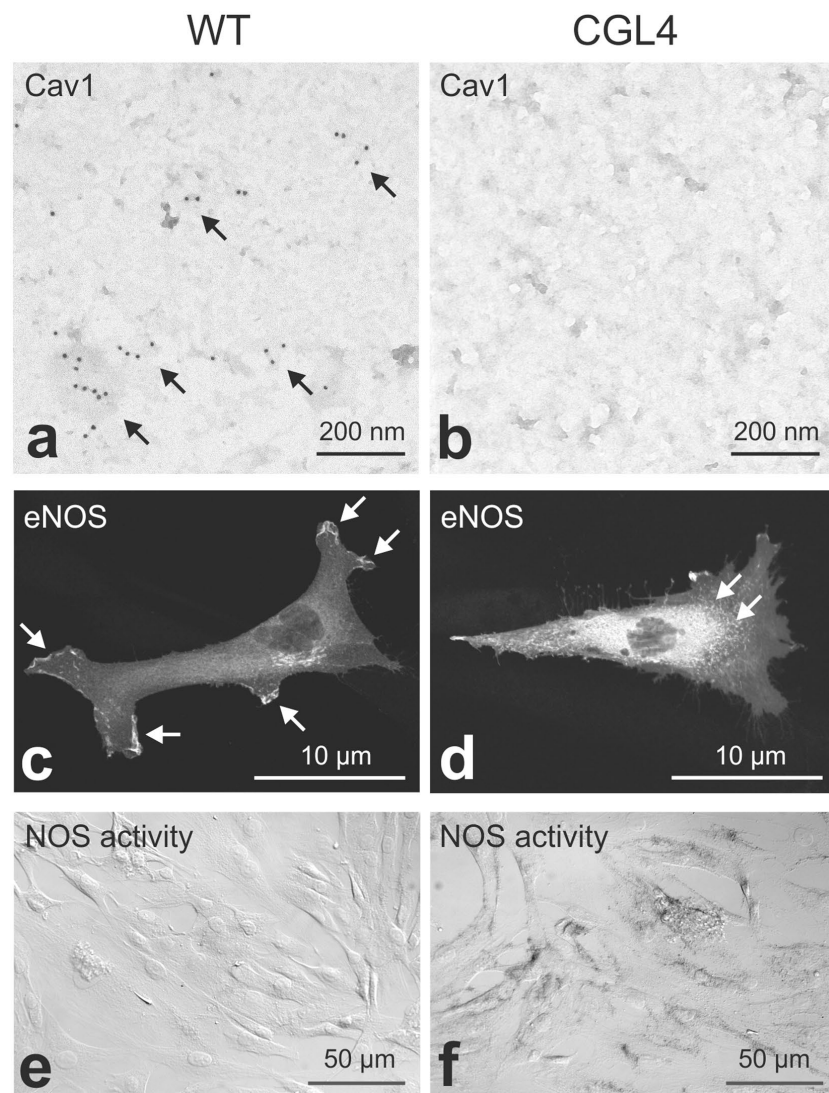


Figure 6. Cellular distribution of eNOS and NADPH diaphorase activity in WT vs. CGL4 fibroblasts. **(a,b)** Immunogold detection of Cav1 (**a**; 10 nm gold grains, arrows) in plasma membrane sheets obtained by rip/flip-technique. Note that in CGL4-fibroblasts, membrane is virtually devoid of a Cav1 signal (**B**); scale bars 100 nm. **(c,d)** Cellular distribution of transfected eNOS with a membrane-bound signal in WT (**c**, arrows) as opposed to the more perinuclear signal in CGL4-fibroblasts (**d**, arrows); scale bars 10 μ m. **(e,f)** Enhanced NADPH-diaphorase activity in CGL4-fibroblasts (**f**) suggests enhanced NOS activity in Cav1 deficiency; representative results of three independent experiments.

further be involved in the renal reabsorption of salt and water. Analysis Na^+/K^+ -ATPase, which can be functionally modulated by Cav1², revealed its unchanged renal abundance and further relevant salt and water transport proteins of the proximal and distal nephron showed no major quantitative alterations upon Cav1-disruption, except for a moderate reduction of phosphorylated NCC. Since the analyzed phosphorylation site (S71) is essential for NCC activation, this result may, at least in part, account for the urinary sodium loss¹⁵. Mechanistic molecular links between basolateral Cav1 and apical NCC are elusive, especially in view of their co-expression only in

the relatively short late DCT portion. However, due to association of Cav1 with calcium reabsorption in the distal nephron, its deficiency may trigger local or systemic compensatory mechanisms suppressing NCC in favor of more efficient calcium reabsorption, as observed with pharmacologic inhibition of the transporter by thiazides or during action of the parathyroid hormone^{23,24}. Apart from NCC, functional effects of Cav1-deficiency on transporters and channels of principal CNT/CD cells deserve more precise characterization in future studies. The present analyses did not reveal changes in ENaC α abundance upon Cav1 disruption and the urinary Na⁺/K⁺ ratio was not significantly changed, which suggested preserved ENaC function. However, in view of reported functional changes of basolateral potassium transport along the distal nephron of Cav1^{-/-} mice¹³, the Na⁺/K⁺ ratio alone is insufficient for robust assessment of ENaC function. Therefore, functional evaluation of ENaC activity in the future would be helpful to clarify this issue. Interestingly, water deprivation for 18 h abolished differences in urinary electrolyte excretion between WT and Cav1^{-/-} mice suggesting that Cav1-deficiency can be efficiently compensated upon challenge. Water deprivation elicits increases of endogenous vasopressin (AVP) levels thereby promoting salt and water reabsorption via activation of V2R along the distal nephron and in principal CD cells^{17,25,26}. Since V2R expression was not altered in Cav1^{-/-} mice, increased AVP levels upon water deprivation with resulting V2R-dependent stimulation of distal transporters and channels may contribute to compensation of Cav1-deficiency along with V1a receptor-induced vasoconstriction²⁷. Moreover, AVP has been shown to interfere with both epithelial and vascular NO systems²⁷⁻²⁹.

Vascular effects of Cav1-deficiency were assessed in isolated renal arteries. Cav1-disruption was associated with reduction of their contractile response to the α_1 -agonist PE, unchanged relaxation after ACh application, but stronger effect of L-NAME on vascular tone during ACh application. When assuming an increased NO bioavailability in Cav1^{-/-} animals, a stronger effect of ACh, which seems to act predominantly via NO release in these arteries, should be expected. However, WT and Cav1^{-/-} vessel presented similar and powerful responses to cumulatively increasing concentrations of ACh. This data is in contrast to the markedly stronger relaxation to ACh-bolus application reported in Cav1-deficient arteries of the same knockout strain⁵. This discrepancy may be related to different types of protocols (bolus vs. cumulative application) as well as the varying types of the arteries being studied in the present vs. previous work. The reduced sensitivity to PE supports the idea of an activated NO system in Cav1^{-/-} mice, although preserved or even enhanced contractile response to α_1 -receptor agonists have been previously reported in mesenteric arteries and aorta upon Cav1 or PTRF disruption, respectively^{5,30}. Physical and functional association of caveolae with adrenergic receptor subtypes was described in cardiac myocytes³¹⁻³³. However, disruption of caveolae in isolated rat tail arteries using cholesterol depletion did not affect their contractile response to adrenergic stimulation³⁴. Therefore, the role of caveolae in mediating adrenergic stimulation remains to be clarified. Our present data showing reduced PE-induced contractility in Cav1-deficient renal arteries may reflect increased NO bioavailability with resulting attenuation of vasoconstriction, rather than direct inhibition of the adrenergic system by caveolae disruption. In this light, increased expression of α_1 -adrenergic receptors in Cav1^{-/-} kidneys observed in the present study may reflect a compensatory reaction serving to balance enhanced NO bioavailability, although their abundance at the protein level in renal vessels still needs to be studied. Compensatory mechanisms related with increased NO bioavailability would also help to explain the moderately higher contractile tone of Cav1^{-/-} arteries upon pretreatment with L-NAME in experiments testing endothelium-dependent relaxation using ACh.

Inhibitory effects of caveolae or Cav1 on the activity of NOS isoforms have been reported in a number of previous studies³⁵⁻³⁹. With respect to the kidney, an association between Cav1 and eNOS has been proposed to play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy^{40,41}. Nitric oxide derived from eNOS has further been shown to promote diuresis through vascular and epithelial effects in the kidney²⁹. Cav1 disruption may therefore increase NO bioavailability, which in turn may contribute to the observed polyuria in the Cav1^{-/-} mice. The increased abundance of eNOS in Cav1^{-/-} kidneys and reduced contractility of Cav1^{-/-} interlobular arteries observed in this study provide indirect evidence for enhanced NO release upon Cav1 disruption. This would also agree with the reported increase of NO release in Cav1-deficient aorta⁵. The underlying mechanisms may include direct inhibition of eNOS activity by the protein network of caveolae as well as enhanced internalization and degradation of eNOS via interactions with its trafficking factor NOSTRIN and Cav1 directing the enzyme to caveosomes^{36,42}. Regulation of eNOS activity appears to be closely linked to its cellular distribution^{42,43}. Activating Golgi-associated eNOS requires protein kinase B, whereas plasma membrane-associated eNOS responds to changes in calcium-dependent signaling^{43,44}. Cytosolic localization of eNOS has been associated with its activation^{45,46}. To extend information on caveolae-dependent eNOS regulation we have studied the cellular distribution of transfected eNOS in human fibroblasts carrying CGL4-causing PTRF mutation⁷. The resulting depletion of caveolae was associated with perinuclear accumulation and reduced targeting of eNOS to the plasma membrane which, we assumed, would indicate changes in its activity^{43,45}. Indeed, indirect evaluation of NOS activity using histochemical NADPH diaphorase staining demonstrated enhanced endogenous NOS activity in the caveolae-deficient CGL4-fibroblasts. This data further corroborates the role of caveolae in the regulation of eNOS activity and is in line with other results of our study, documenting increased eNOS function in Cav1-deficient kidneys.

Increased vascular NO production may have paracrine effects on adjacent transporting epithelia, primarily in the medulla^{47,48}. Increased bioavailability of NO has been reported to attenuate salt reabsorption along the distal nephron chiefly due to inhibition of NKCC2 activity^{29,49}. However, NKCC2 abundance and phosphorylation were not reduced in Cav1^{-/-} kidneys. Therefore, changes in local NO production in Cav1^{-/-} renal vessels were likely not strong enough to induce significant paracrine effects on renal epithelia.

Caveolae have also been implicated in the regulation of detrusor contractility, which may have effects on urine flow^{50,51}. However, manifestation of impaired detrusor function was evident only in old mice lacking Cav1 (1-year-old), whereas young mice (up to 3-month-old) did not show significant changes⁵¹. Therefore, alterations of urinary bladder function in the mice used in the present study are unlikely.

In summary, our study demonstrates that renal caveolae, which depend on Cav1 expression, are involved in the control of salt and water reabsorption. Absence of renal caveolae is associated with moderate salt loss and enhanced urine flow. In the tubular compartment, a decrease in activating NCC phosphorylation upon Cav1-deletion may explain diminished electrolyte reabsorption. In the vascular compartment, lack of caveolae is associated with disinhibition of eNOS, resulting in increased NO bioavailability and decreased vascular contractility, which aligns with impaired volume conservation. Since caveolins and caveolae have been recognized as potential targets for pharmaceutical interventions⁵², our data may have clinical implications.

Methods

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations, such as standards of Good Scientific Practice and permissions of local authorities where applicable.

Animal experiments. Generation of Cav1-deficient mice has been described previously⁹. All animal experiments were approved by the Regional Office for Health and Social Affairs Berlin (LAGESO permission: G0220/12). For physiological evaluation of baseline kidney performance 10–14 weeks old male wild type (WT; n = 6) and Cav1^{-/-} mice (n = 6) were kept in metabolic cages for 24 h at chow and water ad libitum to collect urine samples. After the metabolic cages blood and kidneys were collected under ketamine/xylazine-anaesthesia and mice were sacrificed by cervical dislocation. A parallel cohort of mice (5 WT and 6 Cav1^{-/-} mice) was subjected to water deprivation for 18 h at chow ad libitum and urine samples were collected in metabolic cages. Plasma and urinary electrolytes were measured by routine automatic photometric methods (Cobas 8000, Roche Diagnostics) and fractional excretion of electrolytes was calculated [for example $FE_{Na} = 100 \times (Na_{urinary} \times Crea_{plasma}) / (Na_{plasma} \times Crea_{urinary})$]; kidneys were removed and processed for biochemical analysis. For morphological evaluation WT (n = 4) and Cav1^{-/-} mice (n = 4) were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (100 mg/kg body weight) and kidneys were fixed by retrograde perfusion with 3% paraformaldehyde/PBS via the abdominal aorta, removed, and processed for cryo-sectioning, paraffin-embedding, and LR White-embedding.

Evaluation of vascular contraction and relaxation. 16–20 weeks old male WT (n = 18) and Cav1^{-/-} mice (n = 16) were sacrificed by cervical dislocation after short anaesthesia using isoflurane, kidneys were removed and placed in ice-cold Krebs-Henseleit physiological solution (KHS; 118.6 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25.1 mM NaHCO₃, 11.1 mM glucose and 0.02 mM EDTA)⁵³. Up to four renal interlobar arteries were obtained per animal for different treatment protocols and mounted on a 40 μm stainless steel wire in a small vessel myograph (model 500 A; DMT, Aarhus Denmark) at 95% O₂/5% CO₂ gas mixture and 37 °C. Arterial force was recorded using a Powerlab 4/25 T data-acquisition system (ADInstruments, Castle Hill, New South Wales, Australia). The resting tension was set according to Mulvany's normalization procedure⁵⁴. The diameter was set to 80% of that calculated for a transmural tension of 100 mmHg. The procedure was performed without using relaxing substances. Maximal contraction of arterial vessels was induced by 100 mM KCl prior to each experiment and the obtained values were used as a standard for comparative evaluation of other vasoconstrictors. Concentration response curves (CRCs) for renal interlobar arteries were obtained by adding of cumulative doses of phenylephrine (10^{-10} – 3.10^{-7} M) to the bath solution. To obtain relaxation responses, vessels were pre-contracted to 50% of the maximum, KCl-induced contraction using phenylephrine at an appropriate concentration. The endothelium-dependent relaxation was evaluated by means of CRC to acetylcholine (ACh; 10^{-9} – 10^{-6} M) applied on top of phenylephrine. To assess the role of NO in the vascular tone, arteries were pretreated with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 10^{-4} M for 15 min before measuring the ACh concentration response curves during precontraction with phenylephrine. The endothelium-independent relaxation was investigated by CRC to sodium nitroprusside (SNP; 10^{-9} – 10^{-4} M) on top of phenylephrine.

Cell culture. CGL4-fibroblasts were derived from a patient with CGL4 and control wild type fibroblasts were obtained from diagnostic samples for numeric chromosomal aberrations that showed no pathology⁷. For immunoblotting, fibroblasts were grown to confluence in DMEM in the presence of 15% FCS and penicillin/streptomycin on petri-dishes, washed with PBS, and harvested by mechanical scrapping in homogenization buffer (250 mM sucrose, 10 mM triethylamine and protease inhibitor [Complete; Roche, Mannheim, Germany]). Overexpression of eNOS in CGL4- and WT fibroblasts was induced by transient transfection of pcDNA3 plasmid containing GFP-tagged eNOS (Plasmid #22444; Addgene, Cambridge, MA) using JetPEI transfection reagent (Polyplus, Illkirch, France). After transfection, cells were incubated for 48 hours at 37 °C. For immunofluorescence, cells were grown on uncoated cover slips, washed with PBS, fixed in 4% PFA, and evaluated by confocal microscopy.

Antibodies. The following primary antibodies were applied for immunofluorescence, immunohistochemistry, or immunoblotting: anti-AQP1 (Alpha diagnostic international, San Antonio, Texas, USA), anti-AQP2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-phospho-aquaporin 2 (pS256)⁵⁵, anti-β-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), anti-Cav1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-NKCC1 (T4; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), anti-vasopressin V2 receptor⁵⁶, anti-eNOS (Santa Cruz Biotechnology), anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Millipore, Darmstadt, Germany), anti-NCC, anti-NKCC2, anti-phospho-NKCC2 (pT96/pT101), and anti-phospho-NCC (pS71)⁵⁷.

Immunofluorescence and immunohistochemistry. Paraffin-embedded kidney sections were dewaxed and boiled in citrate puffer (pH = 6) for 6 min to perform antigen retrieval. Cryo-sections and coverslips with

fixed cultured cells were incubated in 0.5% Triton X-100 during 30 min for antigen retrieval. After a washing in PBS, kidney sections or cultured cells were incubated with 5% skim milk in PBS to block unspecific protein interactions and respective primary antibodies were applied for 1 h at room temperature followed by overnight incubation at +4°C. By double-labelling the primary antibodies were applied consecutively, separated by a washing step. Signals were generated using fluorescent Cy2- or Cy3-conjugated (Dianova, Hamburg, Germany) or HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and evaluated using an LSM 5 Exciter confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH) equipped with 40×/63× EC Plan-NEOFLUAR oil-immersion objectives (N.A. 1.3/1.4). Filters for Excitation/Emission were set to 488/BP 505-550 for Cy2 and 543/BP 560-615 for Cy3 (BP = bandpass). Evaluation of confocal eNOS signal intensities in renal vessels conducted in kidney sections of WT and Cav1^{-/-} mice (n = 3 in each group, at least 10 vascular profiles per animal) using ImageJ software. Background values obtained over the nuclei served as threshold and were subtracted from the respective signal levels.

Immunoelectron microscopy of plasma membrane sheets. Plasma membrane sheets for electron microscopic analysis were prepared. Briefly, CGL4- and WT fibroblasts were grown to confluence on glass coverslips, fixed for 15 min in 0.5% paraformaldehyde/PBS, washed in PBS, and subsequently inverted on glow-discharged nickel electron microscopy grids coated with poly-L-lysine. Adherence of plasma membranes to the grid surface was forced by applying a gentle pressure to the coverslip for 15 s using a fine pair of forceps. The coverslips were then lifted leaving portions of the upper cell surface adherent to the poly-L-lysine-coated grid obtained as previously described^{18,58}. The grids with adherent membrane fragments were then transferred to buffered 2% paraformaldehyde fixative solution for 20 min at room temperature and labeled with anti-Cav1 primary antibody and 10-nm gold-conjugated secondary antibody (Abcam). Grids were then fixed in 2% glutaraldehyde in PBS, contrasted with 1% aqueous tannic acid and 1% aqueous uranyl acetate, washed with distilled H₂O, and examined by transmission electron microscopy (Zeiss E905).

Ultrastructural analysis. For ultrastructural analysis of renal morphology perfusion-fixed WT and Cav1^{-/-} kidney were subjected to additional fixation in 0.5% glutaraldehyde/PBS overnight at +4°C, processed for embedding using Epoxy Embedding Medium kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and analyzed by transmission electron microscopy (Zeiss E905 or Technai™ G2). Cellular distribution of Cav1 was analyzed by the pre-embedding technique. To this end, 30 μm thick cryostat sections from WT and Cav1^{-/-} mice were treated with 0.5% Triton X-100 for 30 min, blocked with 5% skim milk in PBS for 30 min, and incubated with anti-Cav1 antibody for 1 h at room temperature followed by overnight incubation at +4°C. The corresponding HRP-conjugated secondary antibody was used for signal generation and the sections were processed for embedding in LR White resin, cut, and analyzed by transmission electron microscopy.

Immunoblotting. Kidneys and cultured cells were homogenized mechanically in buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM triethylamine and protease inhibitor (Complete, Roche, Mannheim, Germany) followed by short sonication on ice. Nuclei were removed by centrifugation at 1000xg for 10 minutes at 4°C and the supernatants separated by polyacrylamide gel electrophoresis (50 μg protein/lane as determined by a BCA protein assay reagent kit [Pierce]; 8 to 10% gel). After electrophoretic transfer to polyvinylidene fluoride membranes, blocking was performed using 5% BSA/PBS or 5% milk/PBS and membranes were incubated with respective primary antibodies for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C and subsequent exposure to HRP-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence, exposed to X-ray films, and the signals evaluated densitometrically. All data was normalized for expression of the housekeeping gene β-actin detected by monoclonal mouse anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

NADPH-diaphorase activity assay. For histochemical demonstration of nitric oxide synthase (NOS) tissue activity, the NADPH-diaphorase reaction was performed as described⁵⁹. Briefly, 5 μm cryostat sections were incubated in 0.1 phosphate buffer containing nitro blue tetrazolium (NBT), b-NADPH, and Triton X-100. The optimal exposure time was set at 25 min at 37°C. The reaction was stopped by rinsing the coverslips in PBS and the coverslips evaluated using a Leica DMRB microscope equipped with a SPOT 32 camera and MetaView 3.6a software (Diagnostic Instruments; Universal Imaging).

mRNA Extraction, cDNA Synthesis and Quantitative PCR analysis. RNA from tissue or cell lysates was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized by reverse transcription (BioScript, Bioline, Luckenwalde, Germany) and quantitative PCR was performed using HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) and specific primers for alpha 1 A/D receptor (forward primer: 5'-CTG CCA TTC CTC GTG AT-3'; reverse primer: 5'-GGC TGG AGC ATG GGT ATA TG-3') or GAPDH in the Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). All samples were analysed in triplicate. Quantification and normalization of the threshold cycle (C_t) was performed against GAPDH (ΔC_t) with subtraction of the calibrator (ΔΔC_t) and the relative quantification (comparative C_t method) was performed by exponentiation, calculated using 2 to the power of ΔΔC_t as described⁶⁰.

Analysis of data. All results are expressed as the mean ± SD. Data was analysed for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and Q-Q plot (RStudio, version 1.0.143) or ANOVA. Unpaired 2-tailed *t* tests were used to compare two groups for immunohistochemical and immunoblot analysis. Statistical analysis of EC₅₀ was

performed by using an unpaired Mann-Whitney-Test and the courses of the concentration response curves were tested by applying an ANOVA like test for repeated measurements in non-normal distributed data (Brunner-test). The program is available: The R-project, <http://www.r-project.org/>. A *P*-value less than 0.05 was considered significant.

References

- Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225 (1998).
- Lajoie, P. & Nabi, I. R. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **282**, 135–163 (2010).
- Sinha, B. *et al.* Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* **144**, 402–413 (2011).
- Fridolfsson, H. N., Roth, D. M., Insel, P. A. & Patel, H. H. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 3823–3831 (2014).
- Drab, M. *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**, 2449–2452 (2001).
- Razani, B. *et al.* Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* **276**, 38121–38138 (2001).
- Rajab, A. *et al.* Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS Genet.* **6**, e1000874 (2010).
- Liu, L. *et al.* Deletion of Cavin/PTRF Causes Global Loss of Caveolae, Dyslipidemia, and Glucose Intolerance. *Cell Metab.* **8**, 310–317 (2008).
- Le Lay, S. & Kurzchalia, T. V. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 322–333 (2005).
- Thompson, M. A., Prakash, Y. S. & Pabelick, C. M. The role of caveolae in the pathophysiology of lung diseases. *Expert Rev. Respir. Med.* **8**, 111–122 (2014).
- Breton, S., Lisanti, M. P., Tyszkowski, R., McLaughlin, M. & Brown, D. Basolateral distribution of caveolin-1 in the kidney. Absence from H⁺-ATPase-coated endocytic vesicles in intercalated cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **46**, 205–214 (1998).
- Cao, G. *et al.* Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am. J. Pathol.* **162**, 1241–1248 (2003).
- Wang, L., Zhang, C., Su, X., Lin, D.-H. & Wang, W. Caveolin-1 Deficiency Inhibits the Basolateral K⁺ Channels in the Distal Convoluted Tubule and Impairs Renal K⁺ and Mg²⁺ Transport. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* <https://doi.org/10.1681/ASN.2014070658> (2015).
- Păunescu, T. G. *et al.* Vasopressin induces apical expression of caveolin in rat kidney collecting duct principal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F1783–F1795 (2013).
- Gamba, G. Regulation of the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter by phosphorylation and ubiquitylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1573–F1583 (2012).
- Borschewski, A. *et al.* Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **27**, 107–119 (2016).
- Rieg, T. *et al.* Adenylate cyclase 6 determines cAMP formation and aquaporin-2 phosphorylation and trafficking in inner medulla. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 2059–2068 (2010).
- Wilson, B. S. *et al.* Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2580–2592 (2004).
- Shaul, P. W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 749–774 (2002).
- Dimke, H., Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family. *J. Physiol.* **589**, 1535–1542 (2011).
- Terker, A. S. *et al.* Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride. *Cell Metab.* **21**, 39–50 (2015).
- Quintas, L. E. M. *et al.* Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 525–531 (2010).
- Gesek, F. A. & Friedman, P. A. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* **90**, 429–438 (1992).
- Hoover, R. S., Tomilin, V., Hanson, L., Pochynyuk, O. & Ko, B. PTH modulation of NCC activity regulates TRPV5 Ca²⁺ reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **310**, F144–F151 (2016).
- Mutig, K. *et al.* Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **293**, F1166–F1177 (2007).
- Pedersen, N. B., Hofmeister, M. V., Rosenbaek, L. L., Nielsen, J. & Fenton, R. A. Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule. *Kidney Int.* **78**, 160–169 (2010).
- Barthelmebs, M., Krieger, J. P., Grima, M., Nisato, D. & Imbs, J. L. Vascular effects of [Arg8]vasopressin in the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* **314**, 325–332 (1996).
- Garcia, N. H., Pomposiello, S. I. & Garvin, J. L. Nitric oxide inhibits ADH-stimulated osmotic water permeability in cortical collecting ducts. *Am. J. Physiol.* **270**, F206–F210 (1996).
- Perez-Rojas, J. M., Kassem, K. M., Beierwaltes, W. H., Garvin, J. L. & Herrera, M. Nitric oxide produced by endothelial nitric oxide synthase promotes diuresis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1050–R1055 (2010).
- Swärd, K., Albinsson, S. & Rippe, C. Arterial dysfunction but maintained systemic blood pressure in cavin-1-deficient mice. *PLoS One* **9**, e92428 (2014).
- Fujita, T. *et al.* Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **51**, 709–716 (2001).
- Morris, J. B., Huynh, H., Vasilevski, O. & Woodcock, E. A. Alpha1-adrenergic receptor signaling is localized to caveolae in neonatal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 17–25 (2006).
- Xiang, Y., Rybin, V. O., Steinberg, S. F. & Kobilka, B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 34280–34286 (2002).
- Dreja, K. *et al.* Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1267–1272 (2002).
- García-Cardena, G. *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 25437–25440 (1997).
- Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. & Venema, R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18522–18525 (1997).
- Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. & Michel, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* **272**, 15583–15586 (1997).
- Sato, Y., Sagami, I. & Shimizu, T. Identification of caveolin-1-interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase. Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *J. Biol. Chem.* **279**, 8827–8836 (2004).

39. Chen, Z. *et al.* Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1388–1398 (2012).
40. Komers, R. *et al.* Altered endothelial nitric oxide synthase targeting and conformation and caveolin-1 expression in the diabetic kidney. *Diabetes* **55**, 1651–1659 (2006).
41. Arya, A., Yadav, H. N. & Sharma, P. L. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **354**, 57–66 (2011).
42. Schilling, K. *et al.* Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3870–3880 (2006).
43. Fulton, D. *et al.* Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release. *J. Biol. Chem.* **279**, 30349–30357 (2004).
44. Rizzo, V., McIntosh, D. P., Oh, P. & Schnitzer, J. E. *In situ* flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J. Biol. Chem.* **273**, 34724–34729 (1998).
45. Sánchez, F. A. *et al.* Functional significance of cytosolic endothelial nitric-oxide synthase (eNOS): regulation of hyperpermeability. *J. Biol. Chem.* **286**, 30409–30414 (2011).
46. Sánchez, F. A. *et al.* Functional significance of differential eNOS translocation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1058–1064 (2006).
47. Garvin, J. L., Herrera, M. & Ortiz, P. A. Regulation of renal NaCl transport by nitric oxide, endothelin, and ATP: clinical implications. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 359–376 (2011).
48. Turban, S., Wang, X.-Y. & Knepper, M. A. Regulation of NHE3, NKCC2, and NCC abundance in kidney during aldosterone escape phenomenon: role of NO. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**, F843–851 (2003).
49. García, N. H., Plato, C. F., Stoops, B. A. & Garvin, J. L. Nitric oxide-induced inhibition of transport by thick ascending limbs from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **34**, 508–513 (1999).
50. Karbalaei, M. S. *et al.* Impaired contractility and detrusor hypertrophy in cavin-1-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **689**, 179–185 (2012).
51. Lai, H. H., Boone, T. B., Thompson, T. C., Smith, C. P. & Somogyi, G. T. Using caveolin-1 knockout mouse to study impaired detrusor contractility and disrupted muscarinic activity in the aging bladder. *Urology* **69**, 407–411 (2007).
52. Patel, H. H., Murray, F. & Insel, P. A. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 359–391 (2008).
53. Viegas, V. U. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor mediates sex differences in mice renal interlobar arteries response to angiotensin II. *J. Hypertens.* **30**, 1791–1798 (2012).
54. Mulvany, M. J. & Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* **41**, 19–26 (1977).
55. Trimpert, C., van den Berg, D. T. M., Fenton, R. A., Klusmann, E. & Deen, P. M. T. Vasopressin increases S261 phosphorylation in AQP2-P262L, a mutant in recessive nephrogenic diabetes insipidus. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **27**, 4389–4397 (2012).
56. Mutig, K. *et al.* Demonstration of the functional impact of vasopressin signaling in the thick ascending limb by a targeted transgenic rat approach. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **311**, F411–423 (2016).
57. Saritas, T. *et al.* SPAK differentially mediates vasopressin effects on sodium cotransporters. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 407–418 (2013).
58. Dathe, C. *et al.* Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 9983–9997 (2014).
59. Bosse, H. M., Böhm, R., Resch, S. & Bachmann, S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am. J. Physiol.* **269**, F793–805 (1995).
60. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(ΔΔC_T)} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge expert technical assistance by Kerstin Riskowsky, John Horn, and Frauke Grams. We further wish to thank Timur Kurzchalia (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany) for providing us with caveolin-deficient mice and Mauricio Sendeski (Dept. of Physiology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany) for help in the physiological experiments, and Martin Thomson for editing the manuscript. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG BA700/22-1 and MU2924/2-1) for financial support.

Author Contributions

Y.W. and A.B. conducted the most experiments and analyzed the results, A.P. and T.N. performed the physiological studies and analyzed the results, C.D. and A.L.D. conducted ultrastructural studies, M.S. contributed to the results interpretation, S.B. wrote the paper, and K.M. designed the study, analyzed the results, and wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19071-6>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

6. Lebenslauf

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

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

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

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

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

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

7. Publikationsliste

- Willière Y, Nikitina T, Patzak A, Sendeski M, Bachmann S, Mutig K: Renal Effects of Caveolin-1 Deletion [Abstract] J Am Soc Nephrol 24, 2013:539A-540A 11/2013
- Willière Y*, Schindler H*, Saliba I*, Lebarrois H*, Hartig A*, Aspioti M* ¿Option Migration? Europas Jugend auf der Suche nach Perspektiven, Projekt Europa 2012/13., Hrsg. Studienkolleg-zu-Berlin, ISBN: 978-3-00-043349-8 01/2014
- Willière Y*, Borschewski A*, Patzak A, Nikitina T, Dittmayer C, Daigeler AL, Schuelke M, Bachmann S, Mutig K, Caveolin 1 promotes renal water and salt reabsorption 01/2018

Kongressbeiträge

- **Poster** 10/2012
Thema: Epitheliale Effekte der Caveolin-1 Deletion in der Niere
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg
- **Poster** 10/2013
Thema: Renale Effekte der Caveolin-1 Deletion
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin
- **Poster** 11/2013
Thema: Renal Effects of Caveolin-1 Deletion
Kidney Week 2013, American Society of Nephrology,
Atlanta, GA (USA)

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich bei Herrn Prof. Dr. S. Bachmann für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Promotionsarbeit in seinem Labor durchführen konnte und die damit verbundene Vergabe der interessanten Aufgabenstellung, der Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Darüberhinaus gilt ein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. K. Mutig für die Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführungen der Experimente, dem Schreiben unserer gemeinsamen Publikation und des Manuskripts.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts für Vegetative Anatomie, welche mich auf meinem Weg begleitet haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. A. Borschewski für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Weiterhin gilt mein Dank Frauke Grams, Kerstin Riskowski, Elisabeth Schindler, Petra Schrade und John Horn für die freundliche und exzellente technische Unterstützung im Labor. Daneben danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. A. Patzak für die Kooperation bei der Publikation.

Zu guter Letzt geht ein besonderer Dank an meine Frau, welche mich zu jeder Zeit bei der Umsetzung der Arbeit unterstützt und motiviert hat sowie an meine Familie.