

**Untersuchung der Bedeutung des Vasopressin-2-Rezeptor (V2R) *Signaling* für die
Morphologie und Funktion der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tordis Ida Borowski
aus Berlin
2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Vegetative Anatomie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Sebastian Bachmann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bachmann
 2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig
- Disputation am: 24.04.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Funktionen der Niere	8
1.2 Makroskopischer Aufbau der Niere	8
1.3 Organisation des Nephrons und Aufbau des TAL	9
1.4 Transportmechanismen des TAL	10
1.5 Beteiligung des TAL an der Harnkonzentrierung	11
1.6 Rolle des V2R im Nephron	13
1.6.1 Struktur des V2R	13
1.6.2 Alternative <i>Splice</i> -Varianten des V2R	13
1.6.3 Funktion von V2R im Sammelrohr.....	14
1.6.4 Funktion des V2R im TAL.....	16
1.7 NDI	16
1.8 Transgene Tiere	17
1.9 Ziel dieser Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratten	19
2.2.1 Genotypisierung	21
2.2.2 Präparation der cDNA	21
2.2.3 PCR	21
2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese	22
2.3 Wasserbilanz und Durstversuch	22
2.4 Präparation der Nierenhomogenate	22
2.5 Proteinbestimmung	23
2.6 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) und Western blot	23
2.6.1 Anfertigung der PA-Gele und Vorbereitung der Proben	23
2.6.2 <i>Western blot</i>	24
2.7 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung	25
2.8 Immunhistochemie	26
2.9 <i>In situ</i>-Hybridisierung	26
2.9.1 Präparation der cDNA	26
2.9.2 <i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Riboproben	27
2.9.3 Hybridisierung DIG-markierter Riboproben	27
2.9.4 Waschschrte zur Entfernung nicht hybridisierter Riboproben.....	28

Inhaltsverzeichnis

2.9.5	Detektion der hybridisierten Riboproben	28
2.10	Quantitative PCR (qPCR)	29
2.11	Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen rV2R.....	30
2.12	Transfektion von TAL-Zellen	30
2.13	Statistische Datenanalyse	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1	Generierung und Verifizierung eines polyklonalen Antikörpers gegen V2R.....	32
3.1.1	Generierung des polyklonalen anti-V2R-Antikörpers	32
3.1.2	Verifizierung des anti-V2R-Antikörpers	33
3.2	Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratte	35
3.2.1	Strategie	35
3.2.2	Verifizierung des transgenen Ni3-V2R Konstrukts	36
3.2.3	Verifizierung der nierenspezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts mittels PCR	36
3.2.4	Verifizierung der TAL-spezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	37
3.3	Verifizierung der V2RS-Überexpression im Ni3-V2R Rattenmodell.....	38
3.3.1	<i>Western blot</i> -Ergebnisse	38
3.3.2	Immunhistochemische Nachweise	39
3.4	Physiologische Untersuchungen des transgenen Rattenmodells	40
3.4.1	Kontrollzustand	40
3.4.2	Durstversuch	41
3.5	Expression der Ionentransporter	43
3.5.1	mRNA-Transkriptionsraten in TaqMan® qPCR.....	43
3.5.2	<i>Western blot</i> -Ergebnisse	44
3.6	Charakterisierung der THP- und EGF-mRNA-Expression in Ni3-V2R Ratten mittels <i>in situ</i>-Hybridisierung	46
3.7	Morphologische Charakterisierung der Ni3-V2R Rattenniere	46
4.	Diskussion.....	48
4.1	Generierung und Verifizierung eines polyklonalen Antikörpers gegen V2R.....	48
4.1.1	Generierung des polyklonalen Ni3-V2R Antikörpers	48
4.1.2	Verifizierung des generierten anti-V2R-Antikörpers	48
4.2	Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratte	49
4.2.1	Strategie und Verifizierung des Ni3-V2R Konstrukts	49
4.2.2	Verifizierung der nierenspezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts	51
4.3	Verifizierung der V2RS-Überexpression im Ni3-V2R Rattenmodell.....	51
4.4	Physiologische Untersuchungen des transgenen Rattenmodells	52

Inhaltsverzeichnis

4.5	Expression der Ionentransporter	53
4.6	Charakterisierung der THP- und EGF-mRNA-Expression mittels <i>in situ</i>- Hybridisierung	55
4.7	Morphologische Charakterisierung der Ni3-V2R Rattenniere	56
5.	Zusammenfassung	57
6.	Abstract	58
7.	Literaturverzeichnis	59
8.	Lebenslauf	63
9.	Verzeichnis der erfolgten Publikationen	64
	Erklärung	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
AQP 1/ 2/ 3/ 4	Aquaporin Isoform 1/ 2/ 3/ 4
AVP	Arginin-Vasopressin/ Antidiuretisches Hormon
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovines</i> Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CA	Carboanhydrase
cdNA	engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ct-Wert	engl. <i>cycle threshold</i> -(Wert), Schwellenwert-Zyklus-Wert
dDAVP	Desmopressin
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ENaC	Amilorid-sensitiver epithelialer Na ⁺ Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G α s	stimulierendes G-Protein
HAES	Hydroxyethylstärke
HRP	engl. <i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
hV2R	humaner Vasopressin-2-Rezeptor
i1-3	intrazelluläre Schleifen 1-3
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung

Abkürzungsverzeichnis

kg	Körpergewicht
MD	Macula densa
MDC	Max-Delbrück Center
MDCK II	Madin Darby canine kidney (-Zellen)
mRNA	engl. <i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mV2R	muriner Vasopressin-2-Rezeptor
MW±SD	Mittelwert ± Standardabweichung
NCC	Thiazid-sensitiver Na ⁺ ,Cl ⁻ -Transporter
NDI	Nephrogener Diabetes insipidus
Ni3-V2R	Fehlen der 3. intrazellulären Schleife des Vasopressin-2-Rezeptors
NKCC2	Furosemid-sensitiver Na ⁺ ,K ⁺ ,2Cl ⁻ -Kotransporter
o1-3	äußere Schleifen 1-3
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PA	Polyacrylamid
PE	Polyethylen
PKA	Proteinkinase A
PTH	Parathormon
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
REBM	engl. Renal Epithelial Cell Basal Medium
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	engl. Rat outer medullary K ⁺ channel
rV2R	Vasopressin-2-Rezeptors der Ratte
rV2RS	kurze Spleißvariante des Vasopressin-2-Rezeptors der Ratte
SD	Sprague-Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
TAL	Dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife
THP	Tamm-Horsfall Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	engl. <i>transfer</i> Ribonukleinsäure
V2R	Vasopressin-2-Rezeptor
V2RS	kurze Spleißvariante des Vasopressin-2-Rezeptors
WT	Wildtyp
U	Units
UTP	Uridintriphosphat

1. Einleitung

1.1 Funktionen der Niere

Die Nieren des Säugerorganismus erfüllen lebenswichtige Funktionen. Sie regulieren den Wasser-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalt, die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie das Zurückhalten wichtiger Substanzen für den Organismus.

Die Harnbereitung und -ableitung beruht auf der abgestimmten Funktion struktureller Bestandteile der Nieren. Pro Tag werden durch die Filtration des Bluts in einem Kapillarknäuel 180 l Primärharn in den Nieren hergestellt. Dieser Primärharn wird im Tubulussystem der Nieren durch Wasserentzug konzentriert und durch Sekretion und Resorption der Einzelelektrolyte verändert. Über die Nieren werden schließlich 1,5 l Endharn pro Tag ausgeschieden.

Neben der Exkretion von Stoffwechselendprodukten (z. B. Harnstoff, Harnsäure und Protonen) und Fremdstoffen (z. B. Medikamente und Giftstoffe) werden in den Nieren Substrate konserviert, welche für den Körper erhalten werden müssen (z. B. Kohlenhydrate, Aminosäuren, Fettsäuren und Wasser). Die lebensnotwendige Regulation des Säure-Basenhaushalts wird durch die Anpassung der Ausscheidung von H^+ , NH_4^+ und Pufferbasen an den Säure-Basen Status des Körpers gewährleistet.

Weiterhin übernehmen die Säugernieren endokrine Funktionen. Sie sind Zielorgan für Hormone (z. B. Vasopressin [AVP], Aldosteron und Parathormon [PTH]), metabolisieren Hormone (z. B. Testosteron und Proteohormone) und synthetisieren Hormone (z. B. Erythropoetin und Calcitrol). Über das im juxtaglomerulären Apparat gebildete Renin stehen die Nieren am Anfang der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade, welche den systemischen Blutdruck beeinflusst. (Quellen: [Benninghoff et al., 2003] und [Pape et al., 2014])

1.2 Makroskopischer Aufbau der Niere

Die einpapilläre Niere, wie sie vorwiegend bei kleinen Säugern vorkommt (z.B. Ratte und Kaninchen), gliedert sich in Nierenmark und Nierenrinde. Das Nierenmark hat die Form einer Pyramide. Das Ende dieser Pyramide ist papillenförmig zugespitzt und ragt als Markpapille in das Nierenbecken, von dem diese allseitig umschlossen wird. Auf Längsschnitten sind im Nierenmark ein helles inneres Mark und ein rötlich gefärbtes äußeres Mark zu erkennen. Letzteres gliedert sich nochmals in einen Außen- und Innenstreifen (Abbildung 1-1). Die Nierenrinde bedeckt die Pyramide und reicht an deren Seitenflächen bis in das Nierenhilum. Bei multipapillären Nieren, wie sie beim Menschen und größeren Säugern vorkommen, besteht das Nierenmark aus 12-18 Pyramiden, welche mantelförmig von der Nierenrinde umgeben sind. Die einzelne Markpyramide und ihre Rindenschicht stellen jeweils als

Nierenlappen eine Einheit dar (Quelle: [Benninghoff et al., 2003]).

1.3 Organisation des Nephrons und Aufbau des TAL

Jede Niere enthält ca. 1,2 Mio. Nephrone. Diese sind die kleinsten funktionellen und strukturellen Einheiten der Nieren. Ein Nephron besteht aus dem Glomerulus, lokalisiert in der Nierenrinde, dem proximalen Tubulus, der in das Nierenmark hinabsteigt, der Henle-Schleife im Nierenmark und dem distalen Tubulus im äußeren Mark und der Nierenrinde (Abbildung 1-1). Der proximale Tubulus beginnt mit einem gewundenen Abschnitt, der Pars convoluta. Der gestreckte Abschnitt des proximalen Tubulus, die Pars recta bildet im Anschluss den ersten Teil der Henle-Schleife. Anschließend gliedert sich die haarnadelförmige Henle-Schleife in einen dünnen absteigenden Teil und, je nach Nephrontyp, bei kurzen Nephrone einen anschließenden dicken Schleifenschenkel, den TAL, und bei langen Nephrone einen anschließenden dünnen Teil, dem dann erst der TAL folgt. Der TAL gehört zum distalen Tubulus und beginnt im äußeren Mark am Übergang des inneren Marks in den Innenstreifen des äußeren Marks. Er steigt weiter in den Außenstreifen und dann in die Rinde auf und bildet an der Kontaktstelle mit dem zugehörigen Glomerulus die Macula densa (MD) aus. Kurz hinter der MD geht der TAL in die Pars convoluta des distalen Tubulus über. Mehrere distale Tubuli münden schließlich jeweils über einen Verbindungstubulus in ein Sammelrohr. Der TAL besteht aus interdigitierenden kubischen Epithelzellen, deren basolaterale Fortsätze reich an Mitochondrien zur Energiebereitstellung für die basolaterale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ sind. Die dichte Verbindung der Zellen untereinander wird durch eine stark entwickelte Zonula occludens gewährleistet. Die apikale Oberfläche der TAL-Zellen ist im Gegensatz zum proximalen Tubulus mit wenigen kurzen Mikrovilli ausgestattet. Die MD besteht aus ca. 20-30 Zellen, die dem extraglomerulären Mesangium angelagert sind und einen Teil des juxtaglomerulären Apparats stellen. Die Zellen der MD besitzen große Zellkerne, die im lichtmikroskopischen Bild dicht nebeneinander erscheinen. Diese Zellen sind nicht miteinander interdigitiert, sondern grenzen sich durch deutliche Interzellularspalten voneinander ab. (Quellen: [Benninghoff et al., 2003] und [Hescheler et al., 2013])

Einleitung

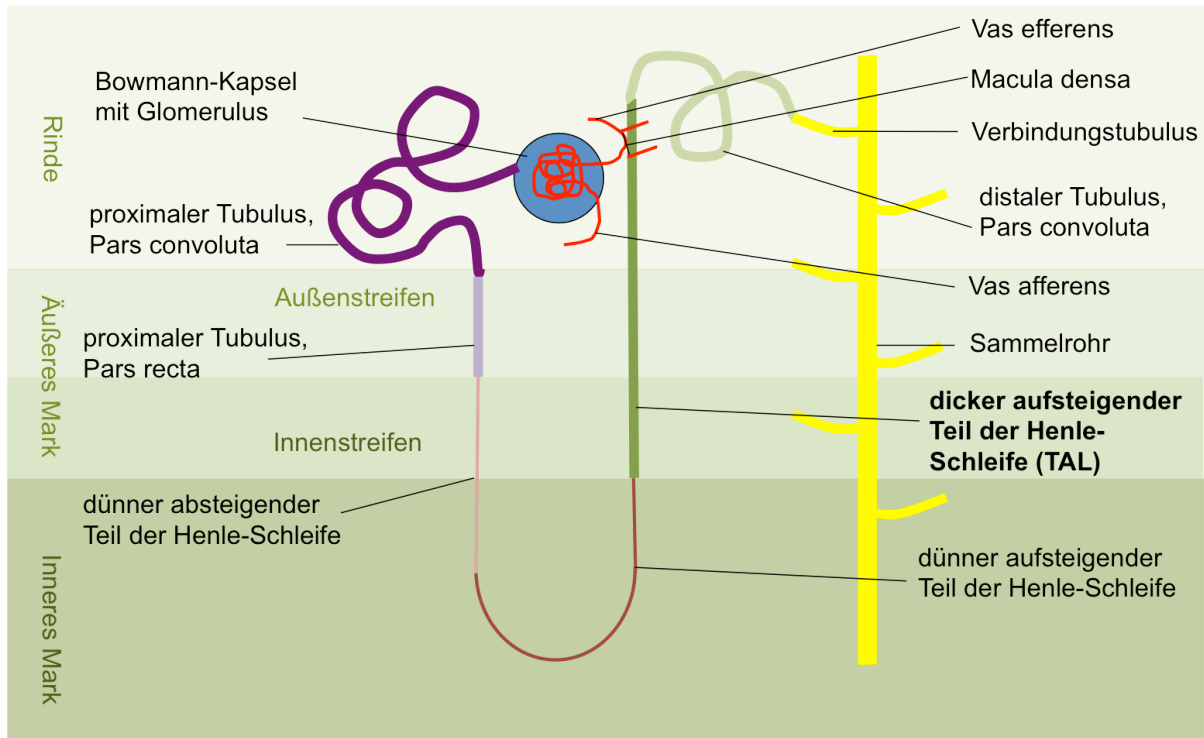


Abbildung 1-1: Gliederung des Nierenparenchyms sowie Organisation des Nephrons. Der proximale Tubulus mit der Pars convoluta (lila) und der Pars recta (flüchtig) schließt sich dem Glomerulus an. Danach folgt, hier beim Nephron mit langer Schleife, der dünne absteigende Teil (pink), dann der dünne aufsteigende Teil (dunkelrot) und der TAL (dunkelgrün). Der TAL bildet an der Kontaktstelle mit dem zugehörigen Glomerulus die Macula densa (zwischen den Strichen) aus und geht danach in die Pars convoluta des distalen Tubulus (hellgrün) über. Es folgen Verbindungstubulus und Sammelrohr (gelb).

1.4 Transportmechanismen des TAL

Der wichtigste Ionentransporter in der apikalen Membran des TAL ist der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2). Er vermittelt den transzellulären NaCl-Transport von apikal nach basolateral. Der NKCC2 ist ein integrales Membranprotein aus einer Familie verwandter, Natrium-abhängiger Kationen-Chlorid Transporter. Er wird in der Niere ausschließlich im TAL und den MD-Zellen, wo er die Aufgabe eines „Chloridsensors“ erfüllt, exprimiert. Das apikal aufgenommene Na^+ wird mit Hilfe der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ gegen K^+ basolateral ausgetauscht. Zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Ionengleichgewichts der TAL-Zelle müssen die K^+ - und Cl^- -Ionen die Zellen über K^+ -Kanäle bzw. Cl^- -Kanäle wieder verlassen (Abbildung 1-2). Durch die polare Verteilung der Ionenkanäle im TAL entsteht ein transepitheliales, lumenpositives Potenzial. Dieses positive Potenzial treibt ca. 50% des resorbierten Na^+ zwischen den Zellen durch den parazellulären Weg. Die stark entwickelte Zonula occludens ist durchlässig für Kationen, aber relativ undurchlässig für Anionen und Wasser. So werden ca. 30% des filtrierten Ca^{2+} und 70% des Mg^{2+} über den parazellulären Weg transportiert.

Der Transport dieser divalenten Kationen wird wesentlich durch segmentspezifische Proteine der Tight junctions gesteuert. Aquaporine (AQP) werden im TAL nicht exprimiert, wodurch dieses Nephronsegment für Wasser undurchlässig ist. Hormone wie PTH, AVP, Calcitonin, Glukagon und Adrenalin erhöhen die Absorption von Na^+ und Cl^- ; Prostaglandin E_2 reduziert die Aufnahme. (Quellen: [Benninghoff et al., 2003] und [Speckmann et al., 2013])

Außerdem produzieren die Zellen des TAL das Tamm-Horsfall Protein (THP), ein nierenspezifisches Glykoprotein, welches apikal in das Lumen abgegeben wird. (Mutig et al., 2007)

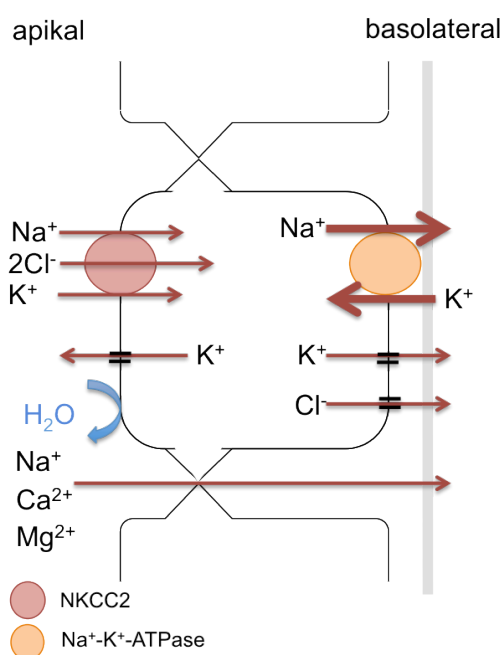


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung einer Epithelzelle des TAL mit charakteristischen Transportprozessen.

Aktive Salztransporte sind durch dicke rote, passive Transporte durch dünne rote Pfeile dargestellt. Einzelheiten siehe 1.4.

1.5 Beteiligung des TAL an der Harnkonzentrierung

Die Harnkonzentrierung erfolgt nach dem Gegenstromprinzip und dient der Wasserrückresorption. Die haarnadelförmige Henle-Schleife mit der Pars recta des proximalen Tubulus, den absteigenden und aufsteigenden dünnen Schleifenschenkeln und dem dicken aufsteigenden Schleifenschenkel und das parallel dazu liegende Sammelrohr bilden dabei eine funktionelle Einheit (Abbildung 1-3). Die Flussrichtung ist im absteigenden Schleifenschenkel und im Sammelrohr papillenwärts, im aufsteigenden Schleifenschenkel dagegen rindenwärts gerichtet. Das Gegenstromsystem erstreckt sich über zwei Zonen. In der Rinden- und äußeren Markzone mit den dicken Schleifenschenkeln findet die Basiskonzentrierung statt und ermöglicht eine Anreicherung von Salzen. In der inneren Mark- und Papillenzonen mit den dünnen Schleifenschenkeln findet die Endkonzentrierung statt. Aufgrund des Zusammenwirkens der in 1.4 beschriebenen Ionentransporter,

Einleitung

insbesondere des NKCC2, ist der TAL ein Schlüsselement der Salz- und Wasserregulation der Niere. Die NaCl-Resorption im TAL ist der einzige aktive Antrieb für das Gegenstromsystem und für den Aufbau des osmotischen Gradienten im Nierenmark verantwortlich. Da der TAL für Wasser undurchlässig ist, führt die aktive NaCl-Resorption mittels NKCC2 in diesem Segment zur primären Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts zwischen dem intratubulären Inhalt und dem Interstitium im äußeren Nierenmark. Es kommt also zu einer Verdünnung der intratubulären Flüssigkeit. Daher wird der TAL auch als „Verdünnungssegment“ bezeichnet. Die intratubuläre Osmolalität wird dabei vermindert, während die Osmolalität des Interstitiums steigt. Es kann hierdurch auf jeder Ebene ein osmotischer Gradient zwischen TAL und Umgebung von ca. 200 mosmol/l entstehen. Die Pars recta des proximalen Tubulus ist konstitutiv, das Sammelrohr hingegen über AVP geregelt wasserpermeabel. Dadurch wird aus papillenwärts strömender Tubulusflüssigkeit kontinuierlich Wasser abgezogen. Die Tubulusflüssigkeit, die in den dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife eintritt, ist deshalb hyperton. Dieser Nephronabschnitt ist ebenfalls gut wasserpermeabel, allerdings für NaCl undurchlässig. Die entstehende hohe Osmolalität des Nierenmark-Interstitiums ist die entscheidende Triebkraft für die AVP-regulierbare Wasserresorption über AQP2 im Sammelrohr (Abbildung 1-5). (Quellen: [Benninghoff et al., 2003] und [Speckmann et al., 2013])

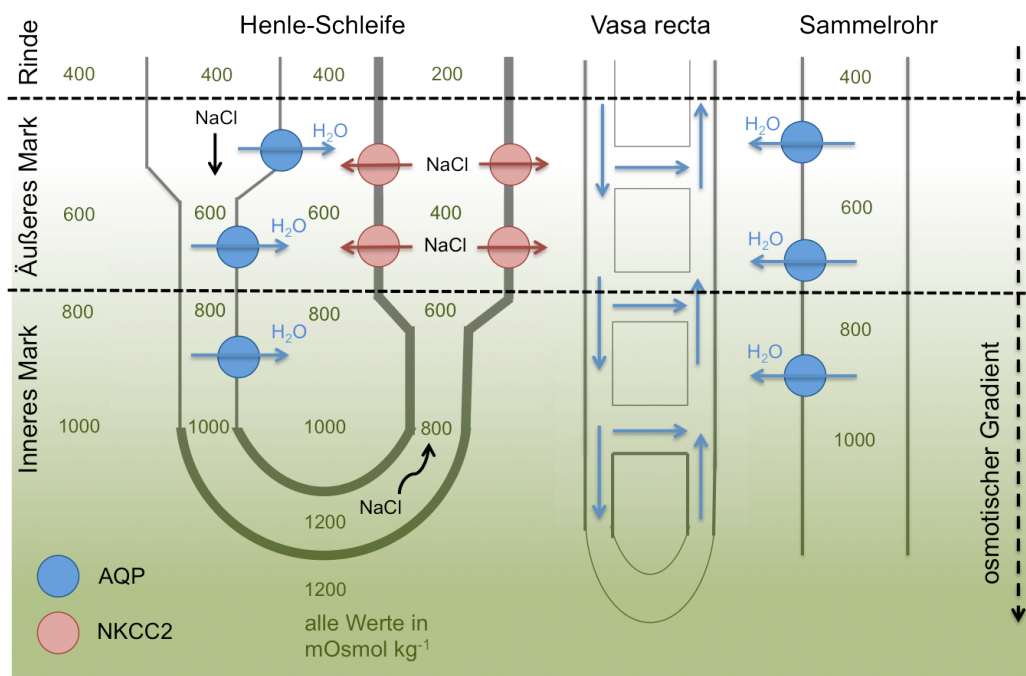


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Gegenstromsystems und des Prinzips der Harnkonzentrierung. Henle-Schleife und Sammelrohr bilden eine funktionelle Einheit und sind parallel angeordnet. Zur Schleifenspitze hin bildet sich ein osmotischer Gradient. Dadurch angetrieben strömt Wasser aus dem Sammelrohr über Aquaporine der Zellmembran in das Interstitium. Über die Vasa recta wird das Wasser aufgenommen und abtransportiert. Wasserimpermeable Abschnitte des

Nephrons sind durch eine dicke dunkelgrüne Linie gekennzeichnet.

1.6 Rolle des V2R im Nephron

1.6.1 Struktur des V2R

Der V2R gehört zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). GPCR sind die größte Proteinfamilie im menschlichen Genom und machen 3% aller Gene aus. Der V2R gehört zu den Klasse 1 GPCR und koppelt an Gas, um die Adenylatzyklase (AC) zu aktivieren. Der V2R besteht aus Untereinheiten mit 7 die Zellmembran durchspannenden transmembranären Helixstrukturen, die durch drei intrazelluläre (i1-i3) und drei extrazelluläre Schleifen (o1-o3) miteinander verbunden sind (Abbildung 1-4). Der N-Terminus befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär (Ji et al., 1998; Zhu et al., 1998). Eine vierte intrazelluläre Schleife, an welcher sich der C-Terminus befindet, entsteht mittels zwei palmitoylierter Cysteine, die in der Lipiddoppelschicht der Membran verankert sind (Sadeghi et al., 1997). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass die Bindung der Agonisten AVP und Desmopressin (dDAVP) an den V2R zu einer Phosphorylierung führt. In Zellkulturexperimenten mit *Madine-Darby canine kidney II* (MDCKII) -Zellen wurde der V2R fragmentiert und an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt, um die Funktion von i2, i3 und i4 innerhalb der Zelle zu charakterisieren. Die zweite intrazelluläre Schleife wurde hierbei als alleiniger Mediator für die Sortierung des V2R an die basolaterale Membran identifiziert. Die dritte intrazelluläre Schleife scheint für den Transport an die apikale Membran zuständig zu sein. Das GFP-Fragment mit der vierten intrazellulären Schleife ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) verblieben (Hermosilla et al., 2001).

1.6.2 Alternative *Splice*-Varianten des V2R

Bei Expressions- und Regulationsstudien der V2R- *messenger* (m)RNA in der Rattenniere wurden zwei alternativ gespleißte Isoformen des Rezeptors identifiziert: die funktionell effiziente lange (V2R) sowie die inaktive kurze Spleißvariante (V2RS) (Firsov et al., 1994). Die Expression des inaktiven V2RS reguliert die Expression des aktiven V2R in der Zellmembran herunter. Mittels Ko-Immünpräzipitations- und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET) Experimenten konnte erforscht werden, dass dies hauptsächlich durch die Bildung von V2RS-V2R-Heterodimeren geschieht. Der inaktive V2RS wirkt somit dominant-negativ auf den aktiven V2R (Sarmiento et al., 2004). Man geht davon aus, dass einige Formen von nephrogenem Diabetes insipidus (NDI) durch eine Überexpression von V2RS verursacht werden, da der wildtyp V2R durch die Bildung der V2RS-V2R-Heterodimeren in

Einleitung

der Zelle verbleibt. Die Mutationen, die dem inaktiven V2RS ähneln, sind durch einen frühzeitigen Translationsstopp (Stopp-Kodon, Abbildung 1-4) charakterisiert. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass bei Ko-Expression der funktionell aktiven V2R-Variante mit mutierten (trunkierten) V2RS-Formen die mutierten V2RS-Proteine ebenfalls dominant-negativ auf den durch das AVP induzierbaren intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) -Anstieg und auf das apikale *Trafficking* der V2R-Variante wirken (Zhu et al., 1998).

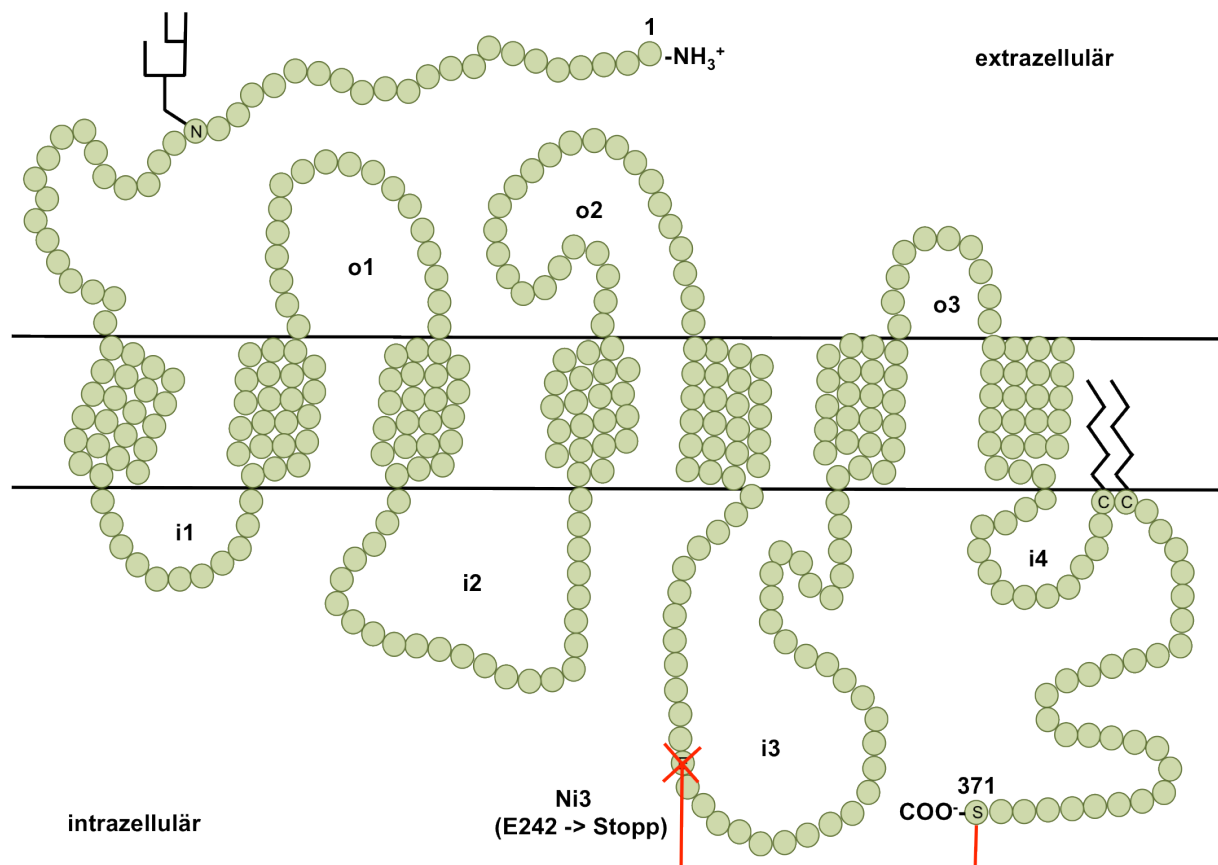


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des humanen V2R. Die 3 intra- und extrazellulären Domänen sind mit i1-i3 bzw. o1-o3 gekennzeichnet. Der dominant-negativ wirkende V2RS (Zhu et al., 1998) wurde durch Einfügen eines Stopp-Codons (Position E242 markiert mit rotem Kreuz) hergestellt. In dieser Arbeit wurde dieses Konstrukt unter Kontrolle des TAL-spezifischen THP-Promotors in der Ratte überexprimiert.

1.6.3 Funktion von V2R im Sammelrohr

AVP ist ein wichtiger Regulator für die Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase. Wichtige Funktionen für die Niere werden über den V2R vermittelt, der im Sammelrohr über Aktivierung des Wasserkanals AQP2 die Wasserresorption fördert. AVP wird im

Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Bei Detektion einer erhöhten Plasmaosmolalität durch Osmorezeptoren oder einer Hypovolämie durch Volumenrezeptoren des Hypothalamus wird AVP aus dem Hypophysenhinterlappen in den Blutkreislauf freigesetzt und zur Niere transportiert. Dort kann AVP an den V2R binden, der sich hauptsächlich basolateral in der Membran der Hauptzellen des kortikalen und medullären Sammelrohrs befindet. Durch die Bindung wird ein G-Proteinkoppelter Signalweg in Gang gesetzt, welcher die Aktivierung der AC und die katalysierte Bildung von cAMP einschließt. Die darauf folgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt zu einer Phosphorylierung von mindestens drei Serin-Resten von AQP2 und fördert so dessen Translokation aus zytoplasmatischen Vesikeln in die apikale Membran (Abbildung 1-5). Die normalerweise wasserdichte Membran wird durch die AQP2 wasserdurchlässig und Wasser kann somit entlang des osmotischen Gradienten die Hauptzelle transzellulär passieren. Über AQP3 und AQP4, die in der basolateralen Membran der Hauptzelle lokalisiert sind, kann Wasser die Zelle ins Interstitium verlassen. Dadurch wird ein hypovolämischer oder hyponatriämischer Zustand ausgeglichen.

Als Antwort auf einen niedrigen AVP-Spiegel im Blut wird AQP2 in den Hauptzellen durch Ubiquitinierung so modifiziert, dass es von der basolateralen Membran mittels Endozytose abgebaut und in die Membran der zytoplasmatischen Vesikel zurückkehrt. (Quellen: [Benninghoff et al., 2003] und [Heinrich et al., 2014]).

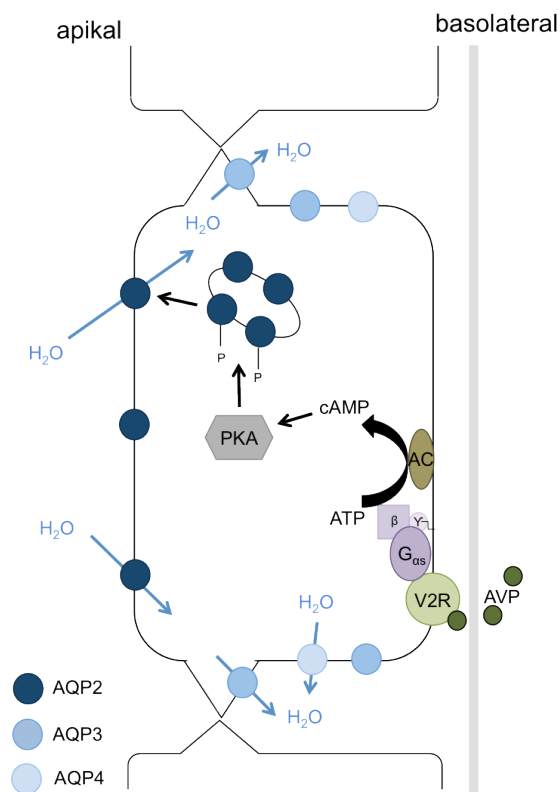


Abbildung 1-5: Regulation der renalen Wasser-Homöostase mittels AVP. Dargestellt ist eine schematische Sammelrohr-Hauptzelle. Einzelheiten siehe 1.6.3.

1.6.4 Funktion des V2R im TAL

Neben der Lokalisation im Sammelrohr wurde auch an der Zellmembran des TAL eine signifikante Expression des V2R gezeigt (Mutig et al., 2007). Wie in 1.5 beschrieben, wird an der apikalen Membran der NKCC2 exprimiert, welcher über den G-Protein gekoppelten Signalweg die Reabsorption von NaCl reguliert (Caceres et al., 2009; Gamba et al., 1994; Gamba et al., 2005b; Hebert et al., 1984). Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die Phosphorylierung von NKCC2 lediglich für die Aktivierung des Kotransporters in der Membran oder auch für den Einbau in die Membran verantwortlich ist (Carmosino et al., 2010). Die genaue Funktion des V2R im TAL ist noch nicht bekannt. Diese Arbeit dient dazu einen Teil der Funktionen und der Pathologie aufzuklären.

1.7 NDI

Aufgrund des Aufbaus und der komplexen Funktionen der Niere kann es zu zahlreichen Erkrankungen dieses Organs kommen. Es kann zu Fehlbildungen während der embryonalen Entwicklung, krankhaften Veränderungen des Nierengewebes in Form von Glomerulopathien und Veränderungen der Nierentubuli aufgrund von Autoimmunerkrankungen oder Virusinfektionen kommen. Nierensteine, Nierenabsenkung, Tumore und Kompressionen der Niere führen zu weiteren Defekten. Außerdem kann es zu Erkrankungen der Niere kommen, welche genetisch bedingte Ursachen haben. Der NDI ist eine seltene hereditäre Erkrankung, welche X-chromosomal rezessiv vererbt wird. 90% aller NDI-Erkrankungen sind auf Mutationen des V2R-Gens zurückzuführen. Derzeit sind mehr als 200 Mutationen beschrieben (Bichet et al., 2006). All diese Mutationen haben eine gravierende Störung des Rezeptor-Signalwegs zur Folge, da der V2R nicht mehr sensitiv für AVP ist (Peters et al., 2007). 10% der NDI-Erkrankungen werden durch Mutationen im Gen des AVP-abhängigen AQP2 verursacht. Sie führen zu einer Konformationsänderung des Kanals und somit zu unzureichendem Flüssigkeitsaustausch im Sammelrohr und zu Polyurie (Deen et al., 1998). Bei NDI ist der renale Konzentrierungsmechanismus beeinträchtigt, wodurch die Niere hohe Mengen an hypotonem Urin produziert. Diese Symptome führen zu klinischen Symptomen wie akuter Dehydrierung und einer Störung des Elektrolythaushalts, insbesondere zu Hybernatriämie und Hyperchlorämie (Fujiwara et al., 2005). Welche Rolle hierbei der TAL spielt, ist unklar.

Eine Möglichkeit, um bei Erkrankten zwischen einem V2R- oder AQP2-Defekt zu unterscheiden, ist die Gabe von dDAVP. Patienten mit einem AQP2-Defekt reagieren auf die Gabe, Patienten mit V2R-Defekt nicht (Khanna et al., 2006). Generell kann man einen NDI mit Thiaziddiuretika behandeln. Damit wird die NaCl-Absorption im distalen Konvolut vermindert. So wird eine erhöhte Aufnahme von Na⁺ und somit auch Wasser im proximalen

Tubulus erreicht (Knoers et al., 1996). Weiterhin können Prostaglandine die AVP-Wirkung in der Niere schwächen. Daher kann man mit nichtsteroidalen Antiphlogistika die Prostaglandinsynthese antagonisieren und verstärkt so indirekt die AVP-Wirkung. Eine verminderte Zufuhr von Proteinen, die im Stoffwechsel in besonders viele osmotisch wirksame Harnstoffmoleküle im Gegensatz zu anderen Nahrungsbestandteilen umgesetzt werden, kann die Urinmenge senken, ebenso wie eine reduzierte Salzzufuhr (Keller et al., 2010).

1.8 Transgene Tiere

Grundsätzlich handelt es sich bei transgenen Tieren um gentechnisch veränderte Organismen, deren Erbanlagen mittels gentechnischer und molekularer Methoden gezielt verändert worden sind und die diese erzeugten Mutationen stabil an ihre Nachkommen weitervererben. Man kann ein oder mehrere Gene einfügen und in den meisten Fällen auch (über-) exprimieren (*gain of function*), ein Gen und dessen Funktion inaktivieren (*loss of function*) oder dessen Funktion verändern. Um diese Ziele zu erreichen, werden zwei grundsätzlich unterschiedliche Techniken angewendet: die Vorkerninjektion, wie in dieser Arbeit geschehen, oder die homologe Rekombination. Eine weitere Strategie ist das virusabhängige System, mit welchem Genkonstrukte in einen Zielorganismus eingeschleust werden können. Dieses System kann sowohl für eine (Über-) Expression als auch für eine Inaktivierung genutzt werden. Vor allem bei der Methode der Vorkerninjektion ist eine Regulation der Transgenaktivität und -expression notwendig. In dieser Arbeit wurde hierzu der THP-Promotor genutzt.

Der Nutzen und Vorteil von transgenen Tieren ist, dass diese eine definierte Mutation stabil tragen können und meistens auch mit ausreichend Tierzahlen zur Verfügung stehen, um aussagekräftige und statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Mit einer symptomatischen Behandlung lassen sich bei vielen Krankheiten große Erfolge erzielen, jedoch bleiben die molekularen Ursachen meist unklar. Es ist möglich mittels Tiermodellen, entsprechende Krankheitsmodelle zu simulieren, um so Krankheitsmechanismen zu verstehen. Neben der Möglichkeit, Ursachen zu suchen und verschiedene Therapien zu erproben, kann man an Tiermodellen auch Untersuchungen und Analysen durchführen, welche am Menschen nie möglich wären (Schenkel, 2006). Wie in 1.6.2 bereits beschrieben, geht man davon aus, dass einige Formen des NDI durch eine Überexpression von V2RS verursacht werden, wodurch der wildtyp (WT) V2R durch die Bildung von V2RS-V2R Heterodimeren in der Zelle verbleibt und nicht in die basolaterale Plasmamembran eingebaut und somit funktionslos wird. In dieser Arbeit wurde eine transgene Rattenlinie gezüchtet, welche den V2RS im TAL überexprimiert, um so in diesem Segment des Nephrons den V2R funktionsuntüchtig zu machen. Mithilfe dieser transgenen Rattenlinie sollen nun die

Physiologie der Harnkonzentrierung und die Pathophysiologie des NDI in Bezug auf den V2R im TAL aufgeklärt werden.

1.9 Ziel dieser Arbeit

AVP ist ein wichtiger Regulator der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase. In den transportierenden Nierenepithelien werden AVP-Effekte hauptsächlich über den V2R vermittelt. Die Aktivierung dieses Rezeptors im Sammelrohr stimuliert den Einbau des Wasserkanals AQP2 in die apikale Membran der Hauptzellen und fördert somit die Wasserresorption. Die Voraussetzung für eine effektive Wasseraufnahme ist die Generierung eines longitudinalen osmotischen Gradienten entlang des Nephrons. Diese Funktion hängt primär von der aktiven NaCl-Resorption in dem für Wasser impermeablen TAL ab. Jedoch ist die endokrine Regulation der TAL-Funktion nur in wenigen Ansätzen untersucht worden. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die durch V2R vermittelten Effekte des AVP im TAL *in vivo* zu charakterisieren. Dafür wurde die Funktion des V2R selektiv im TAL mittels einer transgenen Überexpression V2RS in Ratten unterdrückt. Die Kontrolle der Überexpression des V2RS wurde vom TAL-spezifischen THP-Promoter vermittelt. Die Generierung und Charakterisierung dieser transgenen Rattenlinie ist Gegenstand dieser Arbeit. Das übergeordnete Ziel der Arbeit ist es, das Verständnis der Physiologie der Harnkonzentrierung sowie der Pathophysiologie des NDI um TAL-spezifische Aspekte zu erweitern.

2. Material und Methoden

Ich habe alle Versuche selbst geplant und durchgeführt, soweit im Text nicht explizit anders angegeben.

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden laut Versuchstierantrag (Tierversuchsantrag: Reg 0285/10) die im Folgenden beschriebenen transgenen Ni3-V2R Ratten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin [MDC], Berlin) und *Sprague-Dawley* (SD) Ratten verwendet.

2.2 Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratten

Prinzip

Für die Ratte wurden, wie in 1.6.2 beschreiben, zwei unterschiedlich große Transkripte des V2R identifiziert: die funktionell effiziente V2R-Variante sowie eine inaktive dominant-negative V2RS-Variante. Mutationen von V2R, die beim Menschen zu NDI führen, sind durch einen frühzeitigen Translationsstopp charakterisiert und ähneln somit der beschriebenen V2RS-Variante. Basierend auf der dominant negativen Aktivität dieser beschriebenen mutierten V2RS-Varianten kann eine selektive Hemmung des V2R-vermittelten *Signaling* in isolierten Nephronsegmenten durch Überexpression von solchen mutierten V2RS-Formen unter Kontrolle von segmentspezifischen Promotern erreicht werden. Für die spezifische Überexpression des dominant negativen Transgenkonstrukts im TAL kann der THP-Promoter eingesetzt werden.

Durchführung

V2R wurde aus Rattennieren- *complementary* (c)DNA amplifiziert. Durch gezielte Mutagenese wurde in den *rattus* (r)V2R ein frühzeitiger Translationsstopp integriert. Dieses Fragment kodiert die dominant-negative V2RS-Variante des V2R, welche in Patienten mit NDI als Mutation identifiziert wurde (Glu242→Stopp, Ni3; Abbildung 1-4). Zusätzlich wurde der THP-Promoter aus genomischer Maus- (m) DNA amplifiziert. Die Primer für die Klonierungen von V2R und den THP-Promoter inklusive der Schnittstellen für die Klonierung in den p222 Vektor sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Beide Fragmente wurden zuerst mit dem *Expand long template* PCR-System (Roche Diagnostics Corporation) amplifiziert und jeweils in den pCR®II-TOPO 3,9 kB Vektor (Invitrogen) subkloniert und in elektrochemisch kompetente Top10-Zellen (Invitrogen) transformiert, vermehrt und mittels Sequenzierung verifiziert. Als Vektor für die Umklonierungen beider Fragmente wurde der pBluescript Vektor

Material und Methoden

mit β -Globin (Kaninchen) und SV40 pA Intron verwendet (p222 von Prof. Dr. Michael Bader, MDC Berlin). Der rV2RS wurde aus dem pCR®II-TOPO Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI, welche kompatible Überhänge hinterlassen, ausgeschnitten und in das mit BamHI und EcoRI linearisierte und dephosphorylierte (*Calf intestinal phosphatase*, MBI Fermentas) p222 Plasmid umkloniert. Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente *E.coli* transformiert. Mehrere *E.coli*-Kolonien wurden analysiert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Minipräparation (Qiagen) aus den Bakterien isoliert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Für die Klonierung des THP-Promotor-Fragments wurden das Fragment und der p222-Vektor mit EcoRI und BamHI jeweils doppelverdaut und an diesen Schnittstellen miteinander ligiert. Das Transgenkonstrukt wurde wieder in *E.coli* transformiert und mittels Restriktionsanalyse (Kpn1, Sac1, Kpn1 + Sac1) und DNA-Sequenzierung kontrolliert. In Kooperation mit Prof. Dr. Michael Bader wurde das fertige Transgenkonstrukt in Ratteneizellen injiziert. Die genomische DNA aus Niere, Herz und Leber einer männlichen und einer weiblichen Ratte aus dem ersten Wurf wurde auf das Vorhandensein des transgenen Ni3-V2R Konstrukts mittels PCR untersucht, um sicher zu stellen, dass dieses Konstrukt nur in der Niere exprimiert wird. Als Kontrolle wurde ebenfalls genomische DNA aus der Niere einer männlichen und einer weiblichen SD Ratte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Für die zwei resultierenden Rattenlinien wurde eine Zucht organisiert und mittels Genotypisierung der Schwanzspitzen wiederholt auf das transgene Ni3-V2R Konstrukt untersucht. Die Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer wurden von Fermentas bezogen.

Tabelle 2-1: Primersequenzen von rV2R und dem mTHP-Promotor mit den späteren Schnittstellen für die Ligation mit p222.

Bezeichnung	Sequenz/ Schnittstelle/ Restriktionsenzym
EcoRI	
rV2R 5'	5'-ATC GATTC CATCATGCTCCTGGTG-3'
rV2R 2'	5'-CGT GGATCC CTCTAGGATGGCCCTGG-3'
BamHI	
XhoI	
mTHP-Promotor 5'	5'-ATT CCTCGAG ATCCAAGTCTCCTTCAAAC-3'
mTHP-Promotor 3'	5'-AGGA ATCGAT TGGTCCAGTCACAAGTAAGTGCC-3'
Clal	

2.2.1 Genotypisierung

Für die Organisation der Zucht der Ni3-V2R Ratten musste der genaue genetische Status der Versuchstiere bekannt sein. Mittels einer Genotypisierung wurden alle Jungtiere auf ihren Genotyp untersucht. Dazu wurde ca. drei Wochen alten Tieren ein 0,5 mm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und über Nacht in 100 µl Schwanzspitzenpuffer und 5 µl Proteinase K bei 55 °C und 300 rpm inkubiert. Proteinase K wurde anschließend bei 95 °C für 7 min deaktiviert. Das Volumen wurde auf Eis mit 400 µl dest. H₂O aufgefüllt. Die Zelltrümmer wurden für 5 min bei 18000 x g abzentrifugiert. Für die nachfolgende PCR wurden 5 µl des Überstandes als Template eingesetzt. Um die mRNA aus den Gewebeproben (Niere, Herz, Leber) der „Muttertiere“ zu erhalten, wurde das Gewebe, wie in 2.4 beschrieben, behandelt.

2.2.2 Präparation der cDNA

Für die reverse Transkription zur Herstellung der cDNA wurden 10 µg mRNA eingesetzt. Nach dem Zufügen von 1 µl Oligo (dt) Primer und 1 µl dNTP-Mix wurde das Gemisch bei 70 °C für 5 min inkubiert. Auf Eis wurden 4 µl 5 x BioScript Puffer (Bioline GmbH), 2 µl 5 mmol DTT und 1 µl RNase Inhibitor (Bioline GmbH) ergänzt und bei 42 °C für 2 min inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 500 U BioScript (Bioline GmbH) bei 72 °C für 50 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch bei 85 °C für 10 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die cDNA konnte direkt für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.3 PCR

Die PCR wird zur Vervielfältigung bestimmter Abschnitte der DNA genutzt. Zur Genotypisierung der transgenen Ratten diente folgender Ansatz:

5 µl	Überstand
5 µl	5 x MangoTaq DNA Polymerase Puffer
je 2 µl	Primer
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
0,2 µl	MangoTaq (Bioline GmbH)

mit dest. H₂O auf 25 µl auffüllen.

Tabelle 2.2: Primersequenzen für die Genotypisierung.

Bezeichnung	Sequenz
V2GT3a	5'-GTC TCG ATC ATC CAG TAG TTC-3'
Betagloex	5'-CTT GAT CCT GAG AAC TTC AGG-3'

2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Das Ergebnis der Genotypisierungs-PCR wurde mittels eines 1%igen Agarosegels mit 5% Ethidiumbromid überprüft. Die Proben wurden 30 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3 Wasserbilanz und Durstversuch

Alle Tiere hatten im Vorfeld der Versuchsreihen freien Zugang zu Standardnahrung und Trinkwasser. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere mit einem Körpergewicht von 240 bis 260 g durchschnittlich 14 bis 16 Wochen alt.

Für die Versuche zur Untersuchung der Wasserbilanz wurden die Ratten in zwei Gruppen (5 SD- und 5 Ni3-V2R Ratten) aufgeteilt. Jede Ratte wurde einzeln in einen Stoffwechsellkäfig (Zevenaar, Niederlande) gesetzt, um die physiologischen Urinparameter unter Kontrollbedingungen und während eines Durstversuchs zu erfassen und auszuwerten. Die Tiere hatten in den ersten zwei Tagen ihres Aufenthalts in den Käfigen freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Dabei wurde der erste Tag als Eingewöhnungszeit festgelegt. Die Werte des zweiten Tags wurden als Kontrollzustandswerte definiert. Anschließend wurde ein 18 h-Durstversuch durchgeführt. Während dieses Experiments blieb den Tieren der Zugang zu Trinkwasser verwehrt. Das Körpergewicht und der Wasserverbrauch jedes Tieres wurde täglich festgehalten, 18 h-Urin wurde gesammelt, die Urinmengen erfasst und Natrium, Kalium, Kalzium und Kreatinin mit Hilfe üblicher labordiagnostischer Methoden gemessen. Die Urinparameter beider Gruppen (SD und Ni3-V2R) wurden miteinander verglichen.

2.4 Präparation der Nierenhomogenate

Zur Präparation der Nierenhomogenate wurden je 5 Ni3-V2R und SD Ratten mit Äther narkotisiert, die Bauchhöhlen geöffnet und beide Nieren entnommen. Eine der beiden Nieren wurde in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (durchgeführt von Prof. Bachmann). Anschließend wurden die gefrorenen Gewebestücke in 1,5 ml Homogenisierungspuffer (1% Triton X im PBS mit Proteaseinhibitoren) mittels Mörser und Stößel homogenisiert. Daraufhin wurden die Zellen des Homogenats mit Ultraschall 3 x 5 s

aufgeschlossen. Die Gesamtnieren-RNA wurde mit Hilfe von RNeasy-total-RNA-Kit (Qiagen) aus der verbleibenden Niere extrahiert.

2.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Homogenate und Fraktionen erfolgte indirekt kolorimetrisch mit einem Kit (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA). Das Homogenat wurde 1:20 verdünnt. Zu je 10 µl des Homogenats wurden 100 µl des Reaktionsansatzes pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm photometrisch gemessen und ausgewertet.

2.6 *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) und *Western blot*

2.6.1 Anfertigung der PA-Gele und Vorbereitung der Proben

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem 10- oder 12%igen Polyacrylamidgel; je nach Größe des zu detektierenden Proteins. Es wurden 30 µg Proteinhomogenat in 12,5 µl Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 5% beta-Mercaptoethanol, 1% Bromphenolblau und 95 mM Tris [pH 6,8]) aufgenommen, mit Tris/EDTA auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und für 5 min bei 95 °C (NCC, pNCC, pNKCC2 und V2R) bzw. für 15 min bei 65 °C (NKCC2) denaturiert. 10- oder 12%ige PA-Gele wurden mit einem Sammelgel überschichtet und in eine mit Laufpuffer (0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 0,025 M Tris [pH 8,3]) gefüllte Anodenkammer (BioRad) gehängt. Pro Geltasche wurden je 20 µl Probevolumen aufgetragen. Eine Tasche pro Gel wurde mit 5 µl *Rainbow*-Molekulargewichtsmarker (BioRad) beladen. Die angelegte Anodenspannung betrug 120 V. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 120 min.

2.6.2 **Western blot**

Nach Durchführung der SDS-PAGE wurden die Gele für 2 min in Transferpuffer (0,192 M Glycin, 20% Methanol, 0,025 M Tris [pH 8,3]) kalibriert. Anschließend wurden die Proteine aus den PA-Gelen in einer *Semi-dry* Blottkammer (Biometra) bei 250 mA für 45 min auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Ausbeute des Elektrotransfers wurde mit einer *Ponceau* S-Färbung der Proteinbanden auf den Membranen beurteilt. Durch nachfolgende Waschschrte wurde der Farbstoff wieder entfernt. Die spezifischen primären Antikörper, die beim *Western blot* bzw. der Immunhistochemie zur Anwendung kamen, sind in Tabelle 2-3 aufgelistet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen für 30 min in einer Blockierlösung (5% Magermilchpulver in PBS) gewaschen. Die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte in der Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C. Nach dieser Inkubation wurden die Membranen zweimal in Tween-PBS (0,1% Tween, [pH 7,5]) und einmal in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (*Horse radish peroxidase* [HRP]) - konjugierten anti-Kaninchen-, anti-Meerschweinchen- oder anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Dako Cytomation, 1:2000 in Blockierlösung) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden erneut zweimal mit Tween-PBS und einmal in PBS gewaschen und für 1 min mit *Enhanced chemiluminescence substrate reagent* (ECL, Amersham, Freiburg) inkubiert. Das Luminol wird im alkalischen Milieu durch die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase mit H₂O₂ oxidiert. Dadurch fällt das Luminol unter Lichtemission auf einen energetisch niedrigeren Zustand zurück. Mit den inkubierten Membranen wurde ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) in der Dunkelkammer für ca. 5 bis 15 min belichtet und entwickelt. Zur Quantifizierung des Proteingehalts in den Proben wurde der Film anschließend eingescannt und die Schwärzung des Filmes mit der BIO-PROFIL Bio-1D *image software* (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 2-3: Primäre Antikörper für *Western blot* und Immunhistochemie.

Antikörper	Wirt	Molekulargewicht (kDa)	Verdünnung (IHC/WB)	Hersteller
AQP2	Ziege	29	1:300 / -	Santa Cruz, USA
β-Actin	Maus	42	- / 1:20000	Sigma-Aldrich, USA
NCC	Kaninchen	165	1:300 / 1:500	D.H. Ellison, Portland, Oregon
pNCC	Kaninchen	165	- / 1:500	D.H. Ellison, Portland, Oregon
NKCC2	Meerschweinchen	160	1:300 / 1:200	D.H. Ellison, Portland, Oregon
pNKCC2	Kaninchen	160	- / 1:250	D.H. Ellison, Portland, Oregon
THP	Kaninchen	98	1:250 / -	J. R. Hoyer, Philadelphia, Pennsylvania
Anti-V2R-Antikörper	Kaninchen	50 bzw. 30 für V2RS	1:200/ 1:200	Pineda AG, Berlin

-, Parameter wurde nicht bestimmt.

2.7 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung

Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und gewogen. Anschließend wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Ketamin (Narketan 10, Chassot AG, Belp, Schweiz; 80 mg/ kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen; 33 mg/ kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die Aorta abdominalis dargestellt. Nach der distalen Punktion der Abgänge der Aa. renales wurde das Gefäß über einen ausgezogenen PE-Schlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich wurde die Vena cava inferior eröffnet. Die Perfusionsrichtung war retrograd. Zunächst wurde bei einem konstanten Perfusionsdruck von 200 mmHg mit einem Waschpuffer (6 Teile 0,1 M Cacodylatpuffer [pH 7,5], 4 Teile Hydroxyethylstärke in physiologischer Kochsalzlösung [HAES steril, Fresenius AG, Bad Homburg] mit Sucrose auf 300 mOsm eingestellt) für 45 s vorgespült. Die Fixierung erfolgte durch anschließende Perfusion mit einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd in PBS für 5 min. Die Nieren wurden entnommen und in schmale Scheiben geschnitten (durchgeführt von Prof. Bachmann). Die Gewebe wurden für die Gefrierschnitte zum Schutz vor Gefrierartefakten in einer PBS-Sucrose-Immersionlösung (800 mOsm/ kg H₂O [pH 7,4]) bei 4 °C über Nacht immigiert.

Anschließend wurden die Gewebe in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Gewebe in einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd in PBS für weitere 12 h nachfixiert, in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen entwässert und in Paraffin eingebettet.

2.8 Immunhistochemie

An $5\text{ }\mu\text{m}$ dicken Gefrier- und Paraffinschnitten wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haen) Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol für 30 min entparaffiniert und anschließend in einer Ethanolverdünnungsreihe absteigender Konzentrationen rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit der Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit den Primärantikörpern verdünnt in Blockierlösung. Die Inkubation erfolgte zunächst bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer feuchten Inkubationskammer. Die entsprechenden Primärantikörperverdünnungen sind in der Tabelle 2-3 angegeben. Alle eingesetzten Primärantikörper wurden bereits charakterisiert und erfolgreich eingesetzt. Am nächsten Tag wurden Waschschrte (in PBS 3 x 5 min) und eine Inkubation mit den passenden Sekundärantikörpern durchgeführt. Es wurden peroxidase- und fluorchromkonjugierte Sekundärantikörper verwendet. Für die Detektion der NCC-, NKCC2-Markierungen und der Markierungen des selbst generierten anti-V2R-Antikörpers (mit Firma Pineda s.u.) kam mit Cy3-Fluoreszenz konjugiertes Esel-anti-Kaninchen IgG zum Einsatz. Die Cy3 gekoppelten Antikörper wurden 1:500 in PBS verdünnt. Nach 1 h Inkubationszeit mit den Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Schnitte gewaschen, in Glycerin/ PBS eingedeckelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB) ausgewertet.

2.9 *In situ*-Hybridisierung

2.9.1 Präparation der cDNA

Für die Herstellung der V2R-Riboproben wurde aus einem Rattennieren-RNA-Extrakt ein 548 bp langes V2R-cDNA Fragment generiert. Der spezifische *forward* Primer hatte die Sequenz 5'-CAG CAG CCA GGA ACT AC-3' und der *reverse* Primer die Sequenz 5'-GTG CCA CAA ACA CCA TCA AG-3'. Das amplifizierte Fragment wurde in einen pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert und mittels Sequenzierung verifiziert.

Für die Charakterisierung der weiteren hauptsächlich im TAL exprimierten Proteine wurden

auch Riboproben von THP und dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) hergestellt. Die Primer für THP wurden so gewählt, dass die synthetisierte Sequenz die Positionen 1170-1662 der mRNA für THP umfasst (Accession number L33406; +1170 5'-GTG GTG CAC AGA GAT CCA GG-3' und +1662 5'-AGG GTG TTG CTG TAG GTG GC-3'). Das amplifizierte Fragment wurde in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pCR® II TOPO (Invitrogen, USA) inkloniert und mittels Sequenzierung verifiziert.

2.9.2 *In vitro*-Transkription zur Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Riboproben

Zur Herstellung der DIG-11-dUTP markierten RNA *Antisense*- und *Sense*-Proben wurde eine *in vitro*-Transkription durchgeführt. Es wurde eine SP6-, T3- oder T7-Polymerase (DIG RNA labeling Kit SP6/ T7, Roche) und DIG-markiertes Substrat verwendet. Um jeweils eine *Sense*- und eine *Antisense*-RNA-Probe zu erhalten, wurde in verschiedenen Ansätzen sowohl die T3- als auch die T7-Polymerase verwendet. Die *Antisense*-Probe diente als Kontrolle zum Nachweis der RNA Expression, da sie das komplementäre Gegenstück zur zellulären mRNA ist. Als Matrize für die Transkription wurde jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma, St. Louis, USA) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit DIG-markiertem dUTP (DIG-labeling Mix; Boehringer, Mannheim) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) für 135 min bei 37 °C inkubiert. Durch eine 15-minütige Inkubation mit RNase freier DNase (Boehringer, Mannheim) wurde die DNA-Matrize enzymatisch verdaut. Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und 100% Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach anschließender Trocknung in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Mittels photometrischer Bestimmung bei 260 nm und Agarosegel-Elektrophoresen konnten Qualität und Quantität der RNA bestimmt werden.

2.9.3 Hybridisierung DIG-markierter Riboproben

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 6 µm dicke entparaffinierte Paraffin- oder Gefrierschnitte auf silanisierten (1% Aminopropyltriethoxysilan in H₂O, Sigma, St. Louis, USA) Objektträgern mit Proteinase K behandelt. Nach der Lufttrocknung wurden die Schnitte 2 h bei 40 °C in einer feuchten Kammer mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 40 mM Tris-HCl [Trometamol, Merck, Darmstadt/ HCl; pH 7,4], 25 mM EDTA [Roth, Karlsruhe], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ ml *transfer* (t)RNA, 2,5 x Denhardt-Lösung [100 x = 0,05% Ficoll, 0,05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% *bovines* Serumalbumin], alle Produkte, soweit nicht anders angegeben von Roche), inkubiert. Nach

dem Abwaschen des Prähybridmixes wurden die Schnitte 18 h bei 40 °C mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8], 0,2 M Dithiothreitol [Biomol, Hamburg], 0,33 M NaCl, 5 mg/ ml tRNA, 1 mg/ ml Heringsperma [beides Boehringer, Mannheim], 10 x Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat [Sigma, St. Louis, USA]) und 2-8 pg DIG-markierter Riboprobe (die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Riboprobe austitriert) inkubiert. Es wurden jeweils *Sense*- und *Antisense*-Hybridisierungen durchgeführt. Schlussendlich wurden die Schnitte mit silikonisierten Deckgläschen (Sigmacote, Sigma, St. Louis, USA) eingedeckelt, um eine Austrocknung der Schnitte während der Inkubation zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für 18 h in einer feuchten Kammer.

2.9.4 Waschschrirte zur Entfernung nicht hybridisierter Riboproben

Zum Waschen der Schnitte wurden erst die silikonisierten Deckgläschen in einer Natriumzitratlösung (2 x *Standard sodium citrat*, SSC = 18% NaCl/ 15% Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]) abgelöst und die Schnitte für 30 min in dieser Lösung bei 40 °C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrirte in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen: 30 min in 0,38 x SSC/ 50% deionisiertem Formamid und 1 h in 0,1 x SSC/ 50 % deionisiertem Formamid, beide Waschschrirte bei 40 °C; 2 x 10 min in 0,5 x SSC und 10 min in 0,2 x SSC bei Raumtemperatur.

2.9.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zum Blockieren freier Antikörper-Bindungsstellen wurden die Schnitte einer 30-minütigen Inkubation mit Blockiermedium (2% Schafserum, 0,5% Rinderserumalbumin in 100 mM Tris-HCl [pH 7,5]/ 150 mM NaCl gelöst) unterzogen. Für die Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Schaf-anti-DIG-Antikörper (Roche, 1:500 in Blockiermedium) beschichtet und 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (enthält Nitroblau Tetrazolium und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate, sowie Levamisol [Sigma, St. Louis, USA] zur Hemmung endogener Phosphatasen [pH 9,5]) unter Lichtabschluss bei 4 °C oder bei Raumtemperatur durchgeführt und in Abhängigkeit von der angestrebten Intensität der Nachweisreaktion nach 4-48 h abgestoppt. Nachdem die Schnitte 2 x 15 min in Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) gewaschen wurden, folgten 2 weitere

Waschschritte für jeweils 15 min in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin (Merck, Darmstadt)/ PBS eingedeckt und an einem Leica DMRB Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet.

2.10 Quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine PCR Methode zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl von PCR-*Templates* wie DNA oder cDNA in Echtzeit. Daher ist auch der Name *real-time* PCR gebräuchlich. Während eines Laufs werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung durchgeführt, so dass keine weiteren Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, durchgeführt. Es gibt interkalierende Farbstoffe (SYBR Green und Eva Green), die sich während der Elongation an die doppelsträngige DNA anlagern. TaqMan[®] Sonden sind einzelsträngige Oligonukleotide, die inmitten eines *Amplicons* binden können und mit einem Fluorophor und einem Quencher in einem Abstand von 3 bis etwa 30 Basen versehen sind. Im Zuge der Amplifikation wird diese Sonde durch eine mit der Taq Polymerase assoziierte doppelstrangspezifische Nukleaseaktivität hydrolysiert. Auf diese Weise wird die Minderung der Fluoreszenz durch die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher aufgehoben - das Fluoreszenzsignal steigt. In dieser Arbeit wurden TaqMan[®] Sonden verwendet, da diese Methode der qPCR genauer und zuverlässiger ist als mit interkalierenden Farbstoffen. Die Sonden für AQP2, NCC, NKCC2, GAPDH als Kontrolle und der Master Mix wurden direkt bei Applied Biosystems geordert. Die Assay-IDs für die Sonden sind in Tabelle 2-4 aufgeführt. Das Gesamtvolumen des qPCR-Ansatzes betrug 15 µl. Der Mix wurde 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend folgten 20 Zyklen für 3 s bei 95 °C und 20 s bei 60 °C. Für die Messung am Anfang der exponentiellen Phase wurde der *cycle threshold* (ct)-Wert verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Tabelle 2-4: Sonden mit den zugehörigen Assay-IDs bestellt bei Applied Biosystems.

Sonde	Assy-ID
AQP2	Rn00664884_g1
GAPDH	Hs03929097_g1
NCC	RN00490207_m1
NKCC2	Rn00692576_m1

2.11 Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen rV2R

Für die Generierung des polyklonalen Antikörpers gegen das Protein V2R wurde die Firma Pineda AG (Berlin) beauftragt. Es wurde eine Epitopanalyse durchgeführt, welche zu der Peptidsequenz NH₂- LIRRGRGRWAPMHVFISHLC –CONH₂ geführt hat. Diese Sequenz wurde für die Gewinnung des Antikörpers eingesetzt. Der Antikörper erkennt ebenfalls hV2R und mV2R, weist aber keine Kreuzreaktivität mit rV2R1a und hV2R1a auf. Die Präimmunseren der ausgesuchten Tiere (drei Kaninchen und zwei Meerschweinchen) wurden im Vorfeld mittels *Western blot* und Immunhistochemie auf eine mögliche vorhandene Bindungsaktivität im Größenereich von 50 kDa (V2R) untersucht und im weiteren Verlauf auch immer als Kontrolle mitgeführt. Jeweils 30, 60, 90 und 120 Tag nach der Immunisierung wurde den vier Tieren Blut abgenommen und die Seren mittels *Western blot* und Immunhistochemie auf die Anreicherung des Antikörpers untersucht. Für die *Western blots* wurden je 30 µg Gesamtnierenhomogenat von Ratte, Maus und V2R-*knockout* Maus eingesetzt. Die Seren/ Präimmunseren der Tiere wurden in der Verdünnung 1:200 als erster Antikörper eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde für die Seren der Kaninchen ein HRP konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG (DAKO, Dänemark) in der Verdünnung 1:2000 in PBS eingesetzt. Für die Seren/ Präimmunseren des Meerschweinchens wurde ein HRP konjugierter anti-Meerschweinchen IgG (DAKO, Dänemark) in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Die Immunhistochemie wurde mit Gefrier- und Paraffinschnitten von Ratte und Maus durchgeführt. Die Seren bzw. Präimmunseren wurden als Primärantikörper in den Konzentrationen 1:200 bzw. 1:500 eingesetzt. Für die Detektion von mV2R/ rV2R mittels der Kaninchen Seren/ Präimmunseren kam mit Cy3-Fluoreszenz konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG und für die NCC, NKCC2 und AQP2 Cy2-Fluoreszenz konjugiertes Kaninchen-anti-Huhn IgG (Dianova) zum Einsatz. Die Cy2- und Cy3-gekoppelten Antikörper wurden jeweils 1:500 in PBS verdünnt.

2.12 Transfektion von TAL-Zellen

Kaninchen TAL-Zellen wurden auf Deckgläschen mit *Renal epithelial cell basal medium* (REBM, Lonza) kultiviert. Pro Transfektion eines Deckgläschen mit TAL-Zellen wurden 3 µl FuGENE (Invitrogen) in 150 µl Diluent (150 µM NaCl steril filtriert) gelöst und 15 min inkubiert. Pro Deckgläschen wurde außerdem 1 µg Plasmid DNA (V2R-GFP oder THP-GFP) in die Lösung appliziert. Die Immunfärbung mit anti-V2R-Antikörper wurde, wie in 2.8 beschrieben, durchgeführt.

2.13 Statistische Datenanalyse

Zur statistischen Auswertung wurde Excel genutzt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Messwerte in homogenen Gruppen einer Normalverteilung entstammen. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse wurde ein zweiseitiger ungepaarter T-Test nach *Student* angewendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt. Für jede Messreihe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung und Verifizierung eines polyklonalen Antikörpers gegen V2R

3.1.1 Generierung des polyklonalen anti-V2R-Antikörpers

Die Expression von V2R im TAL wurde durch den V2R-mRNA-Nachweis bereits in früheren Publikationen etabliert. Jedoch war die Detektion des Rezeptors auf Proteinebene wegen Mangels an zuverlässig funktionierenden, kommerziellen Antikörpern nicht möglich. Aus diesem Grund wurde zunächst ein eigener polyklonaler Antikörper generiert. Hierzu wurde, wie in 2.12 des Methodenteils beschrieben, eine Epitopanalyse durchgeführt. Diese war notwendig, um die passende Peptidsequenz zu finden, welche mV2R, hV2R und rV2R detektiert. Die Sequenz: NH₂-LIRRGRGRWAPMHVFISHLC-CONH₂ erwies sich hierfür als geeignet. Für die Generierung des polyklonalen Antikörpers wurde die Firma Pineda AG (Berlin) beauftragt.

Die Seren von drei Kaninchen und zwei Meerschweinchen wurden in Vorversuchen auf ihre Bindungsaktivität der Präimmunsereen im Bereich von 50 kDa im *Western blot* untersucht und nach negativen Ergebnissen immunisiert. In monatlichen Abständen wurden die Seren auf eine Anreicherung des Antikörpers mittels *Western blot* auf Maus- und Rattennierenhomogenaten getestet. Hierbei zeigte sich bei einem Kaninchenserum nach 120 Tagen eine starkes immunreaktives Signal bei ca. 50 kDa (Abbildung 3-1). Der polyklonale anti-V2R-Antikörper wurde anschließend durch Affinitätsreinigung dieses Serums produziert.

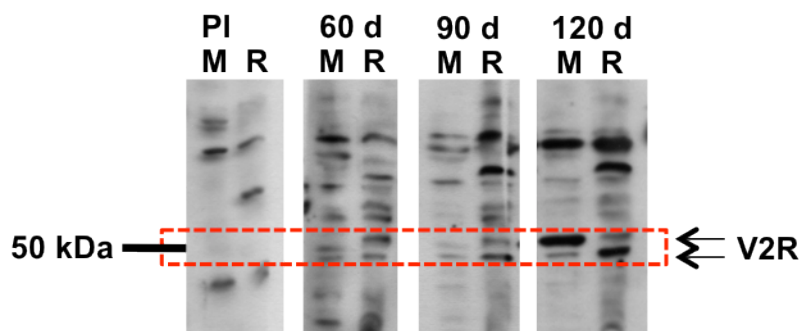


Abbildung 3-1: Verifizierung des Kaninchenserums auf Anreicherung des Antikörpers mittels *Western blot*. Auf Bahn Maus (M) und Ratte (R) jeweils aufgetragene Nierenhomogenate inkubiert mit Präimmunsereen (PI) und entnommenen Seren 60, 90 und 120 Tage (d) nach der Immunisierung. Keine Bindungsaktivität des PI sowohl auf Maus- als auch auf Rattennierenhomogenat um 50 kDa, jedoch starke Banden um 50 kDa nach 120 Tagen Immunisierung.

3.1.2 Verifizierung des anti-V2R-Antikörpers

Der polyklonale anti-V2R-Antikörper wurde mit 3 verschiedenen Methoden verifiziert. Zunächst wurden *Western blot*-Analysen mit V2R-*knockout* Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen mit dem affinitätsgereinigten anti-V2R-Antikörper durchgeführt. Abbildung 3-2 zeigt diesen *Western blot*. Bei der WT Maus-Kontrolle wurden um die 50 kDa zwei Banden detektiert. Die obere Bande weist auf die glykosylierte Form von V2R und die untere Bande auf die nicht-glykosylierte Form hin. Bei der V2R-*knockout* Maus (V2R $-/-$ Maus) wurde in dem Bereich um 50 kDa weder die glykosylierte noch die nicht-glykosylierte Form von V2R als Signal im Gesamtnierenhomogenat detektiert.

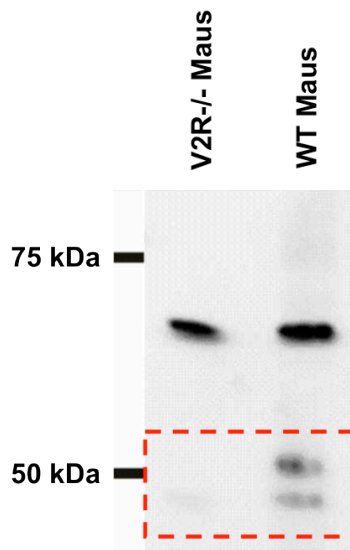


Abbildung 3-2: Überprüfung der Spezifität des aufgereinigten anti-V2R-Antikörpers mittels *Western blot*.

Auf Bahn V2R-/- Maus und Bahn WT Maus jeweils aufgetragene Nierenhomogenate inkubiert mit dem affinitätsgereinigten anti-V2R-Antikörper. Keine detektierten Banden um 50 kDa bei V2R-/- Maus. Detektion einer Doppelbande um 50 kDa auf Bahn WT Maus.

Der anti-V2R-Antikörper wurde außerdem immunhistochemisch verifiziert. Hierzu wurde der anti-V2R-Antikörper mit V2R-GFP und THP-GFP transfizierten TAL-Zellen inkubiert. In Abbildung 3-3 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Der anti-V2R-Antikörper lieferte bei V2R-GFP transfizierten TAL-Zellen ein Signal, bei THP-GFP transfizierten Zellen nicht. GFP lieferte sowohl bei den mit V2R-GFP transfizierten als auch mit THP-V2R transfizierten Zellen ein Signal.

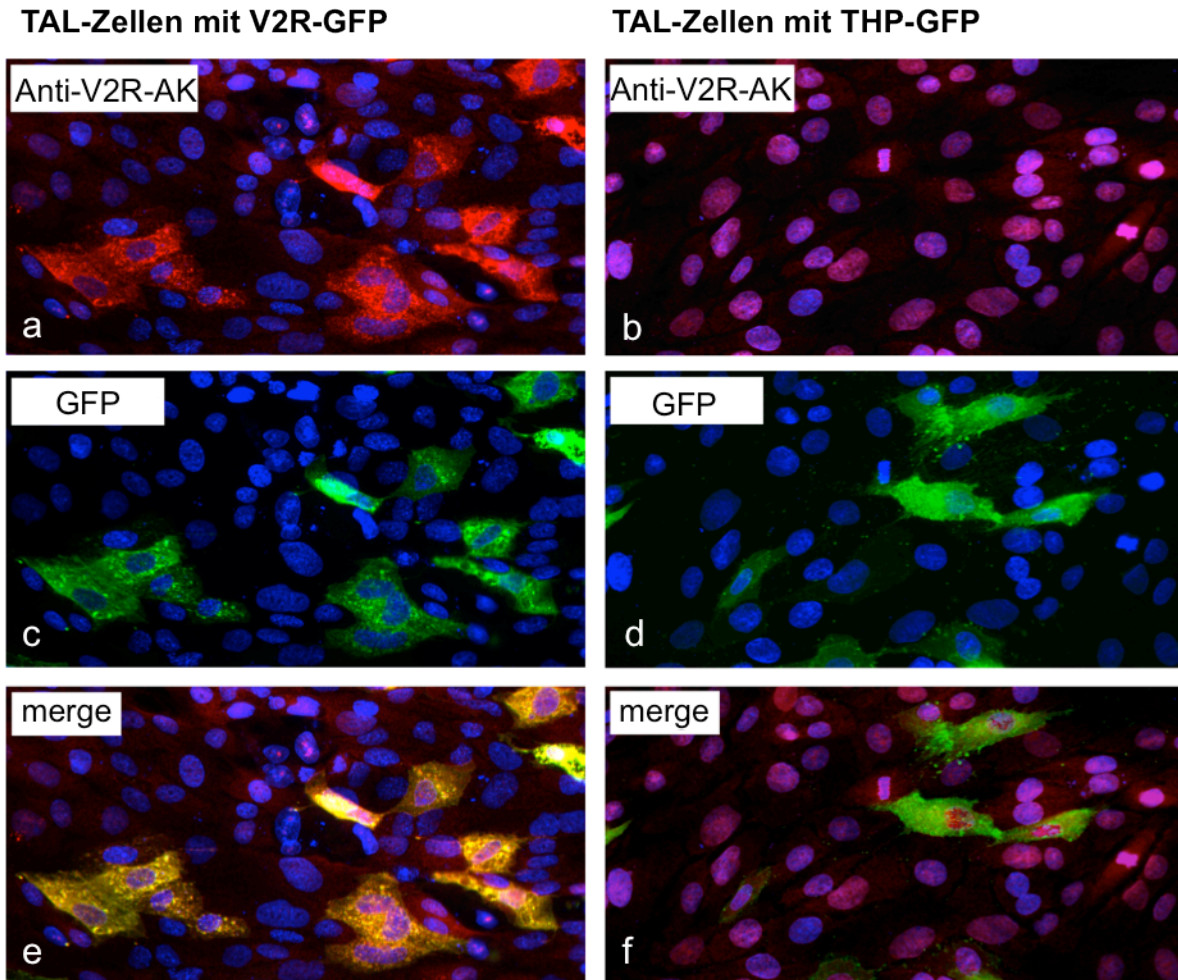


Abbildung 3-3: Verifizierung des anti-V2R-Antikörpers mittels Immunhistochemie auf transfizierten TAL-Zellen. (a, c, e) TAL-Zellen transfiziert mit V2R-GFP. (b, d, f) TAL-Zellen transfiziert mit THP-GFP (Kontrolle). (a, b) Transfizierte TAL-Zellen inkubiert mit anti-V2R-Antikörper (Anti-V2R-AK), liefert Signal in (a), kein Signal in (b). (c, d) GFP liefert starkes Signal. (e) a und c zusammengeführt. (f) b und d zusammengeführt.

Eine weitere immunhistochemische Verifizierung des anti-V2R-Antikörpers erfolgte auf SD Rattennierengewebeschnitten. Es wurde jeweils eine Doppelmarkierung mit NKCC2-, NCC- und AQP2-Antikörpern durchgeführt, um zwischen den einzelnen Nephronsegmenten unterscheiden zu können. NKCC2, NCC und AQP2 dienen jeweils als Markerproteine für den TAL, das distale Konvolut und das Sammelrohr.

Auf Abbildung 3-4 wurden die Markierungen mit dem anti-V2R-Antikörper und den Doppelmarkierungen mit NKCC2-, NCC- und AQP2-Antikörpern auf SD Rattennierenschnitten dargestellt. Der anti-V2R-Antikörper lieferte starke Signale im TAL, im distalen Konvolut und im Sammelrohr. Die NKCC2-, NCC- und AQP2-Antikörper lieferten in ihrem jeweiligen Segment ebenfalls starke Signale.

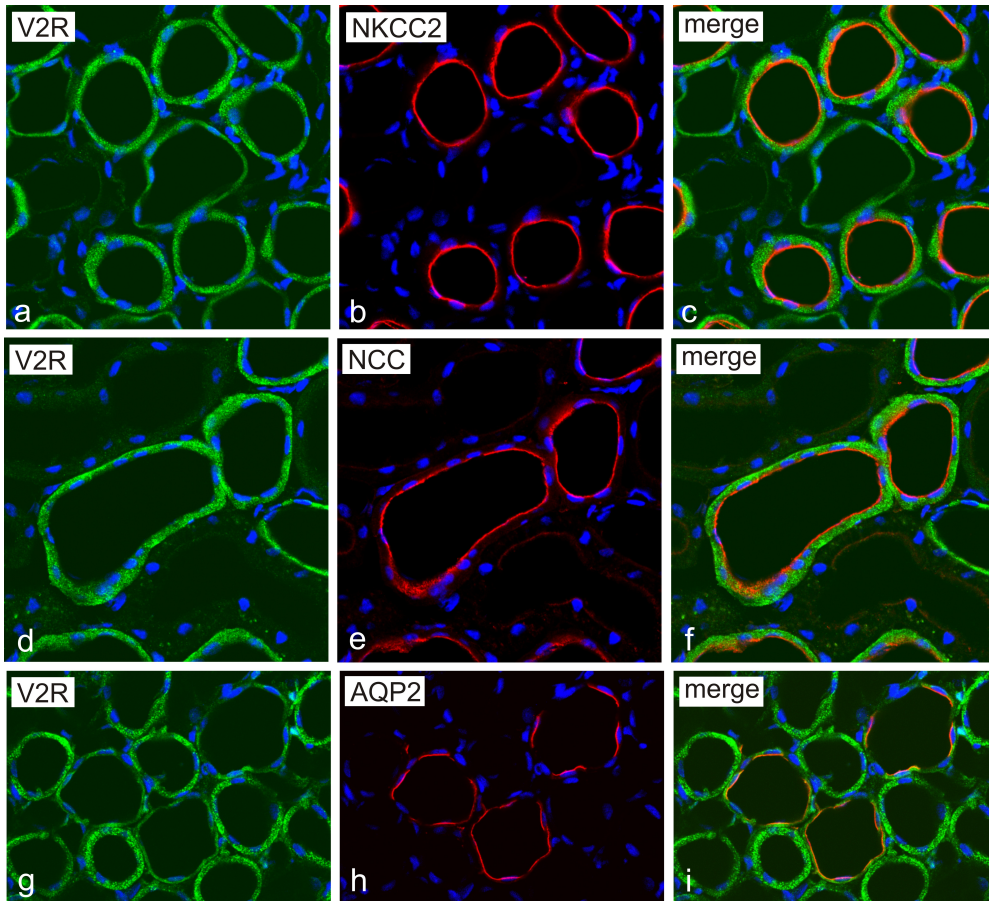


Abbildung 3-4: Verifizierung des anti-V2R-Antikörpers mittels Immunhistochemie auf SD Rattennierengewebeschnitten. (a, b, c) Doppelmarkierung V2R und NKCC2 im TAL. (d, e, f) Doppelmarkierung von V2R und NCC im distalen Konvolut. (g, h, i) Doppelmarkierung von V2R und AQP2 im Sammelrohr.

3.2 Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratte

3.2.1 Strategie

Es wurde bereits beschrieben, dass der V2R im medullären und kortikalen TAL, der Macula densa, dem distalen Konvolut, dem Verbindungstubulus, dem kortikalen und dem medullären Sammelrohr exprimiert wird. (Mutig et al., 2007, teilweise Abbildung 3-4). Wie in 1.6.2 der Einleitung erklärt, ist die Funktion von V2R in Verbindungstubulus und Sammelrohr bereits geklärt. Der V2R sorgt hier für eine Stimulation des Einbaus von AQP2 in die basolaterale Membran der Sammelrohrzelle und somit für eine erhöhte Wasserdurchlässigkeit bzw. -resorption (Bankir et al., 2001). Im TAL hingegen sind die Funktionen oder die Folgen eines Ausfalls des V2R erst wenig bzw. gar nicht beschrieben. Wie bereits in der Einleitung unter 1.7 beschrieben, gibt es offenbar Formen von NDI, bei denen durch Überexpression des dominant-negativen V2RS der funktionelle V2R durch die Bildung von V2RS-V2R-

Hetrodimeren inaktiviert wird. Diesen Umstand habe ich mir in dieser Arbeit zunutze gemacht. Im TAL sollte der aktive V2R mittels des dominant-negativen V2RS inaktiviert werden, um die Funktion des V2R durch das funktionelle Fehlen des Rezeptors in diesem Segment aufzuklären. Die Mutationen, die dem inaktiven V2RS ähneln, sind durch einen frühzeitigen Translationsstopp-Kodon (Ni3, Abbildung 1-4) charakterisiert. Um die Selektivität der Überexpression im TAL zu gewährleisten, wurde die Überexpression von V2RS mittels des TAL-spezifischen THP-Promoters kontrolliert.

Die transgenen Ratten werden in der vorliegenden Arbeit als Ni3-V2R Ratten bezeichnet. Diese Bezeichnung bezieht sich auf das Fehlen der dritten intrazellulären Schleife des V2R und ist an die Bezeichnung von Zhu et al., 1998 (Abbildung 1-4) für die dominant-negative Form des V2R angelehnt.

3.2.2 Verifizierung des transgenen Ni3-V2R Konstrukts

Für die Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratten wurde in den p222 pBluescript Vektor mit Kaninchen- β -Globin- und SV40 pA-Intron (AG Bader, MDC Berlin) der rV2RS und der THP-Promoter kloniert. Der nach der Klonierung erfolgte Restriktionsdoppelverdau (Abbildung 3-5) lieferte Fragmente in der erwarteten Größe. Die Sequenzierung des Ni3-V2R Konstrukts lieferte die richtige Sequenz (nicht dargestellt).

KpnI KpnI SacI
SacI

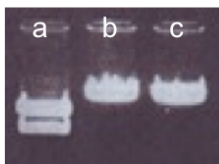


Abbildung 3-5: Restriktionskontrolle des klonierten Ni3-V2R Konstrukts.

(a) Doppelverdau mit KpnI und SacI. (b) Einzelverdau mit KpnI und (c) mit SacI.

3.2.3 Verifizierung der nierenspezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts mittels PCR

Nach Injektion des transgenen Ni3-V2R Konstrukts und Befruchtung der Eizelle, wurden zwei positiv genotypisierte Ratten aus dem ersten Wurf erneut verpaart. Aus dem nächsten Wurf wurde die genomische DNA einer männlichen und einer weiblichen Ni3-V2R Ratte kontrolliert. Hierfür wurde die cDNA aus Niere, Herz und Leber gewonnen und auf das Vorhandensein des transgenen Ni3-V2R Konstrukts mittels PCR untersucht. Als Kontrolle wurde die cDNA aus der Niere einer männlichen und weiblichen SD Ratte ebenfalls untersucht. In Abbildung 3-6 wurde das Ergebnis dieser Kontrolle dargestellt. Nur in der

Niere der Ni3-V2R Ratten wurde das Konstrukt bei ca. 300 bp detektiert. In Leber und Herz wurde keine Bande detektiert. In der Niere der SD Ratten wurde das Konstrukt ebenfalls nicht detektiert.

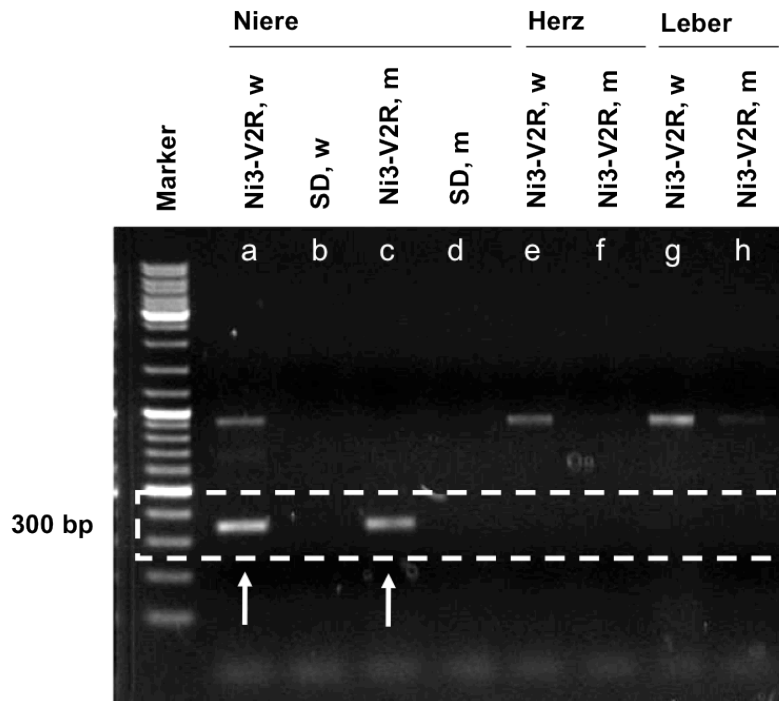


Abbildung 3-6: Verifizierung der nierenspezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts mittels PCR. (a, c) Positiver Nachweis des Konstrukts mit PCR aus Ni3-V2R Rattennieren-cDNA bei 300 bp. (b, d) Kein Nachweis des Konstrukts mit PCR aus SD Rattennieren-cDNA. (e, f) Kein Nachweis des Konstrukts mit PCR aus Ni3-V2R Rattenherz-cDNA. (g, h) Kein Nachweis des Konstrukts mit PCR aus Ni3-V2R Rattenleber-cDNA.

3.2.4 Verifizierung der TAL-spezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts mittels *in situ*-Hybridisierung

Auf präparierten Gewebeschnitten von SD- und Ni3-V2R Ratten wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit Sonden für den Nachweis von V2R-mRNA durchgeführt. In Abbildung 3-7 wurde jeweils eine repräsentative Aufnahme der beiden Gruppen vom äußeren Nierenmark dargestellt. Die Sonde für die V2R-mRNA lieferte im TAL der Ni3-V2R Ratten sehr starke Signale. Im TAL der SD Kontrollen waren die Signale deutlich schwächer.

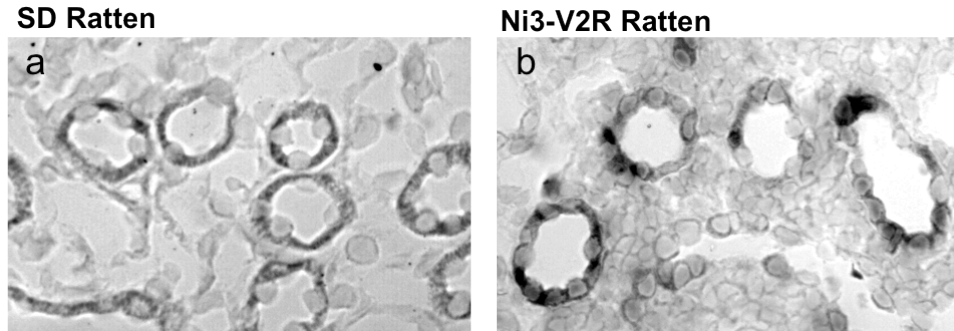


Abbildung 3-7: *In situ*-Hybridisierung von V2R im äußeren Nierenmark. V2R-mRNA Sonde liefert starke Signale auf Nierengewebeschnitten von Ni3-V2R Ratten (b) und sehr schwache Signale auf Schnitten von SD Ratten (a).

3.3 Verifizierung der V2RS-Überexpression im Ni3-V2R Rattenmodell

3.3.1 *Western blot* -Ergebnisse

Für die Bestimmung der Proteinmengen von V2R und V2RS unter Kontrollbedingungen wurden *Western blots* durchgeführt. Es wurden Gesamthomogenate von jeweils 5 SD- und Ni3-V2R Rattennieren eingesetzt. Durch den Einsatz des anti-V2R-Antikörpers wurden immunreaktive Banden entsprechend den publizierten Proteingrößen, dargestellt in Tabelle 2-3, detektiert; eine Doppelbande um die 50 kDa für den V2R in den Gesamtnierenhomogenaten von allen SD- als auch Ni3-V2R Ratten und eine Bande um 30 kDa für den V2RS ausschließlich bei den Ni3-V2R Ratten (Abbildung 3-8).

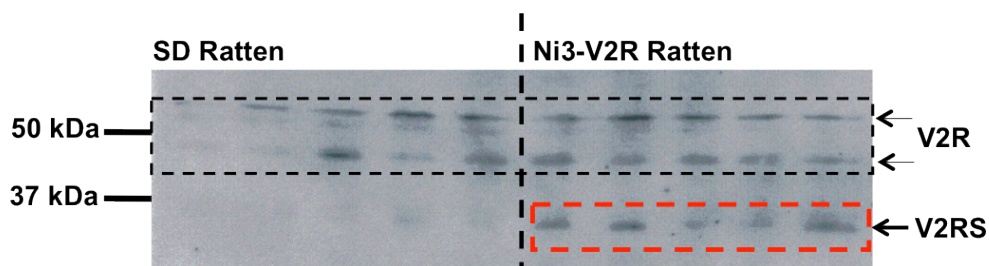


Abbildung 3-8: Verifizierung der Überexpression von V2RS im TAL der Ni3-V2R Ratten mittels *Western blot*. Inkubation der Gesamtnierenhomogenate von SD und Ni3-V2R Ratten mit dem anti-V2R-Antikörper. Detektion einer Doppelbande um 50 kDa bei allen getesteten Ratten. Detektion einer Bande um 30 kDa (V2RS) nur bei Ni3-V2R Ratten.

3.3.2 Immunhistochemische Nachweise

Für die weitere Charakterisierung und Verifizierung des Ni3-V2R Rattenmodells wurden Immunfärbungen auf Ni3-V2R Rattennierenschnitten und zur Kontrolle auf Schnitten von SD Rattennieren durchgeführt. Die Schnitte wurden zum einen mit dem anti-V2R-Antikörper für V2R und zusätzlich mit einem NKCC2- oder NCC-Antikörper komarkiert. NKCC2 war hierbei Marker für den TAL; NCC Marker für das distale Konvolut. In Abbildung 3-9 wurde die Komarkierung des V2R mit NKCC2 und in Abbildung 3-10 die Komarkierung des V2R mit NCC dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Ausschnitte, auf welchen V2R mit NKCC2 bzw. NCC kolokalisiert ist. Sowohl im TAL als auch im distalen Konvolut war das Signal für den V2R der Ni3-V2R Ratten stärker als bei den SD Kontrollen. Die Signalstärke für NKCC2 war im TAL der Ni3-V2R Ratten höher als bei den SD Ratten; für NCC im distalen Konvolut gab es keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

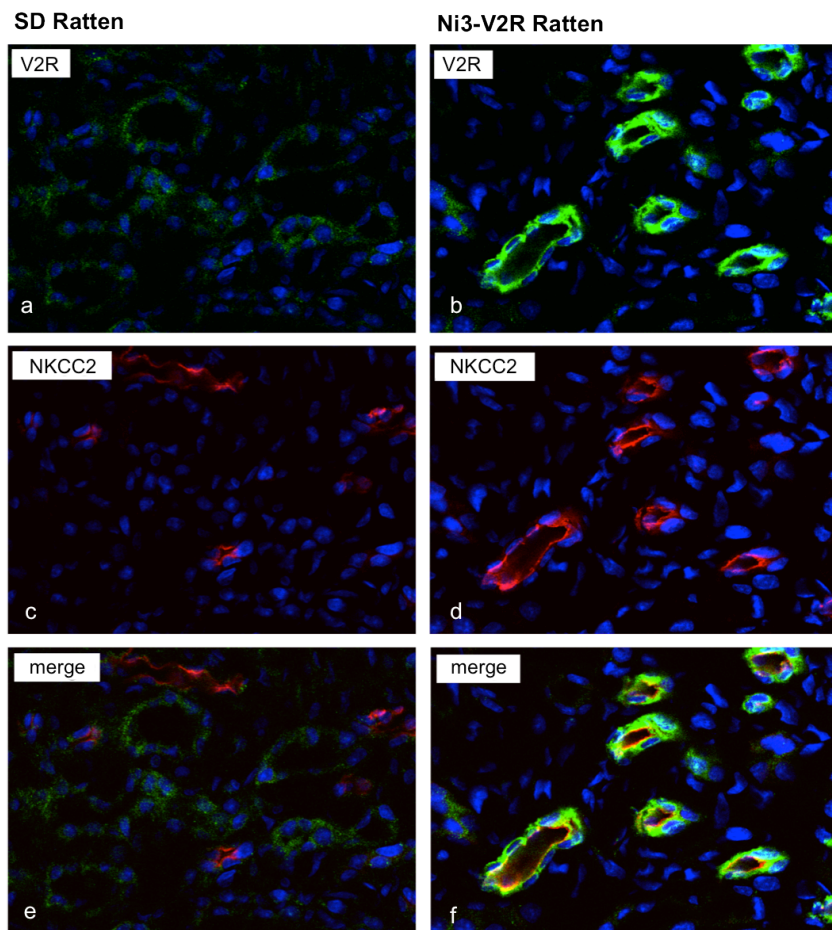


Abbildung 3-9: Immunhistochemische Darstellung von V2R und NKCC2 in Nierengewebe von SD- und Ni3-V2R Ratten. (a, c, e) Komarkierung von V2R und NKCC2 im TAL von SD Ratten (Kontrolle). (b, d, f) Komarkierung von V2R und NKCC2 im TAL von Ni3-V2R Ratten. Deutlich stärkere Signale für V2R und NKCC2 in Ni3-V2R Ratten (b, d, f).

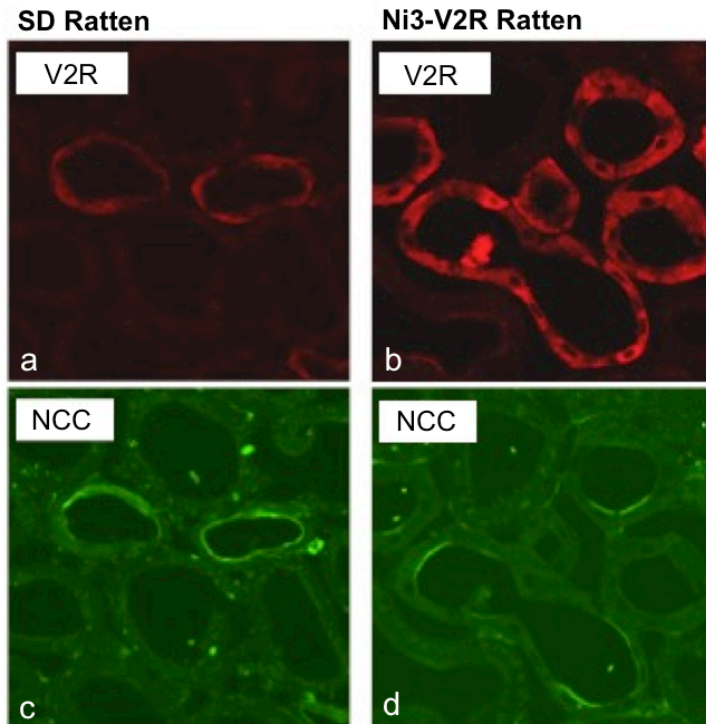


Abbildung 3-10: Immunhistochemische Darstellung von V2R und NCC in Nierengewebe von SD- und Ni3-V2R Ratten. (a, c) Komarkierung von V2R und NCC im distalen Konvolut der SD Ratten (Kontrolle). (b, d) Komarkierung von V2R und NCC im distalen Konvolut der Ni3-V2R Ratten. Stärkere Signale für V2R in Ni3-V2R Ratten (b).

3.4 Physiologische Untersuchungen des transgenen Rattenmodells

3.4.1 Kontrollzustand

Zur Untersuchung der physiologischen Urinparameter im Kontrollzustand wurden zwei Gruppen von je 5 Ratten (Ni3-V2R vs. SD) verglichen. Im Kontrollzeitraum hatten alle Ratten Zugang zu Wasser und Futter (Kontrollzustand). Während des Aufenthalts der Ratten in den Stoffwechselkäfigen wurde der Urin über 18 h gesammelt. Urinmenge, Natrium, Kalium, Kalzium, Chlor und Kreatinin wurden bestimmt. Alle Werte wurden pro Gramm Körpergewicht pro 18 h berechnet. Unter Normalbedingungen ergaben sich bis auf die Kalzium-Ausscheidung keine statistisch signifikanten Unterschiede in den oben aufgelisteten Urinparametern innerhalb und zwischen beiden Gruppen (Tabelle 3-1, Abbildung 3-11). Die Kalzium-Ausscheidung war bei den Ni3-V2R Ratten im Vergleich zu den SD Kontrollen signifikant erhöht.

3.4.2 Durstversuch

Es wurden dieselben zwei Gruppen von je 5 Tieren (Ni3-V2R vs. SD Ratten) auf die in 3.4.1 genannten Urinparameter untersucht. Die Ni3-V2R Ratten zeigten im 18 h-Durstversuch eine signifikante Erhöhung der Urinmenge um 60% im Vergleich zum Kontrollzustand. Die Urinmenge bei den Ni3-V2R Ratten stieg signifikant um 230% im Vergleich zu den SD Ratten. Bei den durchschnittlichen Werten der Urinparameter (Tabelle 3-1, Abbildung 3-11) traten bei den SD Ratten im Durstversuch verglichen mit dem Kontrollzustand keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Bei den Ni3-V2R Ratten waren die Natrium-, Chlorid- und Kaliumausscheidungswerte im Durstversuch signifikant um jeweils 170%, 109% und 53% erhöht. Die Kreatininausscheidung war um 25% signifikant erniedrigt. Im Vergleich zum Durstversuch der SD Ratten waren die Natrium-, Chlorid- und Kaliumausscheidung der Ni3-V2R Ratten signifikant um 140%, 94% und 116% erhöht und die Kreatininausscheidung signifikant um 63% erniedrigt.

Tabelle 3-1: Charakterisierung der Nierenfunktion (SD- vs. Ni3-V2R Ratten). Physiologische Urinparameter bei Wasser und Futter (Kontrollzustand) vs. Durstversuch bei freiem Zugang zu Futter. Gemessen in einem Zeitraum von 18 h. MW±SD. Alle Werte sind auf Körpergewicht (kg) in Gramm bezogen.

*, $p < 0,05$ innerhalb der Gruppe (Kontrollversuch vs. Durstversuch)

§, $p < 0,05$ zwischen den Gruppen (SD Ratten vs. Ni3-V2R Ratten)

gemessener Urinparameter:	SD Ratte (n=5)		Ni3-V2R Ratte (n=5)	
	Kontrollzustand	Durstversuch	Kontrollzustand	Durstversuch
Urinmenge, g/kg	42,96±27,30	26,37±7,09	53,79±8,64	85,02±8,17§*
Natriumausscheidung, mmol/kg	1,68±0,45	1,73±1,29	1,54±1,29	4,15±0,78§*
Chloridausscheidung, mmol/kg	1,90±0,41	1,86±0,39	1,72±0,68	3,61±0,73§*
Kalziumausscheidung, mmol/kg	0,03±0,01	0,02±0,01	0,10±0,03§	0,14±0,06§
Kaliumausscheidung, mmol/kg	3,81±0,87	3,19±0,36	4,50±1,58	6,88±1,09§
Kreatininausscheidung, mmol/kg	0,62±0,27	0,81±0,22	0,40±0,05	0,30±0,04§*

Ergebnisse

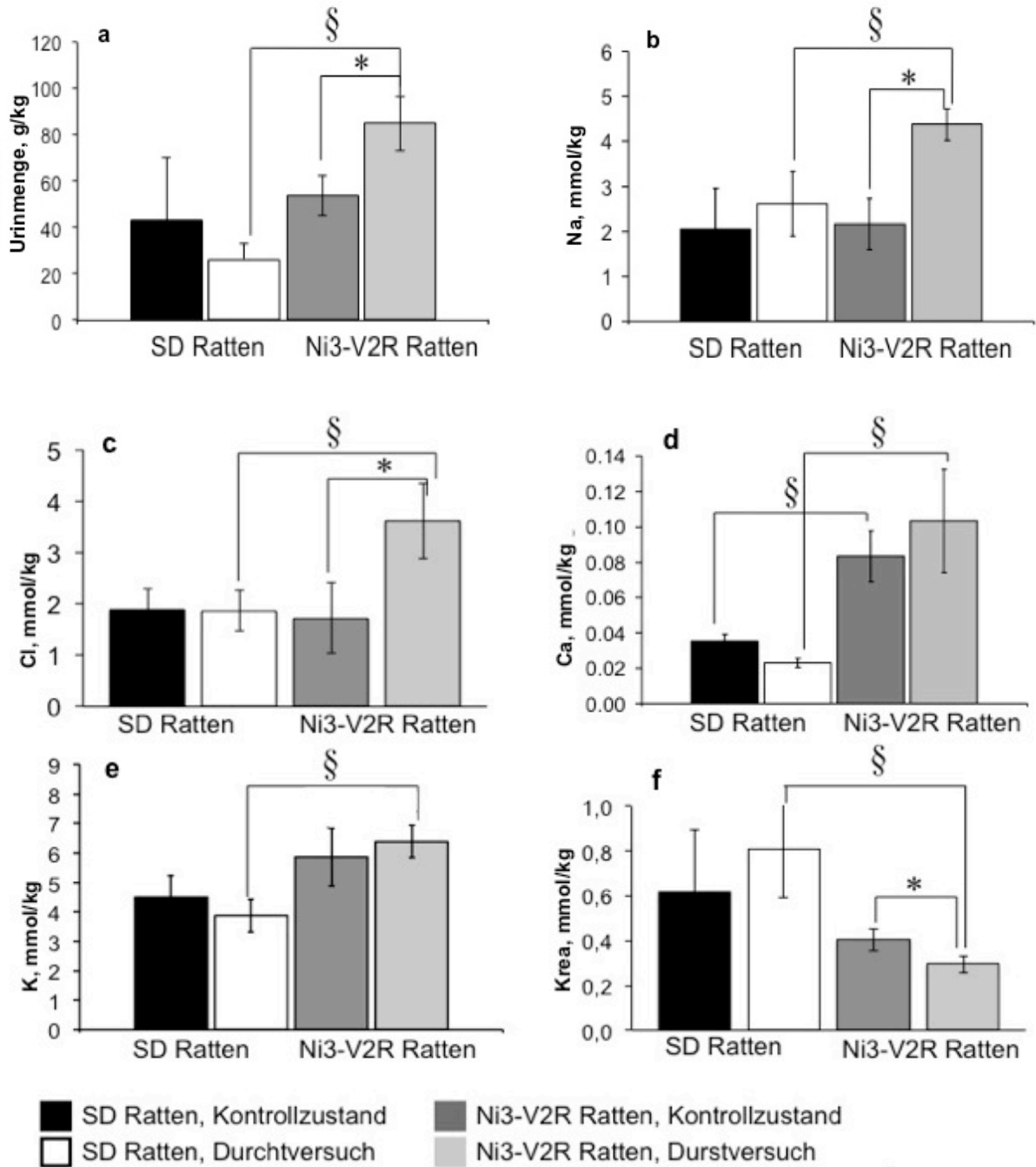


Abbildung 3-11: Auswertung des physiologischen Wasser- und Elektrolythaushalts (SD vs. Ni3-V2R Ratten). (a) Urinmenge, (b) Natriumausscheidung, (c) Chlorausscheidung, (d) Kalziumausscheidung, (e) Kaliumausscheidung und (f) Kreatininausscheidung.

*, $p < 0,05$ innerhalb der Gruppe (Kontrollversuch vs. Durstversuch)

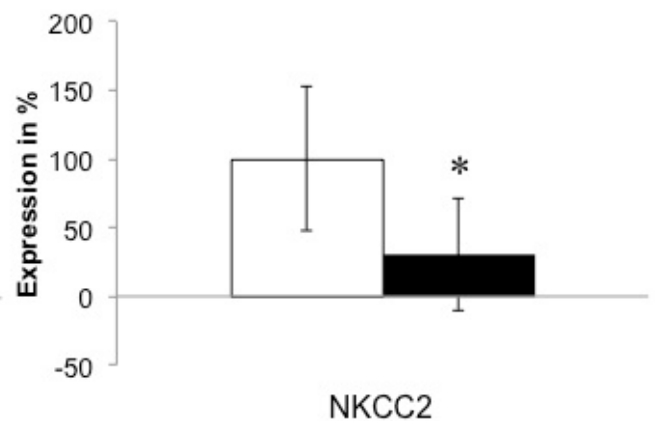
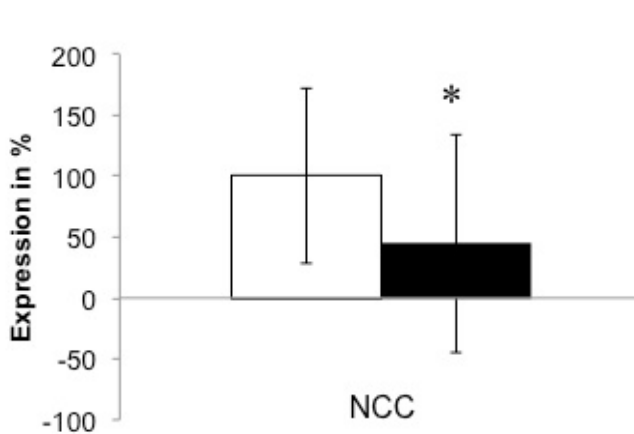
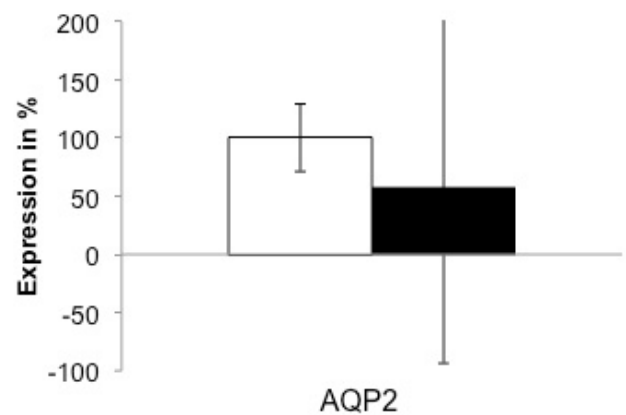
§, $p < 0,05$ zwischen den Gruppen (SD Ratten vs. Ni3-V2R Ratten)

3.5 Expression der Ionentransporter

3.5.1 mRNA-Transkriptionsraten in TaqMan® qPCR

Zur Ermittlung der mRNA-Transkriptionsraten der Transporter NCC, NKCC2 und AQP2 in Ni3-V2R Rattennierengewebe wurde eine TaqMan® qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 dargestellt. Die Expression von AQP2 mRNA im Ni3-V2R Rattennierenhomogenat war erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Die Expressionsraten von NKCC2 und NCC waren im Ni3-V2R Rattennierengewebe im Vergleich zu den SD Ratten signifikant erniedrigt.

mRNA-Expression von:	SD Ratten (n=5)	Ni3-V2R Ratten (n=5)
AQP2 in %	100 ± 28,57	57,83 ± 151,42
NCC in %	100 ± 52,18	30,14 ± 40,92*
NKCC2 in %	100 ± 89,24	44,88 ± 71,51*



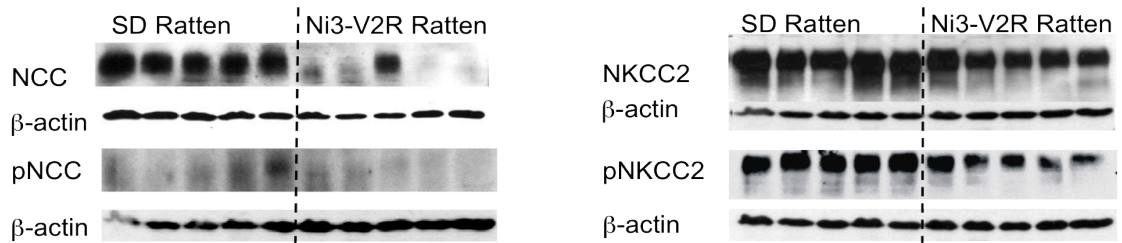
□ SD Ratten ■ Ni3-V2R Ratten

Abbildung 3-12: QPCR-Analyse zur Bestimmung der renalen mRNA-Expressionsraten von NCC, NKCC2 und AQP2. Alle Werte auf GAPDH normalisiert. Die in den SD Ratten (Kontrolle) detektierten mRNA-Raten sind gleich 100% gesetzt. MW± SD. *p < 0,05

3.5.2 Western blot-Ergebnisse

Für die Bestimmung der Proteinmengen von NKCC2, NCC, pNKCC2 und pNCC unter Kontrollbedingungen wurden *Western blots* durchgeführt. Es wurden Gesamtnierenhomogenate von jeweils 5 SD- und Ni3-V2R Ratten eingesetzt. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper wurden immunreaktive Banden entsprechend den publizierten Proteingrößen, dargestellt in Tabelle 2-3, detektiert. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet, entsprechend mit β -Actin normalisiert und in Abbildung 3-13 zusammengefasst. Die Mengen von NCC, pNCC, NKCC2 und pNKCC2 in den Nierengeweben von Ni3-V2R Ratten waren im Vergleich zu den SD Ratten erniedrigt; die von pNCC, NKCC2 und pNKCC2 signifikant erniedrigt.

a



b

Expression von:	SD Ratte (n=5)	Ni3-V2R Ratte (n=5)	Expression von:	SD Ratte (n=5)	Ni3-V2R Ratte (n=5)
NCC in %	100 ± 11,8	62,4 ± 11,1	NKCC2 in %	100 ± 17,3	43,7 ± 23,6 *
pNCC in %	100 ± 27,7	20,4 ± 19,8 *	pNKCC2 in %	100 ± 7,9	47,4 ± 15,3 *

c

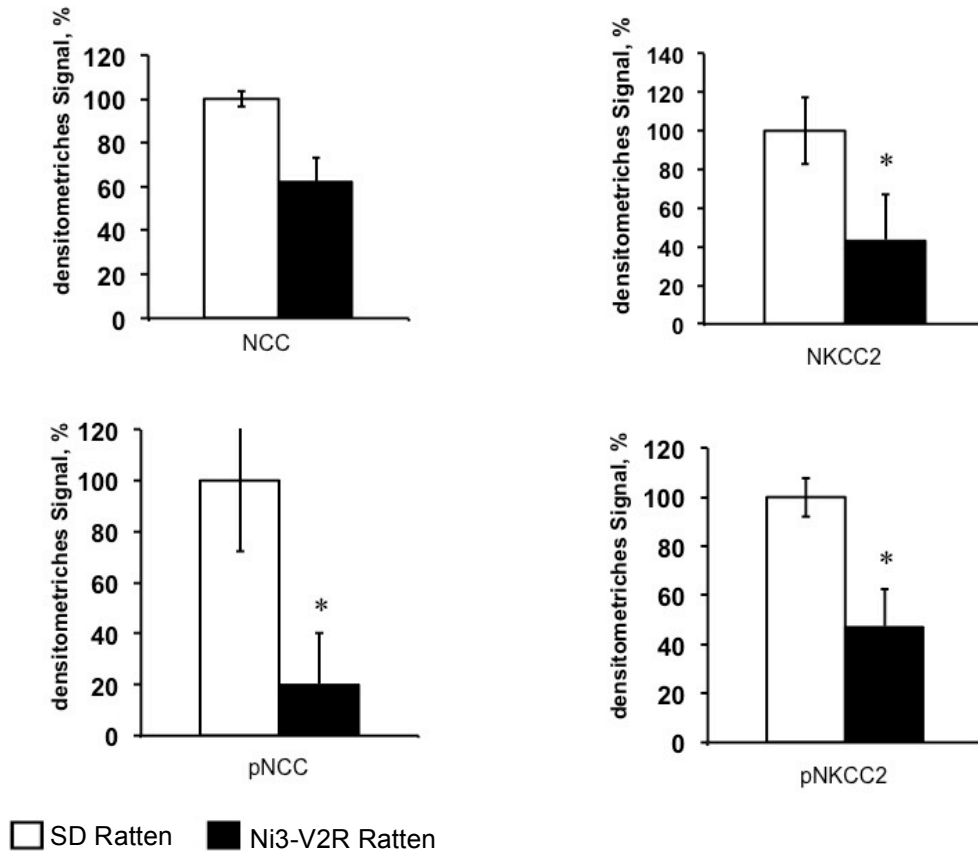


Abbildung 3-13: Expressionsraten von NCC, pNCC, NKCC2 und pNKCC2 von SD Ratten im Vergleich zu Ni3-V2R Ratten im *Western blot*. (a) Gezeigt sind repräsentative *Western blot*-Aufnahmen von NCC, pNCC, NKCC2 und pNKCC2 sowie β -Actin als Ladekontrolle. (b) Densitometrische Auswertung der *Western blots*. Alle Werte wurden auf β -Actin normalisiert. Die bei den SD Ratten (Kontrolle) densitometrisch bestimmten Expressionsraten der Proteinmenge wurden gleich 100% gesetzt. MW \pm SD. *p < 0,05. (c) Visualisierung der in (b) aufgeführten Auswertung. *p < 0,05.

3.6 Charakterisierung der THP- und EGF-mRNA-Expression in Ni3-V2R Ratten mittels *in situ*-Hybridisierung

Um die Expression der mRNA von weiteren im TAL der Niere exprimierten Proteinen zu charakterisieren, wurde an präparierten Nierengewebschnitten von SD- (Kontrolle) und Ni3-V2R Ratten eine *in situ*-Hybridisierung mit THP- und EGF-Riboprobe durchgeführt. In Abbildung 3-14 kann man sehen, dass bei den SD Ratten starke Signale für die THP- und EGF-mRNA-Expression detektiert wurden. Bei den Ni3-V2R Ratten konnten für die mRNA-Expression von THP und EGF nur abgeschwächte Signale detektiert werden.

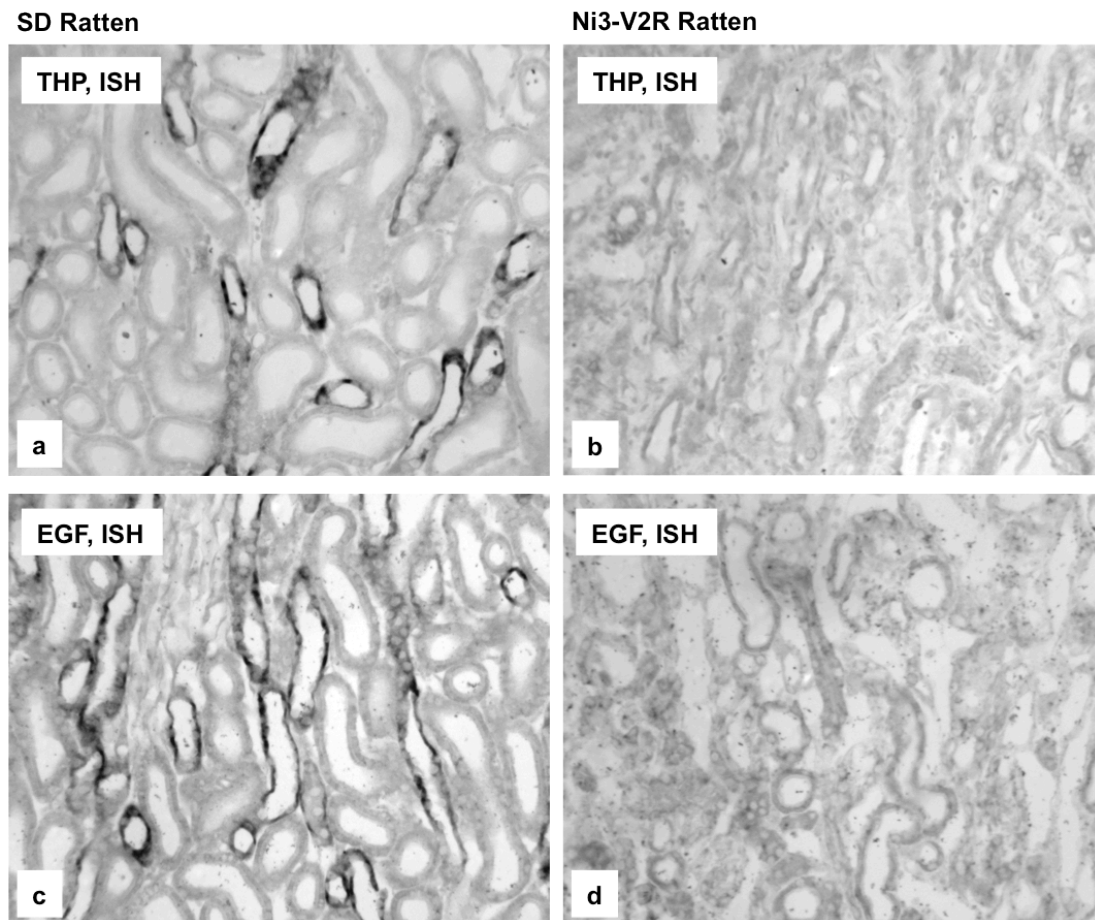


Abbildung 3-14: *In situ*-Hybridisierung von THP und EGF. (a, c) Starke Signale für THP und EGF auf repräsentativen SD Rattennierengewebschnitten (Kontrolle). (b, d) Abgeschwächte Signale für THP und EGF auf repräsentativen Ni3-V2R Rattennierengewebschnitten.

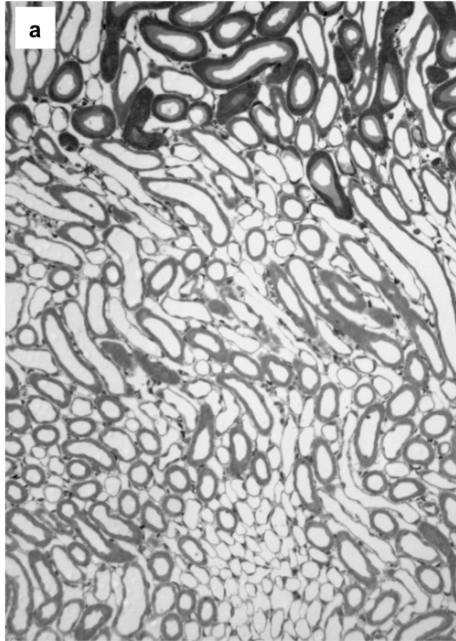
3.7 Morphologische Charakterisierung der Ni3-V2R Rattenniere

Für die morphologische Untersuchung der Ni3-V2R Rattenniere wurden Aufnahmen des Nierenmarks von Ni3-V2R Rattennieren vergleichend zu SD Rattennieren gemacht. Die beiden Aufnahmen (a) und (b) in Abbildung 3-15 zeigen den Innenstreifen des Nierenmarks. Den Beginn des Innenstreifens erkennt man sowohl bei den SD Kontrollratten als auch bei

Ergebnisse

den Ni3-V2R Ratten an den proximalen Tubuli am oberen Bildrand. Bei den Ni3-V2R Ratten (b) sind im Vergleich zu den SD Kontrollen (a) die einzelnen Nephronabschnitte verändert und das Gewebe ist stellenweise fibrotisch. Die Aufnahmen (c) und (d) zeigen, höher aufgelöst, den Außenstreifen des äußeren Marks. Bei den SD Kontrollen (c) sind die distalen Tubuli und Sammelrohre klar erkennbar, dies gilt auch für die Ni3-V2R Ratten (d).

SD Ratten



Ni3-V2R Ratten

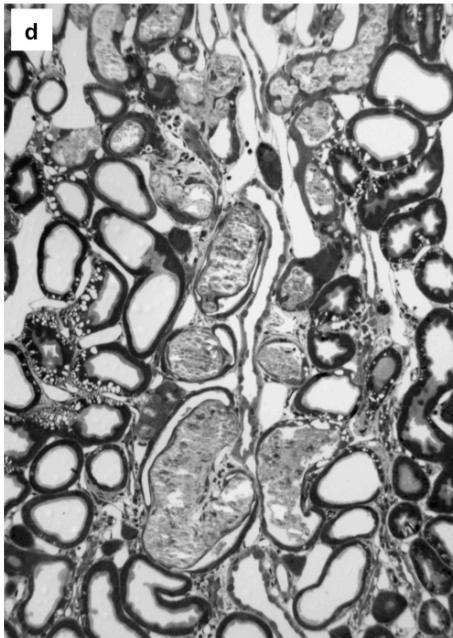
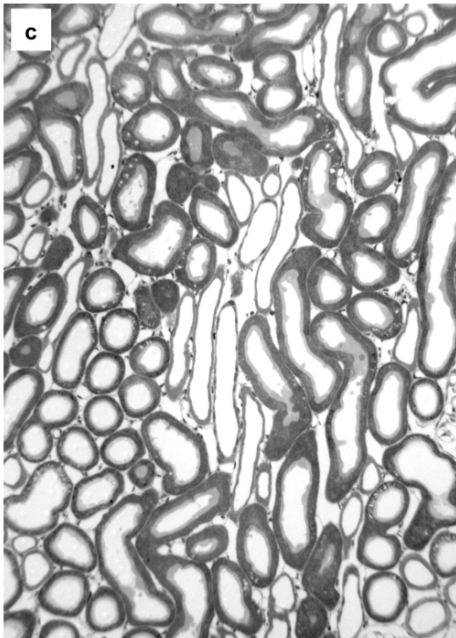
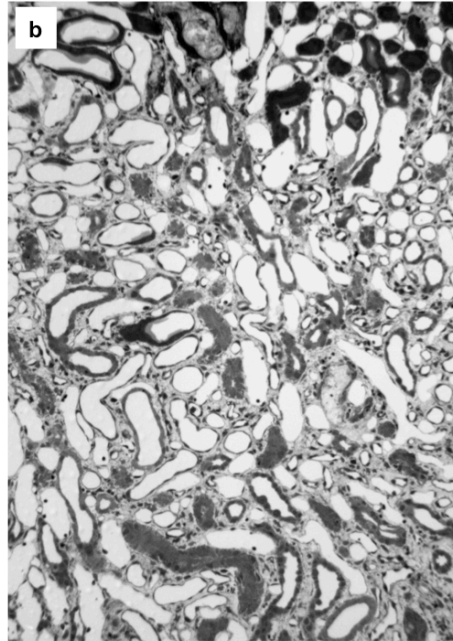


Abbildung 3-15: Morphologische Charakterisierung der SD Kontrollrattenniere im Vergleich zu Ni3-V2R Ratten, 4 Monate alte Tiere. (a, b) Innenstreifen des äußeren Nierenmarks. (c, d) Querschnitt durch das innere Mark. (a, c) Regelrechte Morphologie von Innenstreifen und Außenstreifen in den Nieren von SD Ratten (Kontrolle). (b, d) Gestörte Morphologie von Innenstreifen und Außenstreifen von Ni3-V2R Ratten, Nierengewebe fibrotisch.

4. Diskussion

4.1 Generierung und Verifizierung eines polyklonalen Antikörpers gegen V2R

4.1.1 Generierung des polyklonalen Ni3-V2R Antikörpers

Mit dem für diese Arbeit generierten anti-V2R-Antikörper konnte erstmalig ein überzeugender immunhistochemischer Nachweis für die Expression von V2R im TAL auf Proteinebene generiert werden. Diese Ergebnisse passen nun in das Gesamtbild und stimmen mit sämtlichen anderen Daten zur Expressionsanalyse wie qPCR, reverse Transkriptase PCR, *in situ*-Hybridisierung und PCR aus dieser und aus anderen Arbeiten überein. Bisher konnten keine zusammenpassenden Ergebnisse über die Expression im TAL generiert werden. Antikörper, die immunhistochemisch V2R im Sammelrohr detektieren konnten, vermochten dies aber nicht im TAL, obwohl in der gleichen Arbeit mittels reverser Transkriptase PCR der Nachweis von V2R auf RNA-Ebene geliefert wurde (Fenton et al., 2007). In anderen Arbeiten konnte ebenfalls mittels *in situ*-Hybridisierung der Nachweis für die Expression von V2R im TAL geliefert werden, allerdings war auch hier die Verifizierung auf Proteinebene mittels IHC nicht eindeutig (Mutig et al., 2007). Da nun bisher die kommerziell erhältlichen Antikörper bzw. von anderen Gruppen generierten Antikörper gegen V2R kontroverse Daten im *Western blot* und in der Immunhistochemie lieferten und für diese Arbeit aber ein zuverlässiger Antikörper notwendig war, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Pineda ein verbesserter, Peptid-basierter polyklonaler Kaninchenantikörper generiert. Die jeweiligen *Western blots* wurden mit Maus- und SD Rattennierenhomogenaten durchgeführt; die Immunhistochemie mit Schnitten von Maus- und SD Rattennieren. Die Präimmunseren zeigten keine Bindung eines Antikörpers um 50 kDa im *Western blot*. Somit konnten unspezifische Bindungen eines schon in den Tieren vorhandenen Antikörpers gegen ein eventuelles anderes Protein in diesem Größenbereich ausgeschlossen werden. Auch die Immunhistochemie lieferte keine unspezifischen Signale nach Inkubation mit den Präimmunseren. Abbildung 3-1 zeigt, dass nach 120 Tagen das Serum eines Kaninchens im *Western blot* vor allem bei den Homogenaten der SD Rattenniere die intensivsten Signale lieferte; dieses wurde somit als das geeignetste Serum verwendet. Die Seren der anderen Tiere zeigten nur eine geringe Anreicherung des Antikörpers und wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.1.2 Verifizierung des generierten anti-V2R-Antikörpers

Das am spezifischsten reagierende Serum wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt und der resultierende anti-V2R-Antikörper mit 3 verschiedenen Methoden verifiziert. Es

wurde zunächst ein *Western blot* mit dem anti-V2R-Antikörper auf Nierenhomogenaten von WT- und V2R-*knockout* Mäusen durchgeführt, um dessen Spezifität weiter zu überprüfen. Das Ergebnis zeigt in Abbildung 3-2, dass der Antikörper im Bereich um 50 kDa nur auf den Nierenhomogenaten der WT Mäuse die glykosylierte und nicht-glykosylierte Form von V2R detektierte. Es zeigte sich keine Detektion im Bereich um 50 kDa auf den Nierenhomogenaten der V2R-*knockout* Mäuse. Dies bedeutet, dass der anti-V2R-Antikörper im *Western blot* nur V2R detektiert.

Die nachfolgende immunhistochemische Verifizierung untermauerte diese Ergebnisse. Es wurden TAL-Zellen mit V2R-GFP und als Kontrolle mit THP-GFP transfiziert. Die Ergebnisse in Abbildung 3-3 zeigen, dass der anti-V2R-Antikörper spezifisch V2R auf Zellen detektiert, die mit V2R-GFP transfiziert wurden. Der anti-V2R-Antikörper lieferte keine Signale auf Zellen, bei denen man kein GFP-Signal detektieren konnte. Ebenso gab es kein Signal bei der Negativkontrolle, den mit THP-GFP transfizierten Zellen.

Die Lokalisation von V2R im Nephron mittels des anti-V2R-Antikörpers stellte eine weitere Verifizierung der Spezifität dar. Es wurde eine Immunhistochemie auf SD Rattennierenschnitten durchgeführt. Für die Lokalisation von V2R im TAL, distalen Konvolut und Sammelrohr wurden die Markerproteine NKCC2, NCC und AQP2 komarkiert. In Abbildung 3-4 wurden die Ergebnisse zusammengefasst: In allen drei Abschnitten des Nephrons lieferte der generierte anti-V2R-Antikörper ein Signal zusammen mit den spezifischen Markerproteinen der jeweiligen Abschnitte. Erstmals konnte nun ein Antikörper gegen V2R generiert werden, der nicht nur V2R im Sammelrohr und Verbindungstubulus sondern auch im TAL und distalen Konvolut detektiert. Die kontroversen Ergebnisse aus anderen Arbeiten konnten nun mit Hilfe dieses Antikörpers geklärt werden.

Der in dieser Arbeit generierte anti-V2R-Antikörper lieferte zum ersten Mal den soliden Beweis auf Proteinebene, dass V2R im TAL exprimiert wird. Der anti-V2R-Antikörper kann im *Western blot*, in der Immunhistochemie auf Gewebeschnitten und TAL-Zellen zuverlässig eingesetzt werden. Im *Western blot* detektiert dieser die nicht-glykosylierte und glykosylierte Form des V2R im TAL, distalen Konvolut und Sammelrohr.

4.2 Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratte

4.2.1 Strategie und Verifizierung des Ni3-V2R Konstrukts

Der X-chromosomal vererbte NDI ist eine seltene genetische Erkrankung. Aufgrund der unterschiedlichen Arten von NDI ist es schwierig die Ursache medikamentös zu behandeln. 10% aller NDI-Erkrankungen haben einen AQP2-Gendefekt als Ursache, welcher zu einer pathologischen Konformationsänderung des Kanals führt (Deen et al.,1998). Bei 90% aller NDI-Erkrankungen sind die Ursachen Mutationen des V2R-Gens auf dem X-Chromosomen.

Diskussion

Derzeit sind mehr als 200 Mutationen beschrieben (Bichet et al., 2006). Diese Mutationen haben eine gravierende Störung des Rezeptor-Signalwegs zur Folge, da der V2R nicht mehr sensitiv auf AVP reagiert. Die Differentialdiagnose bei einer an NDI erkrankten Person, verursacht entweder durch eine Mutation im AQP2- oder im V2R-Gen, erfolgt durch die Gabe von dDAVP. Patienten mit einem AQP2-Defekt reagieren auf die Gabe, Patienten mit V2R-Defekt nicht. Therapeutisch können Patienten mit dieser Krankheit nur symptomatisch behandelt werden. Die Polyurie kann mittels Thiazid-Diuretika verbessert werden. Bei Behandlung von Hypernatriämie wird eine natriumarme Diät empfohlen. Thiazid-Diuretika und Natriumrestriktion verursachen eine leichte Hypovolämie, weshalb mehr Wasser in der Niere retiniert wird (Knoers et al., 1996). Für die Bekämpfung der molekularen Ursachen gibt es bereits erste Studien, bei denen Patienten mit Chaperonen behandelt wurden, um der Fehlfaltung der Proteine entgegenzuwirken und sie somit funktionstüchtig zu machen (Bernier et al., 2006). Eine Differentialdiagnose zwischen den unterschiedlichen Mutanten des V2R sowie auch die Therapie von NDI sind schwierig, da noch nicht alle Fakten der Krankheit erforscht sind. Vor allem die Rolle und dementsprechend die Pathologie des V2R im distalen Abschnitt des Nephrons ist weitgehend unbekannt. Für die Aufklärung standen bisher nur wenige Tiermodelle zur Verfügung. Für den zentralen Diabetes insipidus wurde das Brattleboro-Rattenmodell entwickelt. Diese Ratten sind nicht in der Lage AVP zu produzieren (Valtin et al., 1962). Für den NDI konnte bisher ein V2R-*knockout* Mausmodell generiert werden, bei welchem allerdings alle V2R ausgeschaltet sind (Li et al., 2009). Es gibt außerdem die Möglichkeit, bei Ratten NDI pharmakologisch zu erzeugen. Es ist bekannt, dass Lithium über den Amilorid-sensitiven epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) NDI verursacht, wobei es zu Polyurie, Abregulation von AQP2 und einer Umstrukturierung des Sammelrohrs kommt (Christensen et al., 2011). Allerdings sind die Nebenwirkungen von Lithium hoch. Es kann zu Leber- und Herzschädigungen und Veränderungen des Bluts kommen (Ahmad et al., 2011). Die Rolle von V2R und seine Pathologie im TAL der Niere ist weitgehend unerforscht. Für die Generierung spezifischer transgener Rattenmodelle, die einen V2R-Defekt ausschließlich im TAL aufweisen, wurde sich in dieser Arbeit zunutze gemacht, dass V2RS dominant-negativ wirkt und Dimere mit V2R bildet (Zhu et al., 1998). In dieser Arbeit wurde eine transgene Ratte generiert, welche V2RS im TAL unter Kontrolle des THP-Promoters überexprimiert und somit ein Fehlen des V2R im TAL simuliert. Die Ratten, welche V2RS überexprimieren, wurden in dieser Arbeit Ni3-V2R Ratten genannt. Diese Bezeichnung wurde an die Veröffentlichung von Zhu et al., 1998 angelehnt: Ni3 bezieht sich auf das Fehlen der dritten intrazellulären Schleife von V2R (Abbildung 1-4). Mittels gezielter Mutagenese konnte das Ni3-V2R Fragment kloniert werden. Der Restriktionsverdau (Abbildung 3-5) und die anschließende Sequenzierung dienten als Nachweis für das richtige Fragment. Das Konstrukt wurde in Ratteneizellen injiziert und mehrere Nachkommen

generiert.

4.2.2 Verifizierung der nierenspezifischen Expression des Ni3-V2R Konstrukts

Neben regelmäßigen Genotypisierungen der gezüchteten Ni3-V2R Ratten musste man mittels PCR und *in situ*-Hybridisierung sichergehen, dass das Ni3-V2R Konstrukt bzw. V2RS nur in der Niere und nicht in anderen Organen exprimiert wurde. Für die PCR wurden Herz, Leber und Niere von genotypisch positiv getesteten Ni3-V2R Ratten auf die Expression des Ni3-V2R Fragments mittels PCR überprüft. Abbildung 3-6 zeigt, dass das Ni3-V2R Fragment spezifisch nur in der Niere exprimiert wurde. In Herz und Leber konnte das Ni3-V2R Fragment mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Die Nierenhomogenate der SD Kontrollen waren in der PCR ebenfalls negativ; auch hier wurde das Ni3-V2R Fragment nicht detektiert. Zur weiteren Verifizierung wurde eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Mit spezifischen V2R-Sonden konnte auf präparierten Gewebeschnitten von SD Rattennieren als Kontrolle und Ni3-V2R Rattennieren die mRNA-Expression von V2R nachgewiesen werden. Die qualitative Auswertung der V2R-mRNA Signale zeigte eine stärkere Expression von V2R-mRNA auf den Gewebeschnitten der Ni3-V2R Ratten im Vergleich zu den SD Kontrollen (Abbildung 3-7). Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung lieferten einen weiteren Beweis für die erfolgreiche Generierung des transgenen Ni3-V2R Rattenmodells.

4.3 Verifizierung der V2RS-Überexpression im Ni3-V2R Rattenmodell

Nach der Sicherstellung, dass das Ni3-V2R Konstrukt in den Ni3-V2R Ratten nur in der Niere exprimiert wurde und die V2R-mRNA-Transkriptmengen in den Nieren der Ni3-V2R Ratten sehr hoch waren, wurde verifiziert, dass es auch V2RS war, der überexprimiert wurde. Zur Überprüfung der Überexpression von V2RS in den Ni3-V2R Ratten wurden *Western blots* mit Gesamtnierenhomogenaten durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 3-8 zeigen, dass im Gesamthomogenat der Ni3-V2R und SD Rattennieren mittels *Western blot* spezifische Banden für V2R im Bereich von 50 kDa detektiert wurden. Das Gesamtnierenhomogenat der Ni3-V2R Ratten lieferte jedoch eine zusätzliche Bande im Bereich von 30 kDa, welche auf eine Überexpression von V2RS schließen ließ und bei den SD Kontrollen fehlte. Bei der qualitativen Auswertung der *Western blot*-Aufnahme sah man, dass die Expression von V2R in den SD Kontrollen und in den Ni3-V2R Ratten gleich war. Die Überexpression von Ni3-V2R führt also zu keiner geringeren Expression des funktionellen V2R im Gesamtnierenhomogenat. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für

alle weiteren Experimente. Es war nun erwiesen, dass V2RS in der Niere der Ni3-V2R Ratten auch auf Proteinbasis exprimiert und somit der gewünschte Defekt im TAL erzielt wurde. Als weiterer Nachweis der Überexpression von V2R dienten Immunfärbungen von V2R im TAL und frühen distalen Konvolut auf Gewebeschnitten von Ni3-V2R und SD Ratten. Um sicherzugehen, dass die Aufnahmen mit den Markierungen auch aus dem TAL bzw. distalen Konvolut stammten, wurden auf den Schnitten NKCC2 bzw. NCC komarkiert. In Abbildung 3-9 wurden Abschnitte des TAL und in Abbildung 3-10 Abschnitte des distalen Konvoluts dargestellt. Der anti-V2R-Antikörper lieferte im TAL der Ni3-V2R Ratten ein stärkeres Signal für den V2R als in den SD Kontrollen. Das Signal für den NKCC2 war im TAL der Ni3-V2R Ratten stärker. Im distalen Konvolut der Ni3-V2R Ratten war die Signalstärke für den V2R auch höher als auf den Nierengewebeschnitten der SD Kontrollen. NCC hingegen war im distalen Konvolut der Ni3-V2R Ratten etwas schwächer exprimiert als in den SD Kontrollratten. Die stärkeren Signale für V2R im TAL und distalen Konvolut wiesen auf eine höhere Expression von V2RS in diesen Abschnitten des Nephrons hin. Da im *Western blot* das Signal für den V2R in den Ni3-V2R Ratten und den SD Kontrollen gleich war, kann man davon ausgehen, dass die stärkeren Signale bei den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie im Bereich des TAL von einer Überexpression des V2RS verursacht wurden. Diese Ergebnisse verifizierten ebenfalls den Erfolg der Generierung des Ni3-V2R Rattenmodells und somit eine Überexpression von V2RS im TAL. Die Ergebnisse von Restriktionsverdau, Sequenzierung, Genotypisierung, *in situ*-Hybridisierung, Immunhistochemie und PCR zeigten, dass die Generierung der transgenen Ni3-V2R Ratten erfolgreich war; es wurde das richtige Fragment in das Genom der Ni3-V2R Ratten integriert und eine Überexpression von V2RS im TAL nachgewiesen. Die Überexpression des V2RS ausschließlich im TAL wurde durch den THP-Promotor kontrolliert.

4.4 Physiologische Untersuchungen des transgenen Rattenmodells

Die bisher dargestellten und diskutierten Ergebnisse zeigten eine Überexpression von V2RS im TAL und im frühen distalen Konvolut, aber keine Veränderung im Sammelrohr. Somit konnte man mit dem Ni3-V2R Rattenmodell erstmalig die Rolle von V2R im distalen Nephron für den Harnkonzentrationsmechanismus separat evaluieren. Die folgenden physiologischen Daten zeigen, dass es bei den Ni3-V2R Ratten zu einer Harnkonzentrationsstörung gekommen ist, die teilweise ebenfalls als Symptome bei dem NDI auftreten. Dies bestätigt, dass AVP im distalen Abschnitt des Nephrons eine wesentliche Funktion bei der Harnkonzentrierung hat und auch zu der Pathologie des NDI beitragen kann.

Zur Untersuchung der physiologischen Urinparameter wurden für 18 h je 6 SD- und Ni3-V2R Ratten einmal mit Zugang zu Wasser und Futter (Kontrollversuch) und 18 h ohne Zugang zu Wasser (Durstversuch) aber mit Zugang zu Futter in Stoffwechsellkäfigen untergebracht. Die physiologischen Urinparameter der SD Kontrollratten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Kontrollversuch verglichen mit dem Durstversuch innerhalb der Gruppe. Die Nieren der SD Kontrollratten konnten den Urin während des Durstzustandes normal aufkonzentrieren; die SD Ratten schieden zwar weniger Urin aus, aber ohne signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe. Im Kontrollversuch der transgenen Ni3-V2R Ratten war im Vergleich zum Kontrollversuch der SD Ratten nur die Kalziumausscheidung signifikant erhöht. Im Durstversuch zeigten physiologische Urinparameter der Ni3-V2R Ratten signifikante Unterschiede im Kontrollversuch verglichen mit dem Durstversuch innerhalb der Gruppe. Urinmenge, Natrium-, Chlorid-, Kalium- und Kreatininausscheidung waren signifikant erhöht. Bei Durstbedingungen waren die Nieren der Ni3-V2R Ratten also nicht in der Lage Natrium, Chlorid und Kalium adäquat zu reabsorbieren. Dieser Effekt bestätigt frühere *in vitro* Daten: der V2R aktiviert im TAL normalerweise mittels G-Protein gekoppeltem Signalweg über cAMP den NKCC2 (Caceres et al., 2009; Gamba et al., 1994; Herbert et al., 1981). Da aber V2R bei den Ni3-V2R Ratten im TAL inaktiviert wurde, kann dieser auch nicht über die Signalkaskade mittels Phosphorylierung NKCC2 aktivieren. Natrium, Chlorid und Kalium können also im TAL nicht adäquat rückresorbiert werden. Die Ergebnisse dieser physiologischen Untersuchung verifizierten das Ni3-V2R Rattenmodell und lieferten auch wichtige Aufschlüsse über den V2R im TAL *in vivo*. Die Erhöhung der Kaliumausscheidung bei den Ni3-V2R Ratten könnte auf eine verminderte Aktivierung und Funktion des NKCC2 zurückzuführen sein. Gallazzini et al. 2006 zeigten, dass eine Erhöhung der NaCl Konzentration im Primärharn zu einer verminderten Transkription von *rat outer medullary K⁺ channel (ROMK)-mRNA* führt. Mit einer erhöhten Konzentration der Elektrolyte im Primärharn der Ni3-V2R Ratten im Durstversuch ließe sich auch das höhere Urinvolumen im Durstversuch bei diesen Tieren erklären. Der verringerte Transport der Elektrolyte im TAL dürfte das Gegenstromprinzip der Harnkonzentrierung in seiner Effizienz verringert haben (Sands et al., 1996) Wasser dürfte nur noch verringert über AQP1 im dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife ins Interstitium des inneren Marks diffundiert und damit im Primärharn verblieben sein. Auch für die Sammelrohre fehlte vermutlich durch die geringe osmotische Konzentration im Mark die Antriebskraft, um über AQP2 Wasser aus dem Primärharn in das Interstitium zu transportieren. Abbildung 4-1 fasst die beobachteten Veränderungen auf Signaltransduktionsebene in der TAL-Zelle schematisch zusammen.

4.5 Expression der Ionentransporter

Zur Verifizierung der physiologischen Daten auf molekularer Ebene wurden die mRNA-

Transkriptionsraten der Ionenporter AQP2, NCC, NKCC2 und die Proteinmengen von NCC pNCC, NKCC2 und pNKCC2 untersucht. Für die qPCR wurde jeweils aus 5 Nieren von SD Kontrollratten und Ni3-V2R Ratten die mRNA extrahiert und mittels reverser Transkription umgeschrieben. Mit der gewonnenen cDNA wurde eine qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 3-12 zeigen, dass die mRNA-Transkriptionsraten von AQP2 geringfügig, jedoch nicht signifikant reduziert waren. Die mRNA-Transkriptionsraten von NCC und NKCC2 waren signifikant erniedrigt. Durch die Hemmung der mRNA-Transkription ist es zu einer Abregulation der Expression von AQP2, NCC und NKCC2 gekommen. Wenn in den Ni3-V2R Ratten weniger NKCC2- und NCC-mRNA transkribiert und translatiert wurde, standen vermutlich auch weniger Transporter für die Aktivierung durch V2R zur Verfügung. Die Inaktivierung durch V2RS führte anscheinend schon zu einer Hemmung der Transporter-Produktion auf mRNA-Ebene im TAL; es wurden vermutlich Transkriptionsfaktoren gehemmt, welche die Transkription von NKCC2 und NCC initiieren. Bisher sind noch nicht viele Transkriptionsfaktoren bekannt, die einen Einfluss auf die Entwicklung des TAL und Expression der Ionenporter haben. Es wurde nur BRN1 als ein solcher Transkriptionsfaktor identifiziert. In der späten Entwicklung der Niere sorgt er für die Proliferation und Differenzierung der Zellen in der Henle-Schleife. Bei heterozygoten BRN1 defizienten Mäusen kam es zu einer regelrechten Nierenentwicklung, allerdings waren die für die NaCl-Absorption wichtigen Ionenkanäle NKCC2, Bsnd1 und Kcnj1 abreguliert (Nakai et al., 2003). Ein direkter Hinweis zu V2R fehlt zwar, jedoch kommt es sowohl bei Abregulation des Transkriptionsfaktors BRN1 als auch bei Fehlen des V2R im TAL zu einer verminderten Expression wichtiger Kanäle (Nakai et al., 2003). Die Ergebnisse der qPCR passen zu den Ergebnissen der physiologischen Untersuchungen.

Zur Charakterisierung der Proteinexpressionslevel von NKCC2, NCC, pNKCC2 und pNCC wurden mit jeweils 5 Nierenhomogenaten von SD Kontroll- und Ni3-V2R Ratten *Western blots* durchgeführt. Die Ergebnisse der *Western blots* in Abbildung 3-13 zeigen, dass es bei NCC aufgrund von Unterschieden innerhalb der Gruppe nur zu einer insignifikanten Variation in den Ni3-V2R Ratten im Vergleich zu den SD Kontrollratten gekommen ist. Die Proteinmengen von NKCC2, pNKCC2 und auch von pNCC waren in den Ni3-V2R Ratten jedoch signifikant geringer. Diese Ergebnisse sind mit den qPCR-Daten, den physiologischen Ergebnissen und auch den immunhistochemischen Untersuchungen im Einklang. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von NKCC2 - wie auch von NCC - essentiell für deren Aktivierung ist (Adragna et al., 2004; Gamba et al., 2005). An der Phosphorylierung bzw. Aktivierung von NKCC2 und NCC sind die beiden Kinasen SPAK und WNK3 beteiligt (Mercier-Zuber et al., 2011; Ponce-Coria et al., 2008). Ohne ihre Aktivierung kann der Transport von Natrium, Kalium und Chlorid nicht stattfinden. Meine Ergebnisse aus der qPCR und den *Western blots* zeigten, dass das Fehlen von V2R im TAL

zu einer Abregulation von pNKCC2 führten. Die Beteiligung von NCC mag an einer geringen Expression von THP im DCT liegen, in welchem das transgene Konstrukt auch wirksam sein könnte. Die in 4.4 dargestellten physiologischen Ergebnisse bestätigen daher die Schlussfolgerung, dass der AVP-V2R-Signalweg für den NKCC2-vermittelten Transportweg bedeutsam ist.

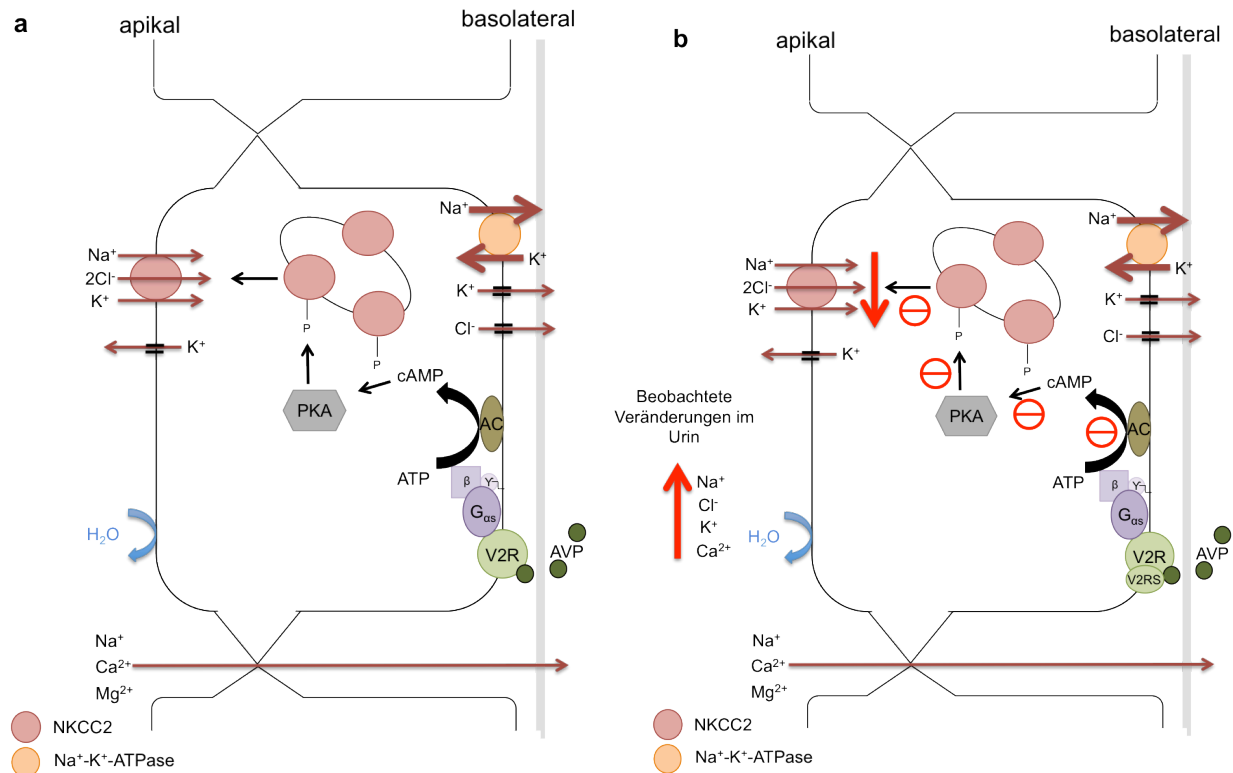


Abbildung 4-1: Einfluss von V2R auf die Signalkaskade in der TAL-Zelle. (a) Funktion von V2R im TAL. (b) Gestörte Signalkaskade aufgrund des V2RS-V2R Heterodimers. Verminderte cAMP-Bildung führt zu einer verminderten Aktivierung der PKA. Dies führt zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von NKCC2, was dann zu einer Erhöhung der Na⁺, Cl⁻, K⁺ und indirekt auch zu einer Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Urin führt. Dicke dunkelrote Pfeile stellen aktive Salztransporte, dünne dunkelrote Pfeile passive Transporte dar.

4.6 Charakterisierung der THP- und EGF-mRNA-Expression mittels *in situ*-Hybridisierung

EGF und THP sind neben NKCC2 ebenfalls charakteristische Proteine im TAL der Niere. EGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor vor allem während der embryonalen Differenzierung der Niere und wird im TAL exprimiert (Lee et al., 2004). THP wird in der Plasmamembran des TAL und dem frühen distalen Konvolut exprimiert und spielt eine Rolle bei der Exozytose von ROMK in die apikale Plasmamembran (Renigunta et al., 2011). Da diese beiden

Proteine eine Rolle im TAL spielen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung auf Nierenschnitten von Kontrollratten vergleichend zu den Ni3-V2R Ratten zur Charakterisierung der mRNA-Transkription und -Lokalisation dieser beiden Proteine durchgeführt. Die Ergebnisse der SD Kontrollratten in Abbildung 3-14 zeigen eine reguläre Expression sowohl von EGF als auch von THP im TAL. Bei den Ni3-V2R Ratten hingegen konnte weder für THP noch für EGF ein Signal detektiert werden. Die Inaktivierung von V2R im TAL könnte demnach auch zu einer Abregulation von EGF und THP führen. Da EGF eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Henle-Schleife spielt, könnten die morphologischen Ergebnisse, also die schlechter erkennbare Gliederung der einzelnen Nephronabschnitte, mit dieser Abregulation von EGF erklärt werden. Die Abregulation von THP ist nach eigenen Erkenntnissen unserer Gruppe kompatibel mit einer verringerten Funktion von NKCC2 (Mutig et al., 2007).

4.7 Morphologische Charakterisierung der Ni3-V2R Rattenniere

Zur weiteren Charakterisierung der Ni3-V2R Rattenlinie war auch die Morphologie von großem Interesse. Es sollte herausgefunden werden, ob sich durch die Überexpression von V2RS in den Ni3-V2R Rattennieren mikroskopisch sichtbare Veränderungen ergeben haben. Bei der morphologischen Untersuchung der Ni3-V2R Ratten wurden auf den Gewebeschnitten vor allem Bereiche des äußeren Nierenmarks mit denen von SD Ratten verglichen, da hier der Anteil an TAL vergleichsweise am höchsten ist (Abbildung 3-15). Hierbei fiel auf, dass altersabhängig jenseits des 4. Lebensmonats die einzelnen Nephronabschnitte (distale Tubuli, Sammelrohr) im Vergleich zu den SD Kontrollen in den Ni3-V2R Ratten zunehmend unklar identifizierbar waren. Auch war hier das Gewebe zunehmend mit fibrotischem Gewebe durchsetzt. Die Überexpression von V2RS führte also in der Ni3-V2R Rattenniere zunehmend mit dem Alter zu Fibrosen. Eine zunehmende, vermutlich ER-Stress-erzeugende Überexpression des Konstrukts könnte hierfür die Ursache sein

5. Zusammenfassung

Das hypophysäre Hormon Vasopressin (AVP) fördert über eine Aktivierung des Vasopressin Typ 2-Rezeptors (V2R) den Konzentrationsmechanismus des Urins. Die renale Expression des V2R ist im Sammelrohr, darüber hinaus jedoch auch im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (TAL) und im distalen Konvolut (DCT) des Nephrons lokalisiert. Mutationen, die das V2R-Gen inaktivieren, können zu Erkrankungen wie dem nephrogenen Diabetes insipidus mit schwerer Einschränkung des Konzentrationsmechanismus führen. Die Einflüsse von AVP auf die Funktion des distalen Tubulus lassen sich bisher nicht klar von denen auf das Sammelrohr trennen. Meine Arbeit konzentriert sich daher auf die Rolle des V2R-Signalwegs im distalen Nephron mit Bezug auf die hier lokalisierten Na-(K)-Cl Kotransporter. Meine Hypothese war, dass die Wirkung von AVP im distalen Nephron zur Harnkonzentrierung signifikant beiträgt.

Für meine Arbeit wurde ein eigener anti-V2R-Antikörper generiert, um die Verteilung des Rezeptors auf zellulärer Ebene entlang des Nephrons optimal zu charakterisieren. Für funktionelle Studien wurde ein transgenes Rattenmodell mit einer selektiven Überexpression einer dominant-negativen V2R-Mutation (Glu242 Stop) im TAL und frühen DCT unter Kontrolle des Promotors für das hier synthetisierte Tamm-Horsfall Protein (THP) generiert.

Mit Hilfe des anti-V2R-Antikörpers konnte in TAL, DCT und den Hauptzellen des Sammelrohrs in Rattennieren der V2R membranständig nachgewiesen werden. Die Überexpression des mutierten V2R in den transgenen Ratten konnte ebenfalls immunhistochemisch und im *Western blot* mit anti-V2R-Antikörper nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollratten zeigten die transgenen Ratten Polyurie (+25% im Kontrollzustand und +230% im Durstversuch über 18 h; $p < 0,05$). Die Na-(K)-Kotransporter des distalen Nephrons waren auf transkriptionaler Ebene und auf Protein-Ebene jeweils deutlich reduziert (NKCC2: jeweils -55% und -56%; NCC: jeweils -70% und -38%; $p < 0,05$). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Unterdrückung des V2R-Signalwegs im TAL und frühen DCT zu einer verringerten Harnkonzentrationsleistung führt. Sie erbringen weiterhin den Beweis, dass die Stimulierbarkeit des distalen Nephrons durch AVP eine bedeutende Rolle bei der renalen Harnkonzentrierung spielt.

6. Abstract

Vasopressin (AVP) promotes urinary concentration by activating type 2 AVP receptor (V2R) in the kidney. Renal expression of V2R is localized in the connecting tubule and collecting duct as the predominant sites of its action. Beyond this, V2R is further localized in the thick ascending limb (TAL) of the loop of Henle and in the distal convoluted tubule (DCT). Mutations, which inactivate the V2R gene, may cause disease such as nephrogenic diabetes insipidus, with massive impairment of the renal concentrating mechanism. However, the effects of AVP on the function of the distal nephron so far could not be distinguished clearly from those on the collecting duct. My work therefore focuses on the role of V2R signaling in the distal nephron. I followed the hypothesis that the effect of AVP in the distal nephron contributes substantially to the process of urine concentration. An anti-V2R antibody was generated to characterize the cellular distribution of the receptor along the nephron. For functional studies a transgenic rat model with selective overexpression of a dominant-negative V2R mutant (Glu242 stop) in TAL and early DCT was generated using the promoter of locally synthesized Tamm-Horsfall protein (THP) for site-directed overexpression. Immunohistochemical analysis using anti-V2R antibody produced basolateral signals in TAL, DCT, and principal CD cells in rat and mouse kidneys. Transgenic overexpression of the mutated V2R in rats was verified morphologically and immunoblotting with the anti-V2R antibody. The construct was expressed only in TAL and initial DCT. Compared to control rats, transgenic rats displayed polyuria (+25% at steady state and +230% under water deprivation for 18 h; $p < 0.05$). Transcriptional and protein levels of the major distal ion cotransporters were markedly reduced (NKCC2 -55% and -56%, respectively; and NCC -70% and -38%, respectively; $p < 0,05$). These data indicate that suppression of V2R signalling in TAL and early DCT results in impaired urine concentration. Data therefore demonstrate that stimulation of distal nephron NaCl transport by AVP plays a substantial role in the functioning of the renal concentrating mechanism.

7. Literaturverzeichnis

Adragna, N. C., Di Fulvio, M. & Lauf, P. K. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J. Membr. Biol* **201**, 109–137 (2004).

Ahmad, M., Elnakady, Y., Farooq, M. & Wadaan, M. Lithium induced toxicity in rats: blood serum chemistry, antioxidative enzymes in red blood cells and histopathological studies. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 272–277 (2011).

Bankir, L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res* **51**, 372–390 (2001).

Benninghoff, A. & Drenckhahn, D. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd. 1. (Urban & Fischer Bei Elsevier, 2003).

Bichet, D. G. [Nephrogenic diabetes insipidus]. *Nephrol. Ther* **2**, 387–404 (2006).

Caceres, P. S., Ares, G. R. & Ortiz, P. A. cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A. *J. Biol. Chem* **284**, 24965–24971 (2009).

Carmosino, M. *et al.* MAL/VIP17, a New Player in the Regulation of NKCC2 in the Kidney. *Molecular Biology of the Cell* (2010). doi:10.1091/mbc.E10-05-0456

Christensen, B. M. *et al.* alphaENaC-mediated lithium absorption promotes nephrogenic diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 253–261 (2011).

Deen, P. M. & Knoers, N. V. Vasopressin type-2 receptor and aquaporin-2 water channel mutants in nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J. Med. Sci* **316**, 300–309 (1998).

Fenton, R. A., Brønd, L., Nielsen, S. & Praetorius, J. Cellular and Subcellular Distribution of the Type-2 Vasopressin Receptor in the Kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F748–F760 (2007).

Firsov, D. *et al.* Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Pflugers Arch* **429**, 79–89 (1994).

Literaturverzeichnis

Fujiwara, T. M. & Bichet, D. G. Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol* **16**, 2836–2846 (2005).

Gallazzini, M., Karim, Z. & Bichara, M. Regulation of ROMK (Kir 1.1) channel expression in kidney thick ascending limb by hypertonicity: role of TonEBP and MAPK pathways. *Nephron Physiol* **104**, 126–135 (2006).

Gamba, G. *et al.* Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem* **269**, 17713–17722 (1994).

Gamba, G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **288**, F245–252 (2005).

Greger, R. Physiology of renal sodium transport. *Am. J. Med. Sci* **319**, 51–62 (2000).

Hebert, S. C., Friedman, P. A. & Andreoli, T. E. Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of Henle: I. ADH increases transcellular conductance pathways. *J. Membr. Biol* **80**, 201–219 (1984).

Heinrich, P. C., Müller, M. & Graeve, L. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. (Springer, 2014).

Hermosilla, R. & Schülein, R. Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Pharmacol* **60**, 1031–1039 (2001).

Hescheler, J., Köhling, R. & Speckmann, E.-J. *Physiologie*. (Elsevier, Urban et Fischer, 2013).

Ji, T. H., Grossmann, M. & Ji, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem* **273**, 17299–17302 (1998).

Keller, C. K. & Geberth, S. K. Praxis der Nephrologie: mit 63 Tabellen ; [nach den Leitlinien NKF National Kidney Foundation (K/DOQI), DHL Deutsche Hochdruckliga, EDTA European Best Practice Guidelines (EBPG), DGfN Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcome ; mit Dialyse und Transplantation]. (Springer

Medizin, 2010)

Khanna, A. Acquired nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.* **26**, 244–248 (2006).

King, L. S., Kozono, D. & Agre, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **5**, 687–698 (2004).

Knoers, N. V. & van Os, C. H. Molecular and cellular defects in nephrogenic diabetes insipidus. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **5**, 353–358 (1996).

Lee, S.-H. *et al.* Effect of epidermal growth factor on the developing rat renal papilla. *Am. J. Nephrol* **24**, 212–220 (2004).

Li, J. H. *et al.* A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.* **119**, 3115–3126 (2009).

Mercier-Zuber, A. & O'shaughnessy, K. M. Role of SPAK and OSR1 signalling in the regulation of NaCl cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2011). doi:10.1097/MNH.0b013e3283484b06

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**, F1166–1177 (2007).

Nakai, S. *et al.* Crucial roles of Brn1 in distal tubule formation and function in mouse kidney. *Development* **130**, 4751–4759 (2003).

Pape, H.-C. *et al.* *Physiologie.* (Thieme, 2014).

Peters, H. P. E., Robben, J. H., Deen, P. M. T. & Wetzels, J. F. M. Water in health and disease: new aspects of disturbances in water metabolism. *Neth J Med* **65**, 325–332 (2007).

Ponce-Coria, J. *et al.* Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 8458–8463 (2008).

Renigunta, A. *et al.* Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem* **286**, 2224–2235 (2011).

Literaturverzeichnis

Sadeghi, H. M., Innamorati, G., Dagarag, M. & Birnbaumer, M. Palmitoylation of the V2 Vasopressin Receptor. *Molecular Pharmacology* **52**, 21–29 (1997).

Sands, J. M. & Kokko, J. P. Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney Int. Suppl* **57**, S93–99 (1996).

Sarmiento, J. M. *et al.* Novel down-regulatory mechanism of the surface expression of the vasopressin V2 receptor by an alternative splice receptor variant. *J. Biol. Chem* **279**, 47017–47023 (2004).

Schenkel, J. *Transgene Tiere*. (Springer, 2006).

Valtin, H., Schroeder, H. A., Bernischke, K. & Sokol, H. W. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats. *Nature* **196**, 1109–1110 (1962).

Welker, P. *et al.* Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F789–802 (2008).

Zhu, X. & Wess, J. Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* **37**, 15773–15784 (1998).

8. Lebenslauf

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

9. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

1.

Mutik K, Borowski T, Boldt C, Borschewski A, Paliege A, Popova E, Bader M, Bachmann S. Demonstration of the functional impact of vasopressin signalling in thick ascending limb by a targeted transgenic rat approach. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Jun; doi:10.1152/ajprenal.00126.2016

2.

Mutig K, Saritas T, Uchida S, Kahl T, Borowski T, Paliege A, et al. Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F502–509.

3.

Förster C, Szkaradkiewicz K, Perbandt M, Brauer ABE, Borowski T, Fürste JP, et al. Human tRNA(Gly) acceptor-stem microhelix: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis at 1.2 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2007 Oct 1;63(Pt 10):858–61.

4.

Förster C, Brauer ABE, Lehmann D, Borowski T, Brode S, Fürste JP, et al. Cocrystallizing natural RNA with its unnatural mirror image: biochemical and preliminary X-ray diffraction analysis of a 5S rRNA A-helix racemate. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2007 Oct 1;63(Pt 10):839–43.

Mutig K, Saritas T, Uchida S, Kahl T, Borowski T, Paliege A, et al. Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Mar;298(3):F502–509.

Erklärung

Erklärung

„Ich, Tordis Ida Borowski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der Bedeutung des Vasopressin-2-Rezeptor (V2R) *Signaling* für die Morphologie und die Funktion der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (zulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum