

Aus dem Centrum für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Renale Expression von Salztransportern und Aquaporin 2 in
hypothyreoten Ratten*

Eine tierexperimentelle Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Kahl
aus Oschatz

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. S. Bachmann
 2. Prof. Dr. J. Köhrle
 3. Prof. Dr. KH. Endlich

Datum der Promotion: 29.01.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Funktionen der Schilddrüse	7
1.2	Nephrologische Grundlagen der Harnbildung mit Blick auf die Regulation von Salz- und Wassertransport bei Hypothyreose	8
1.2.1	Glomeruläre Filtration	8
1.2.2	Rückresorption in den Abschnitten des Nephrons	10
2	HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	17
3	METHODEN UND MATERIALIEN	19
3.1	Versuchstiere	19
3.1.1	Methimazol	19
3.2	Blut- und Urinalysen	20
3.3	Bearbeitung der Gewebeproben	20
3.3.1	Perfusionsfixierung und Gewebebearbeitung für Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung	20
3.3.2	Perfusionsfixierung und Gewebebearbeitung für feinstrukturelle Morphologie	21
3.3.3	Gewebspräparation für die Elektrophorese und das Immunblotting	21
3.3.4	Elektrophorese und Immunoblotting von Membranproteinen	22
3.4	Primäre Antikörper	22
3.5	Antikörperinkubation und Detektion	25
3.6	<i>In situ</i> -Hybridisierung	26
3.6.1	Reninplasmid Ren 412 G3 in <i>E. coli</i>	26
3.6.2	Präparation der cDNA-Matrizen	29
3.6.3	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben	29
3.6.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung der Digoxigenin-markierten Riboproben	30
3.6.5	Detektion der hybridisierten Riboproben	31
3.7	NADPH-Diaphorase-Reaktion	31
3.8	Statistische Auswertung	32
4	RESULTATE	33
4.1	Klinische Parameter und funktionelle Daten	33
4.2	Immunhistochemische Auswertung	35
4.2.1	Histomorphologie	35
4.2.2	Verteilung und Signalintensität von NKCC2	35
4.2.3	Verteilung und Signalintensität von Barttin	35
4.2.4	Verteilung und Signalintensität von NCC	37
4.2.5	Verteilung und Signalintensität von α - , β - und γ -ENaC	37

	4
4.2.6 Verteilung und Signalintensität von AQP2	38
4.2.7 Verteilung und Signalintensität der JGA Parameter NOS1, COX-2 und Renin	39
4.3 Proteinexpression aus Nierenhomogenisaten	41
4.3.1 Western blot	41
4.3.2 Rechnerische Präsentation der Werte	43
4.3.3 Methimazol behandelte und gleichzeitig T ₃ -substituierte Tiere	45
5 DISKUSSION	46
6 ZUSAMMENFASSUNG	52
7 LITERATURVERZEICHNIS	55

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Anti-diuretisches Hormon, Vasopressin
AQP1	Aquaporin 1
AQP2	Aquaporin 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSC1	Bumetanid-sensitiver Kotransporter Isoform 1, Synonym für NKCC2
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD	<i>Cortical Collecting Duct</i> , kortikales Sammelrohr
CD	<i>Collecting duct</i> , Sammelrohr
cDNA	Copy- Desoxyribonukleinsäure
CIC-Ka, CIC-Kb	Chlorid-Kanal Ka und Kb
CNT	<i>Connecting tubule</i> (Verbindungstubulus)
COX-2	Cyclooxygenase 2
DCT, DCT1, DCT2	<i>Distal convoluted tubule</i> , Subsegment 1, 2
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Amilorid-sensitiver epithelialer Natriumkanal
FE _{Na}	fraktionelle Natriumausscheidung
fT ₃	Freies Trijodthyronin
g	Erdanziehungskraft, Zentrifugalkraft
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HCO ₃ ⁻	Hydrogenkarbonat
HRP	Horseradishperoxidase
IgG	Immunglobulin
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
kDa	10 ³ Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LiCl	Lithiumchlorid

MBP	Maltose bindendes Fusionsprotein
MCD	<i>Medullary collecting duct</i> , medulläres Sammelrohr
MD	Macula densa
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCa	Na ⁺ /Ca ⁺⁺ -Austauscher
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
Na, K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaPi2a	Natrium-Phosphat-Kotransporter-2
NCC	Thiazid-sensitiver Natrium-, Chlorid-Kotransporter
NH ₄ - Acetat	Amoniumacetat
NHE3	Natrium-Protonen Austauscher-3
NKCC1	Natrium-, Kalium-, 2Chlorid-Kotransporter Typ 1
NKCC2	Natrium-, Kalium-, 2Chlorid-Kotransporter Typ 2
NOS1, nNOS	Nitric Oxide-Synthase 1, neuronale NO-Synthase
PAP	Peroxidaseantiperoxidasereaktion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGE2	Prostaglandin E ₂
PT	Proximaler Tubulus
PTH	Parathormon
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	<i>Renal outer medullary potassium channel</i> ; Kir1
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin, Tetrajodthyronin
TAL	dicker Teil der aufsteigenden Henle- Schleife, <i>thick ascending limb</i>
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TSC	Thiazid-sensitiver Kotransporter, auch DCT
TSH	Thyrotropin, Thyroidea stimulierendes Hormon
UpM	Umdrehungen pro Minute
V2R	Vasopressin- Rezeptor Typ 2

1 Einleitung

1.1 Funktionen der Schilddrüse

Ein Hauptprodukt der Schilddrüse ist Thyroxin (Tetraiodthyronin; T_4). Dieses hat vielfältige Effekte, die in ihrer Summe zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität des Körpers führen. Thyroxin wird als Teil von Thyroglobulin von den Follikel epithelzellen der Schilddrüse gebildet und in das Follikellumen sezerniert. Hier wird es in mehreren enzymatisch katalysierten Schritten jodiert und gespeichert (zusammengefasst in 1). Da elementares Jod im Körper nicht gespeichert wird, muss das zur Synthese von Thyroxin benötigte Jod (bis zu $200\mu\text{g/d}$) mit der Nahrung aufgenommen werden. Eine unzureichende Aufnahme von Jod führt zu einer verminderten Produktion von Thyroxin und dem damit assoziierten Krankheitsbild der Hypothyreose. Die Freisetzung von Thyroxin in die Blutbahn wird durch das Thyroidea stimulierende Hormon (TSH) gesteuert. In der Peripherie wird Thyroxin dann zum stoffwechselaktiven freien Trijodthyronin (fT_3) metabolisiert.

Im klinischen Alltag werden TSH, Thyroxin und Trijodthyronin zur Charakterisierung der Aktivität der Schilddrüse verwendet. Eine durch Jodmangel hervorgerufene Hypothyreose ist dabei durch verminderte Werte von fT_3 und T_4 bei gleichzeitig erhöhten TSH Werten gekennzeichnet.

Ein wichtiges Zielorgan für die Wirkung von Schilddrüsenhormon ist die Niere. Eine Mangelfunktion der Schilddrüse (Hypothyreose oder Hypothyroidismus) führt zu weit reichenden Störungen des Salz- und Wasserhaushalts und zu einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate (GFR) (zusammengefasst in 2-7). Hieraus resultiert eine verminderte renale Harnverdünnungskapazität, die von einer verringerten Konzentrierungsfähigkeit, Hyponatriämie und gesteigerter Natriuresis bei Salz- und Wasserbeladung begleitet sein kann (8-11).

Veränderte Expressionswerte von Transportern und Kanälen für Natrium und Wasser sind hierbei angenommen worden, doch sind auch strukturelle Veränderungen wie Gedeihstörungen und verändertes Nierenwachstum beim Menschen und bei Tiermodellen unter Hypothyreose zu berücksichtigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine umfassende Analyse renaler Parameter unter Berücksichtigung anatomischer Veränderungen vorzunehmen. Hierzu

wurde das Modell einer in Ratten erzeugten experimentellen Hypothyreose gewählt.

1.2 Nephrologische Grundlagen der Harnbildung mit Blick auf die Regulation von Salz- und Wassertransport bei Hypothyreose

Die Harnbildung in der Niere ist durch zwei grundlegende Funktionsprinzipien gekennzeichnet:

- die glomeruläre Filtration und
- die anschließende Aufarbeitung des Filtrats durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge

Zusammen dienen beide Vorgänge der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushalts des Körpers und ermöglichen die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen. Beide Vorgänge können durch die Schilddrüsenhormone beeinflusst werden.

1.2.1 Glomeruläre Filtration

Die Bildung des Primärharnes erfolgt in den Glomeruli. Hier werden ca. 20% des durch die Niere fließenden Blutplasmas in den Harnraum abfiltriert. Die Filtrationsbarriere besteht im Einzelnen aus dem Porenendothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der durch die Podozyten gebildeten Schlitzmembran. Die Barriere ist hochgradig durchlässig für Wasser und Elektrolyte sowie für kleine, wasserlösliche Moleküle. Im Gegensatz dazu ist die Durchlässigkeit für die zellulären Bestandteile des Blutes und die größeren Plasmaproteine gering. Die filtrierte Urinmenge kann dabei durch Veränderungen des Tonus des zuführenden (afferenten) und abführenden (efferenten) Gefäßes variiert werden.

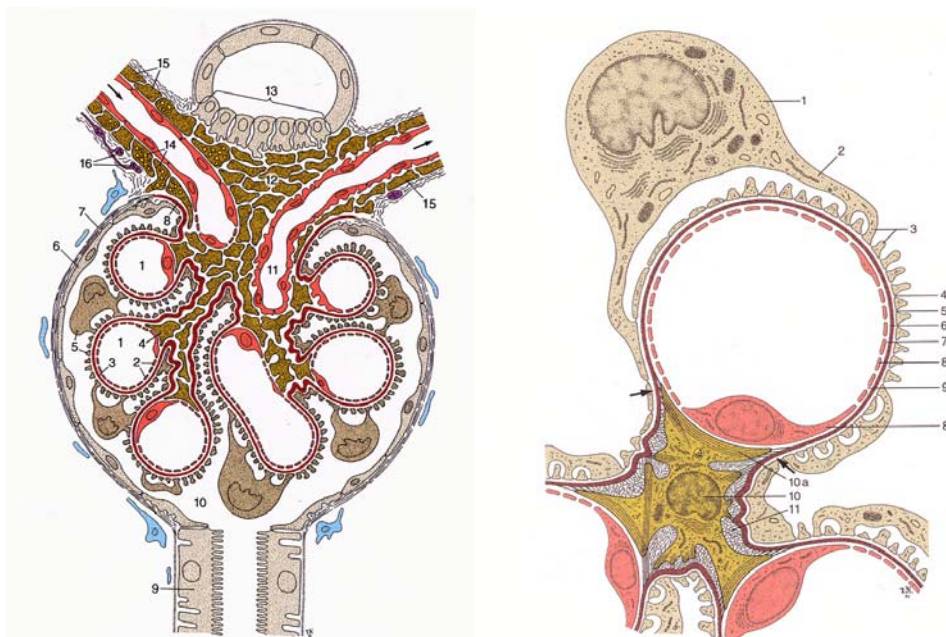


Abb.1. Links: Zeichnerische Darstellung eines Glomerulum mit Gefäß- und Harnpol. 1= Glomerulumkapillaren; 2= Gefäßendothel; 3=glomeruläre Basalmembran (GBM); 4= Mesangium; 5= Podozyt, 6= parietales Blatt der Bowman'schen Kapsel; 7= Basalmembran der Bowman'schen Kapsel; 8= Übergang der Kapsel-Basalmembran in die GBM; 9= proximaler Tubulus; 10= Kapselraum; 11= intraglomeruläres Segment der efferenten Arteriole; 12= extramedulläres Mesangium; 13= Macula densa; 14= granulierten Zellen; 15= glatte Muskelzellen der glomerulären Kapillaren; 16= sympathische Nervenfasern. 12, 13 und 14 bilden den juxtaglomerulären Apparat (JGA)

Rechts: Zeichnerische Darstellung einer Glomerulumkapillare mit den Bestandteilen der Filtrationsbarriere. 1= Podozytenkörper; 2=Primärfortsatz; 3=Fußfortsatz; 4=Schlitzmembran; 5-7= Bestandteile der Filtrationsbarriere; 8=Endothel; 9=Endothelpore; 10=Mikrofilamentbündel; 11=mesangiale Matrix. Die Pfeile zeigen die Umschlagspunkte der Basalmembran.

Aus: Kriz (1)

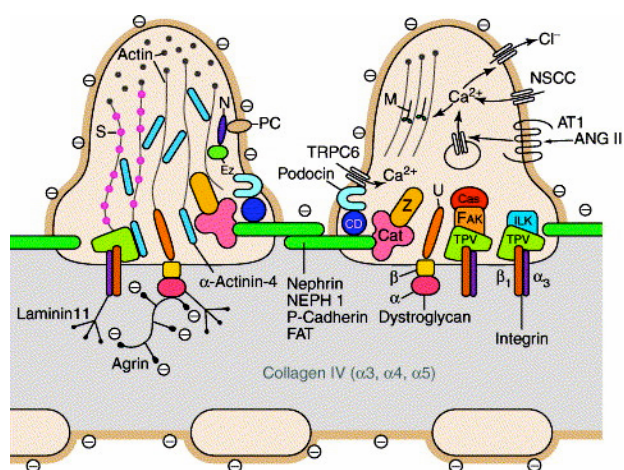


Abb. 2. Schematische Darstellung der Filtrationsbarriere mit den beteiligten Proteinen. (12)

Ein chronischer Mangel an Thyroxin führt zu einer deutlichen Reduktion der GFR (3, 6). Diese resultiert sowohl aus einer Verminderung der renalen Durchblutung als auch aus einer veränderten Nierenmorphologie (2).

1.2.2 Rückresorption in den Abschnitten des Nephrons

Aus dem Glomerulum gelangt der Primärharn in das Tubulussystem (Tubulus nephroni). Dieses besteht aus dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, dem distalen Konvolut, dem Verbindungstubulus und dem Sammelrohrsystem. Durch sequentielle Resorptions- und Sekretionsvorgänge entsteht hier der endgültige Harn (13). Die einzelnen Tubulusabschnitte haben dabei unterschiedliche Funktionen und verfügen über charakteristische Transportproteine. Diese sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

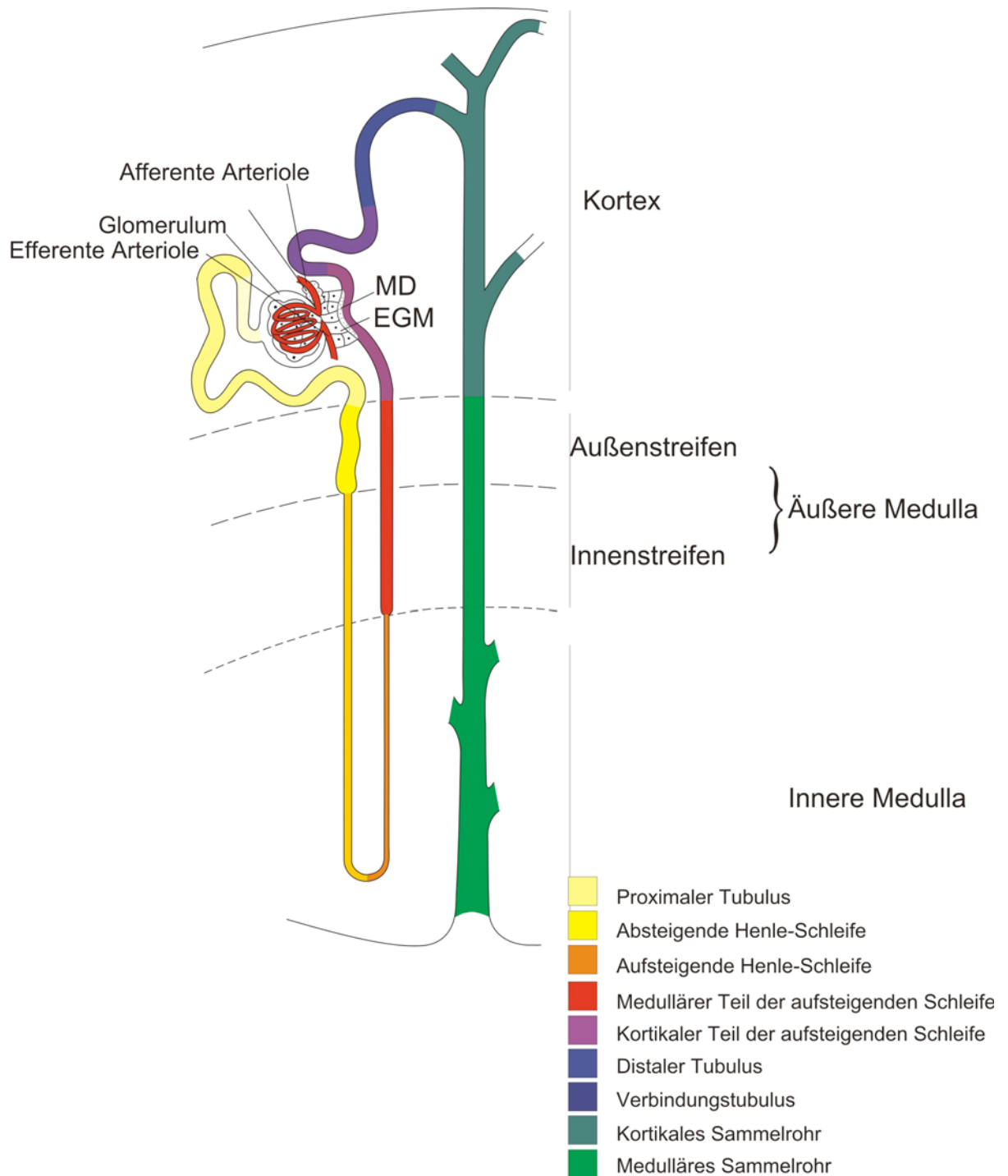


Abb.3. Nephronmodell

1.2.2.1 Der proximale Tubulus

Der proximale Tubulus (PT) leistet mit ca. 70% den Hauptanteil der Rückresorption

des Ultrafiltrates (zusammengefasst in 1). Unterteilt wird der PT in einen gewundenen (Pars convoluta) und einen geraden Anteil (Pars recta). Die Pars convoluta des PT befindet sich im Kortex der Niere. Die geraden Anteile von 40

bis 60 Nephronen lagern sich mit den dazugehörigen Sammelrohren bereits in der Nierenrinde zu Markstrahlen zusammen, welche sich ohne erkennbare Grenze in den Außenstreifen des Nierenmarks fortsetzen. An der Grenze von Außenstreifen und Innenstreifen geht die Pars recta des PT in den dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleifen über.

Die Rückresorption von NaCl im proximalen Tubulus erfolgt auf mehreren Wegen. Die treibende Kraft für alle Transportprozesse ist dabei der Konzentrationsgradient von Natrium zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Raum, welcher durch die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase (Na, K-ATPase) aufrechterhalten wird. Die Aktivität der Na, K-ATPase ist neben anderen Einflussgrößen auch von den Schilddrüsenhormonen abhängig und weist bei Hypothyreose eine reduzierte Aktivität auf (9, 14, 15).

Der quantitativ bedeutendste apikale Transportweg für den Natriumeintritt in die Zelle wird durch den Natrium-Protonen Austausch-3 (NHE3) vermittelt. Dabei wird für jedes aufgenommene Mol Na^+ ein Mol H^+ ins Lumen sezerniert. Die Wasserstoffionen reagieren im Tubuluslumen mit dem filtrierten Hydrogenkarbonat (HCO_3^-), welches unter Vermittlung einer Karboanhydrase zu Wasser und CO_2 umgewandelt wird. Das so gebildete CO_2 diffundiert frei über die Membran und wird intrazellulär durch eine Karboanhydrase zu H^+ und HCO_3^- umgewandelt. Die Expression von NHE3 wird durch Schilddrüsenhormon stimuliert. Verminderte fT_3 Spiegel gehen demzufolge mit einer Reduktion der NHE3 Proteinmenge und einer verminderten Rückresorptionskapazität des proximalen Tubulus einher (16-20).

Ein weiterer, quantitativ weniger bedeutender Transportweg verläuft über den Natrium-Phosphat-Kotransporter-2a (NaPi2a). NaPi2a vermittelt die Reabsorption von 3M Natrium im Kotransport mit 1M Phosphat. NaPi2a ist in die Regulation des Kalzium-Phosphat-Stoffwechsels eingebunden und unterliegt der hormonellen Regulation durch Parathormon (PTH) (21-25). Eine hypothyreote Stoffwechsellaage führt wie bei NHE3 zu einer verminderten Expression und außerdem zu einer Hemmung der Transportaktivität von NaPi2a (11, 26).

Der proximale Tubulus besitzt überdies die Fähigkeit, Schilddrüsenhormon zu binden und zu metabolisieren (27, 28).

1.2.2.2 Die Henle-Schleife

Die Henle-Schleife besteht aus einem absteigenden und einem aufsteigenden Teil. Bau und Länge der Henle-Schleife hängen dabei von der Lage des zugehörigen Glomerulum ab. So gibt es Nephrone mit kurzen, kortikalen Schleifen, welche in den Markstrahlen der Rinde lokalisiert sind, den Kortex jedoch nicht verlassen. Weiterhin wird zwischen Nephrone mit kurzer und langer Schleife differenziert. Grundsätzlich sind die Henle-Schleifen aus der Pars recta des proximalen Tubulus, dem intermediären (dünnen) Teil und dem dicken aufsteigenden Schenkel (TAL = *thick ascending limb*) zusammengesetzt. Die intermediären Tubuli kurzer Schleifen besitzen einen dünnen absteigenden Schenkel und gehen an der Grenze zwischen Markaussenzone und Markinnenzone in den über. Die Nephrone mit langen Schleifen erreichen mit dem absteigenden Schenkel die Innenzone des Marks und gehen am Schleifenscheitel zunächst in einen dünnen aufsteigenden Schenkel über, bevor sie im äußeren Mark in den TAL übergehen. Die Henle-Schleife ist für den Harnkonzentrierungsmechanismus von herausragender Bedeutung. Beide Formen der Henle-Schleifen sind dabei funktionell interaktiv und weisen hierbei unterschiedliche physiologische Eigenschaften auf. Das Epithel des dünnen absteigenden Schenkels der Henle-Schleife ist durch die Expression von luminal und basolateral lokalisierten Aquaporin 1-Wasserkanälen (AQP-1) wasserundurchlässig (29, 30). Dadurch gleicht sich die Osmolarität der Tubulusflüssigkeit der des Interstitiums an. Im Gegensatz dazu sind die Epithelien des dünnen und des dicken aufsteigenden Schenkels wasserundurchlässig. Im TAL wird in einem sekundär aktiven Prozess NaCl aus dem Tubuluslumen in das Interstitium transportiert. Dadurch sinkt die Osmolarität der Tubulusflüssigkeit, während sie im Interstitium steigt (31, 32). Der entstehende osmotische Gradient bildet die treibende Kraft für eine Wasserreabsorption aus dem Lumen des dünnen absteigenden Schenkels der Henle-Schleife.

Natrium wird im TAL zusammen mit Kalium und Chlorid durch den Natrium-, Kalium-, 2Chlorid-Kotransporter (NKCC2) reabsorbiert. Treibende Kraft für den Transport ist der durch die basolaterale Na, K-ATPase aufgebaute Konzentrationsgradient für Natrium. Der Transport erfolgt elektroneutral und in einem festen stöchiometrischen Verhältnis der beteiligten Ionen (1 Mol Na⁺, 1

Mol K^+ , 2 Mol Cl^-). Fehlt eines der Ionen, so kommt der Transportprozess zum Erliegen. Da die Menge an filtriertem Kalium im Vergleich zu Natrium und Chlorid gering ist, muss das in die Zelle aufgenommene Kalium zum größten Teil wieder in das Tubuluslumen sezerniert werden. Dieser Transport wird durch den apikal lokalisierten Kaliumkanal ROMK (*Renal outer medullary potassium channel*) vermittelt. Chlorid verlässt die Zelle über basolaterale Cl^- -Kanäle (ClC-Ka und ClC-Kb) (8, 33). Für die Funktion der ClC-Kanäle ist deren β -Untereinheit Barttin von Bedeutung (25).

Mutationen im Gen für NKCC2, ROMK, ClC-Ka, ClC-Kb oder Barttin führen zu einem Funktionsverlust des TAL. Das resultierende Krankheitsbild wird als Bartter-Syndrom bezeichnet und ist durch einen Verlust von Salz und Wasser gekennzeichnet (34).

Die Aktivität von NKCC2 wird unter anderem durch antidiuretisches Hormon (ADH, Vasopressin) gesteuert. ADH vermittelt über den Vasopressin-Rezeptor Typ 2 (V2R) eine Steigerung des intrazellulären cAMP. Dies führt zu einer vermehrten Translokation von NKCC2 in die luminale Membran (35, 36).

Eine Hypothyreose kann zu einer Reduktion der NKCC2 Proteinmenge und damit zu einer Störung der Harnkonzentrierung führen (4, 37). Die funktionellen Hintergründe und molekularen Ursachen für dieses Phänomen sind unbekannt.

1.2.2.3 Macula densa

Im Kortex nimmt der TAL Kontakt mit dem zugehörigen Glomerulum auf. In dieser engen Lagebeziehung bildet er eine Epithelplatte aus, die Macula densa (MD) genannt wird und Bestandteil des juxtaglomerulären Apparats (JGA) ist. Über die MD nimmt der TAL Kontakt mit dem extraglomerulären Mesangium und damit auch mit den glomerulären Arteriolen auf. Durch die Messung der luminalen NaCl-Konzentration an der MD werden der Widerstand der glomerulären Arteriolen und die Reninfreisetzung reguliert. Über den tubuloglomerulären Feedback (TGF)-Mechanismus wird das distale Angebot von NaCl stabilisiert und damit auch die NaCl-Ausscheidung eingestellt (38). Ein Anstieg der NaCl-Konzentration führt durch eine Konstriktion der afferenten Arteriole zu einer Reduktion der GFR. Diese negative Rückkopplung zwischen luminaler Salzkonzentration und dem Tonus der glomerulären Gefäße macht den TGF aus. Die Kontrolle des Gefäßtonus erfolgt durch lokale Änderungen

der Adenosinkonzentration, über welche eine schnelle Adaptation der GFR umgesetzt wird (39, 40). Eine länger bestehende Veränderung der NaCl-Konzentration an der MD führt zu Änderungen der Reninfreisetzung, wodurch das lokale und systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und damit Angiotensin II beeinflusst wird. Die Kontrolle der Reninfreisetzung erfolgt unter anderem durch das Zusammenspiel von NO-Synthase 1 (NOS1) und Cyclooxygenase 2 (COX-2) in der MD (40).

Experimentelle Bedingungen wie niedrige Salzaufnahme, Nierenarterien-Stenose, Ureterverschluss und Furosemidgabe führen über den verringerten, NKCC2-abhängigen Transport zu einer Steigerung von Produkten der MD-Enzyme. Dies führt vermutlich zu einer positiven Modulation der Reninsynthese (41, 42). Durch die Blockade von NKCC2 und die Unterdrückung des RAAS kann die Expression von COX-2 stimuliert werden (43). Das Produkt der COX-2, Prostaglandin E₂ (PGE₂) hemmt wiederum die Expression von NOS1 (44). Eine Beeinflussung der MD-Funktion bzw. örtlich exprimierter Transporter durch hypothyreote Stoffwechsellage ist nicht bekannt.

1.2.2.4 Distales Konvolut und Verbindungstubulus

Im Anschluss an die MD setzt sich der Nierentubulus in der Pars convoluta des distalen Tubulus (DCT = *Distal convoluted tubule*) fort. Dem DCT ist der Verbindungstubulus (CNT, *connecting tubule*) nachgeschaltet, der die Verbindung zum Sammelrohr herstellt. Der DCT kann in zwei Subsegmente (DCT1 und DCT2) unterteilt werden (45)(46). Im gesamten DCT wird der Thiazid-sensitive Natrium-, Chlorid-Kotransporter (NCC, auch TSC) exprimiert (36, 47). Im DCT2 kommt der Amilorid-sensitive Natrium-Kanal (ENaC) vor, der auch in dem sich anschließenden CNT und Sammelrohr exprimiert wird. Am Übergang zum Verbindungstubulus endet die Expression von NCC, während ENaC sich im Verbindungstubulus weiter fortsetzt.

NCC wird im DCT apikal exprimiert, ist elektroneutral und weist eine weitgehende Homologie zu NKCC2 auf. NCC ist durch die Gruppe der Thiazide hemmbar und ist damit funktionell von NKCC2 unterscheidbar (48). Das Vorhandensein von ENaC im DCT2 und CNT weist auf die Regulierbarkeit dieser Abschnitte durch das Mineralokortikoidhormon Aldosteron hin (49-51);

zusammen mit dem Sammelrohr werden die Segmente DCT2 und CNT auch als Aldosteron-sensitives Nephron (ASDN) gängig bezeichnet (51, 52).

Der ENaC besteht aus drei Untereinheiten (α -, β -, γ -ENaC) und ist hochselektiv für Natrium. Er ermöglicht den apikalen Einstrom von Natrium entlang des transepithelialen Konzentrationsgefälles. Aldosteron bewirkt über intrazelluläre Mineralokortikoidrezeptoren den vermehrten Einbau von ENaC in die apikale Membran. Die basolaterale Na, K-ATPase wird ebenfalls vermehrt eingebaut; die Ausscheidung von Natrium wird hierdurch verringert (53-56).

Während einer kurzzeitigen Induktion einer Hypothyreose wurden im Menschen ein diastolischer Blutdruckanstieg sowie gesteigerte Konzentrationen von Glukokortikoiden und Aldosteron beobachtet (57). Der genaue Mechanismus dazu ist bisher nicht bekannt, doch kann ein Mineralokortikoid-Einfluss auf den Nierentubulus dazu beitragen (58). Untersuchungen zur Expression des V2R zeigen eine deutliche Expression im DCT und CNT. Dies lässt vermuten, dass auch ADH auf die Expression oder Funktion von NCC Einfluss haben könnte (35), wie auch Daten für eine ADH-abhängige Stimulation von ENaC vorliegen (37, 59).

1.2.2.5 Sammelrohr

Das Sammelrohr entsteht in den Markstrahlen durch den Zusammenschluss mehrerer Verbindungstubuli. Nach dem Übergang in das innere Mark vereinigen sich jeweils mehrere Sammelrohre zu Ductus papillares, die dann in das Nierenbecken einmünden (1, 60).

Das Sammelrohr spielt eine wichtige Rolle in der Feinregulation der Natrium- und Wasserreabsorption. ENaC spielt - wie im DCT2 und CNT - eine wichtige Rolle für die Natriumresorption und wird im Sammelrohr ebenfalls durch Aldosteron reguliert. Die Wasserrückresorption erfolgt durch die Expression des Wasserkanals Aquaporin 2 (AQP2) und unterliegt der Steuerung durch ADH (29, 61-64). Dem osmotischen Gradienten von Salz und Harnstoff folgend passiert das Wasser die apikale Membran der Zellen und verlässt diese basolateral via Aquaporin 3 und 4 (29, 65-67).

Bei Störungen in der Physiologie des Wasserhaushaltes spielt AQP2 eine zentrale Rolle; eine Störung in der Kaskade des V2R oder ein genetischer Defekt von AQP2 führen zu einem nephrogenen Diabetes insipidus (65-67).

Massiver Wasserverlust, eine Hypovolämie und Hybernatriämie gehören zu dem Krankheitsbild. Der Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Expression der Salz- und Wassertransporter im distalen Tubulus und Sammelrohr ist wahrscheinlich, da eine Hypothyreose ebenfalls mit einer massiven Hyponatriämie, allerdings auch mit Harnverdünnungsstörungen einhergehen kann (37, 68).

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Ein Mangel an Schilddrüsenhormon führt zu vielfältigen Effekten in der Niere. Der chronische Mangel an Schilddrüsenhormonen führt zu einer Wachstumsretardierung des Nierenparenchyms und zu einer Verminderung des Nierengewichts. Morphologische Untersuchungen der Niere bei Hypothyreose haben auf disproportional verkürzte proximale und distale Nierentubuli sowie ein retardiertes glomeruläres Wachstum hingewiesen (3). Neben den morphologischen Veränderungen führt eine Hypothyreose zu einer Beeinträchtigung des tubulären Salztransports und einer reduzierten GFR. Eine reduzierte Aktivität der proximal- tubulären Salzresorption, vermutlich über NHE3 und NaPi2a vermittelt, ist anzunehmen. Da der proximale Tubulus den größten Anteil des Ultrafiltrates zurückgewinnt, müsste eine verminderte Resorptionskapazität des proximalen Tubulus zu einer vermehrten Salz- und Wasserbelastung des distalen Tubulus und zu einem Salzverlust führen. Es wäre daher zu erwarten, dass der distale Tubulus kompensatorisch vermehrt Salz und Wasser resorbiert, um diesem Prozess entgegenzuwirken. Mikropunktionsstudien haben allerdings gezeigt, dass eine chronische Hypothyreose zu einer reduzierten Resorptionskapazität sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus führt. Diese Beobachtungen wurden bisher mit einer reduzierten Aktivität der Na, K-ATPase erklärt, die den notwendigen transepithelialen Ionengradienten erzeugt. Über eine möglicherweise beteiligte Regulation der Salz- und Wassertransporter im distalen Tubulus und Sammelrohr bei hypothyreoter Stoffwechsellage war zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeiten wenig bekannt. Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Expression distaler Natriumchlorid-Kotransporter (NKCC2, NCC), des

epithelialen Natriumkanals (ENaC), der Na, K-ATPase und des Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) mit Blick auf die Funktion des renalen Konzentrationsmechanismus und möglicher Wege des Salzverlustes in der Niere zu untersuchen.

3 Methoden und Materialien

3.1 Versuchstiere

28 männliche Sprague-Dawley Ratten (Schönwalde, Berlin, G 0357/97, genehmigt 16.01.2002) mit einem Gewicht von 150-250g wurden in zwei Gruppen (Methimazol-behandelte und Kontroll-Gruppe) eingeteilt. Alle Versuchstiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und dem Standardfutter des Tierhauses im Virchow-Klinikum der Charité. Die Hypothyreose wurde durch den Zusatz von 0,05% Methimazol (Sigma, Deisenhofen) zum Trinkwasser innerhalb von 7 Wochen induziert. Das Körpergewicht wurde wöchentlich gemessen. Nach der Behandlung wurden die Tiere einzeln für 20 Stunden in metabolische Käfige gesetzt, um Urin zu sammeln. Für die histochemische Darstellung wurden 18 Ratten *in vivo* perfusionsfixiert. Zur Untersuchung biochemischer und physiologischer Daten wurden 10 Ratten durch eine Überdosis Pentobarbital getötet. Vor der Entnahme der Nieren wurde den Ratten durch Punktion der abdominalen Aorta Blut entnommen. Die Nieren wurden entkapselt, einzeln gewogen, in kleine Stücke geschnitten, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Um einen direkten Effekt von Methimazol auf die Transportfunktionen der Niere auszuschließen, wurde eine weitere Gruppe von 5 Ratten mit Methimazol behandelt, denen über 4 Wochen Trijod-L-Thyronin (T₃) (IRA, Sarasota, FL) über subkutane Applikation (Tablette) substituiert wurde.

3.1.1 Methimazol

Methimazol (Synonym: Thiamazol) ist ein Imidazolderivat, welches als Thyreostatikum zur Behandlung von hyperthyreoten Stoffwechselerkrankungen eingesetzt wird. Chemisch ist es 1,3-Dihydro-methyl-2H-imidazol-2-thion (C₄H₆N₂S). Es hemmt die Thyroperoxidase und damit die Synthese der aktiven Schilddrüsenhormone (69). Bisher konnten keine Einflüsse auf die Jodresorption oder Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen nachgewiesen werden. Eine direkte Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch Methimazol ist nicht bekannt.

3.2 Blut- und Urinalysen

Alle Blutproben sind im Zentrallabor der Charité analysiert worden. Die Urinproben wurden als Sammelurin im Stoffwechselkäfig gewonnen, während die Blutproben direkt bei der Organentnahme oder *in vivo* Perfusion (siehe 3.3.2) durch Punktion der Aorta abdominalis entnommen wurden. Die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Plasma wurde durch einen Chemilumineszenz-Immunoassay (Centaur Analyzer, Bayer, Leverkusen) gemessen. Die Urin- und Serumelektrolyte wurden mit einer indirekten, ionenselektiven Elektrode (Modular Analytics, Roche, Mannheim) analysiert. Die Urinosmolarität wurde mit einem Osmometer (Gonotec, Berlin) gemessen. Der Blutharnstoff und die Kreatininkonzentration wurden durch die Jaffe'-Methode (Modular Analytics, Roche) enzymatisch bestimmt. Die Kreatinin-Clearance und die fraktionelle Natriumausscheidung wurden mit den Standardgleichungen berechnet. Die ADH-Konzentration im Sammelurin wurde von S. Diederich, Endokrinologie, Freie Universität Berlin, unter Verwendung eines Radioimmunoassay ermittelt (70).

3.3 Bearbeitung der Gewebeproben

3.3.1 Perfusionsfixierung und Gewebeparbeitung für Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung

Die Ratten wurden über Äther-Vornarkose und einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (Nembutal; 40 mg/kg Körpergewicht; Sanofi, Paris) tief narkotisiert. Anschließend wurde der Bauchraum der Tiere eröffnet. Die Aorta abdominalis wurde nach Anschlingen und Abklemmen knapp distal vom Abgang der Arteriae renales eröffnet und ein nach proximal gerichteter Polyethylenschlauch eingeführt, der mit dem Perfusionssystem verbunden wurde. Zur Perfusion wurde die proximale Klemme gelöst. Zum Druckausgleich wurde die Vena cava nahe den Venae renales eröffnet und die Nieren durch die Aorta abdominalis retrograd perfundiert. Nach dem Vorspülen mit einer 21°C warmen Phosphatpufferlösung (PBS; Phosphat-buffered Saline, bestehend aus 8 g NaCl, 240 mg KH₂PO₄, 1,78 g Na₂HPO₄, 200 mg KCl in 1000 ml H₂O 330 mosmol, pH 7,4) für 30 Sekunden mit konstantem Perfusionsdruck von 1,5m Wassersäule erfolgte die Perfusion mit 3%igem Paraformaldehyd (Merck,

Darmstadt) in PBS (pH 7,4, 21°C) für 5 Minuten. Das Paraformaldehyd wurde vor jeder Perfusionsreihe als 3%ige Lösung in PBS frisch angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt. Nach der Fixierung wurden die Nieren entnommen.

Anschließend wurden sie durch einen Horizontalschnitt geteilt und zum Schutz vor Gefrierartefakten für mehrere Stunden bei 4°C in einer Saccharose-PBS-Lösung (800 mosm/kg in PBS, pH 7,4) immerniert. Danach wurde das Gewebe auf Styroporplättchen aufgebracht und in Stickstoff-gekühlten Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze) schock gefroren.

3.3.2 Perfusionsfixierung und Gewebearbeitung für feinstrukturelle Morphologie

Hier erfolgte die Präparation der Nieren wie in 3.2.1. Als Fixierlösung diente hier eine Lösung aus Glutaraldehyd (3%; Merck, Darmstadt) und Paraformaldehyd (1,5%) in PBS (pH 7,4). Nach ihrer Entnahme wurden die Nieren mit einer Rasierklinge in schmale Gewebelöckchen zugeschnitten. Diese wurden über Nacht bei 4°C in der Fixierlösung nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen (je 15 Minuten in 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol und 2 x 20 Minuten 100% Ethanol) entwässert und über Nacht in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon (beides Fluka, Buchs,) inkubiert und in Beem-Kapseln (Roth, Karlsruhe) verbracht, die mit Epon aufgefüllt wurden. Die Aushärtung erfolgte über drei Tage bei 60°C.

3.3.3 Gewebspräparation für die Elektrophorese und das Immunblotting

Für die Präparation der Nieren für den Western blot wurden die Tiere anästhesiert (s.o.) und anschließend die Nieren herauspräpariert, entkapselt und in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Die Nieren wurden danach für 3 Minuten mit einem *Tissue homogenizer* (DiAx 600, Heidolph Instruments) in eiskaltem Sucrosepuffer (250mM Sucrose, 10mM Trietholamin und Proteaseinhibitor (1 Tablette; Complete, Roche) pro 50ml Lösung) homogenisiert. Anschließend wurde das Nierenhomogenat bei 1000 xg 10 Minuten zentrifugiert (Sigma 3K15 Kühlzentrifuge), um Zellkerne und unvollständig homogenisierte Membranbestandteile zu entfernen. Um die Membran und die intrazellulären Vesikel von Zellplasma zu trennen, wurde der Überstand mit 200.000 xg zentrifugiert (Beckmann LE 80 Ultrazentrifuge). Das

erhaltene Pellet wurden in Sucrosepuffer aufgenommen. Die absolute Proteinkonzentration wurde mit einem Pierce BCA *Protein assay reagent kit* (Pierce, Rockford) bestimmt.

3.3.4 Elektrophorese und Immunoblotting von Membranproteinen

Nach Zugabe von Laemmli's Probenpuffer wurden die Proteine bei 65°C für 10 Minuten gelöst. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit 6-10%igen Polyacrylamid Gelen durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf Polyvinyliden-Fluorid Membranen geblottet. Durch Färbung mit 0,1%ige Ponceau-Rot wurde die auf das Polyacrylamidgel geladene Proteinmenge verifiziert. Anschließend wurden die Membranen für 30 min in 5%iger entfetteter Milch in PBS (Difco Skim milk, Becton, Dickenson Co., Sparks) geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Antikörper (DAKO, Glostrup), die bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert wurden. Die Membranen wurden mit einem Chemilumineszenzkit (Amersham Pharmacia, Freiburg) überspült. Anschließend wurden Röntgenfilme (Hyperfilm, Amersham) mit den Membranen belichtet.

Für die densitometrische Auswertung der Resultate wurden die entwickelten Röntgenfilme mit dem Programm BIOPROFIL Bio-1D Image Software (Vilber Lourmt, Marne La Vallée) eingescannt und analysiert.

3.4 Primäre Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten und im Folgenden besprochenen polyklonalen Antikörper sind bereits in anderen Arbeiten eingesetzt und charakterisiert worden (s. Tabelle 1).

Der Antikörper gegen NaPi2a (freundlichst überlassen von J. Biber, Physiologie, Universität Zürich) ist ein polyklonales Antiserum. Der Antikörper wurde im Kaninchen generiert und ist gegen NaPi2a von Ratten gerichtet. Der Antikörper detektiert eine Bande zwischen 80 bis 85 kDa, welche der in der Literatur beschriebenen Lokalisation entspricht (71, 72).

Um den NCC zu untersuchen, wurde ein kommerziell verfügbarer polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Biemesdorfer, New Haven, CT) eingesetzt. Gerichtet ist der Antikörper gegen ein Fusionsprotein, das die gesamte NH₂-terminale Schleife des Maus-NCC einschließt. Der NCC-Antikörper zeigte in den Immunoblots eine Bande bei 160 bis 170 kDa (49).

Der Antikörper gegen AQP2 ist ein polyklonaler, im Kaninchen generierter, gegen den C-Terminus des Proteins gerichteter Antikörper (freundlicherweise überlassen von E. Klußmann, MDC Berlin). In den Immunoblots wurden Banden bei 27 und 35 bis 40 kDa detektiert (73).

Für die Herstellung der Antikörper gegen α -ENaC (freundlicherweise überlassen von B. Rossier, Lausanne, Schweiz) wurde ein Fusionsprotein vom NH₂-terminalen Ende (Aminosäure E10-F77) verwendet. Für die Untersuchung der β - und γ -Untereinheit wurden kommerziell erwerbbarer Antikörper (Alpha Diagnostik International, San Antonio, TX) verwendet. Die Antikörper gegen α -, β - und γ - ENaC markierten Banden für das vollständige Protein jeweils zwischen 80 bis 90 kDa (74).

Zur Untersuchung von NHE3 wurde ein kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper der Firma Chemicon International (Temecula, CA) verwendet. Der Antikörper detektiert eine Bande bei 85 kDa, die publizierten Daten entspricht (18, 72).

Der Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit der Na, K-ATPase ist ein monoklonaler Antikörper, der kommerziell bei der Firma Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) erworben wurde. Dieser Antikörper markiert eine Bande bei 98 kDa (72).

Gegen NKCC2 wurde ein polyklonaler Antikörper (freundlichst überlassen von D. Ellison, USA) eingesetzt, der gegen das NH₂-terminale Ende von NKCC2 gerichtet ist. Der Antikörper markiert eine Bande von 160 bis 165 (72).

Zur Detektion von Renin wurde ein polyklonaler, gegen Maus-Renin gerichteter Kaninchenantikörper eingesetzt (freundlichst überlassen von F. Taugner, Tierpathologie, Freie Universität Berlin).

Zur Darstellung der COX-2 wurde ein kommerziell verfügbarer polyklonaler Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet, der gegen das carboxyterminale Ende der COX-2 der Ratte gerichtet ist und in der Ziege generiert wurde.

Die NOS1 wurde mit einem kommerziell verfügbaren Antikörper (Alexis, San Diego, CA), der in Kaninchen generiert wurde, dargestellt.

Zur Detektion von Barttin wurde ein polyklonaler Antikörper (freundlicherweise überlassen von T. Jentsch, MDC, Berlin) verwendet. Der Antikörper zeigt eine Bande bei 40 bis 45 kDa (8).

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	Target	Anti – Spezies	Origo – Spezies	Firma/AG
NaPi2a	12-mer COOH-terminale und NHs-terminal NaPi2a-Peptide	Ratte	Kaninchen	Biber, Zürich
NCC	NH ₂ -terminale Schleife	Maus	Kaninchen	Biemesdorfer, New Haven, Connecticut
AQP2	C - Terminus	Ratte	Kaninchen	Klussmann
α- ENaC	α- ENaC Aminosäure E10-F77, NH ₂ -Terminus	Ratte	Kaninchen	Rossier, Lausanne
β- ENaC	β- ENaC Aminosäure G559-E363, COOH- Terminus	Ratte	Kaninchen	Alpha Diagnostik International, San Antonio, TX
γ- ENaC	γ- ENaC Aminosäure A570-L650, COOH- Terminus	Ratte	Kaninchen	Alpha Diagnostik International, San Antonio, TX
NHE3	C-Terminus 131 Aminosäuren	Ratte	Maus	Chemicon International (Temecula, CA)
Na, K-ATPase	Fusionsprotein Aminosäuren: 338-518	Ratte	Kaninchen	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)
NKCC2	NH ₂ -Terminus	Ratte	Meerschwein	Ellison, USA
Renin	Renin, polyklonal	Maus	Kaninchen	Taugner, FU Berlin
COX-2	C-Terminus	Ratte	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
NOS1	Keine Herstellerangabe	Ratte	Kaninchen	Alexis, San Diego, CA
Barttin	Peptid 63-77	Ratte, Maus	Meerschwein	Jentsch, Berlin

Tabelle 1: Aufstellung Antikörper

3.5 Antikörperinkubation und Detektion

Für die Immunhistochemie wurden Gefrierschnitte in einer Stärke von 3 bis 5 µm mit einem Kryostaten (CM3000, Leica) angefertigt und auf Aminosilanbeschichtete Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Schnitte mit Blockiermedium bei 30 Minuten Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Blockiermedium diente entweder 5% Milchpulver (Difco-Skim milk, Becton, Dickenson Co.) in PBS verdünnt oder 2% bovines Serumalbumin in PBS aufgelöst. Nach Entfernen des Blockiermediums wurden

die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper entsprechend den ausgetesteten Konzentrationen verdünnt. Die Schnitte wurden mit der Antikörperlösung überschichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten mit PBS gespült und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper beschichtet.

Als Sekundärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte Immunglobuline verwendet (Cy2- oder Cy3-konjugiert; Dianova, Hamburg), die gegen die jeweilige Herkunftsspezies des verwendeten Primärantikörpers gerichtet sind. Alternativ wurde ein Peroxidase-Antiperoxidase-Detektionssystem eingesetzt (PAP; Dianova).

Nach einer Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit PBS (3 x 5 Minuten) entfernt. Die Objektträger wurden anschließend mit PBS/Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch (Leica DMRB mit Auflicht-Fluoreszenzzusatz (Leica, Wetzlar)) analysiert und fotografiert.

3.6 *In situ*-Hybridisierung

3.6.1 Reninplasmid Ren 412 G3 in E. coli

Das Reninplasmid (Ren 412 G3) wurde uns freundlicherweise von M. Bader (MDC, Berlin Buch) überlassen. Ein Plasmid ist ein ringförmiges, extrachromosomales DNA-Molekül, das sich in der Bakterienzelle unabhängig vom Wirtsgenom vermehren kann. Es trägt Resistenzgene gegen Antibiotika, die es den Wirtsbakterien ermöglichen, in Gegenwart dieser Antibiotika zu proliferieren. Dies wird bei der Vermehrung von Plasmiden in Bakterienkolonien genutzt, indem Plasmide in kompetente *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*) transformiert werden. Für die Klonierung des verwendeten Reninplasmids Ren 412 G3 wurde ein pGEM3-Vektor benutzt. Dieser Vektor ist mit einer Resistenz gegen das Aminopenicillin Ampicillin ausgestattet.

Das cDNA-Fragment des Maus-Renins wurde zwischen die Restriktionsendonukleasestellen für PstI und KpnI des pGEM3-Vectors kloniert. Diese Klonierungsstelle wird jeweils von einer Promotorstelle für die Transkriptionspolymerasen Sp6 und T7 flankiert. Bei der cDNA handelte es sich

um ein 294 Basenpaare langes Fragment vom Renin der Maus, welches von Position 12 bis Position 306 vorlag.

3.6.1.1 Kompetente E. coli

Für die Transformation des Reninplasmids wurde ein XL1-Blue Stamm von E. coli Bakterien benutzt. Um die Bakterien kompetent zu machen, wurden 100ml LB-Medium (10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt (beides Becton, Dickinson and Co.) und 10g NaCl (Merck, Darmstadt) auf 1000ml H₂O, pH 7,4) mit 1ml E. coli Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 20 Minuten zentrifugiert (7000 xg, Beckmann-Zentrifuge), das Pellet mit 10ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in 2ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden teilweise für die Transformation weiter verwendet. Der Rest wurde unter Zugabe von 1ml Glycerin als 200µl Aliquot bei -80°C gelagert.

3.6.1.2 Transformation von Ren 412 G3 in E. coli

Die E. coli Bakterien wurden auf Eis gelagert bzw. auf Eis liegend aufgetaut und mit 20ng des Ren 412 G3 Plasmids beimpft. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Minuten auf Eis gekühlt und danach für 30 Sekunden bei 42°C inkubiert. Dem Ansatz wurden 250µl S.O.C.-Medium (5g Hefeextrakt, 20g Bacto-Tryptone Hefeextrakt (beides Becton, Dickinson and Co.), 0,5g NaCl, 2,5ml 1M KCl und 20ml 1M Glucose (alles Merck, Darmstadt) auf 500ml H₂O) hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde in einem Schüttelinkubator inkubiert. Zum Züchten von transformierten Bakterienkolonien wurden zwei mit Ampicillin (100µg Ampicillin/ml LB-Agar) versetzte LB-Agarplatten hergestellt. Für eine Platte wurden 25ml LB-Agar (Ansatz: 5g Bacto-Trypton, 2,5g Hefeextrakt, 7,5g Bacto-Agar (alles Becton, Dickinson and Co.) und 5g NaCl (Merck) auf 500ml H₂O) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden auf zwei Platten ausplattiert. Auf eine Platte wurden 90% der Kultur und auf die andere Platte 10% ausplattiert und bei 37°C für 10 bis 12 Stunden bebrütet.

Die Isolation einzelner Bakterienkolonien, die erfolgreich mit dem Vektor transformiert wurden, erfolgte mit einer Platinöse, die in 70%igem Ethanol desinfiziert und in einer Gasflamme ausgeglüht wurde. Die isolierten

Bakterienkolonien wurden in 15ml Falcon-Röhrchen, welche mit 3ml LB-Medium und einer Ampicillinkonzentration von 1,5µl/ml LB-Medium gefüllt war, überimpft. Die Falcons mit den Bakterienkolonien wurden für mindestens 8 Stunden bei 37°C (Übernachtskultur) schüttelnd inkubiert.

3.6.1.3 Präparation der Reninplasmide

Die Präparation der Plasmid-DNA folgte nach der Methode von Birnboim-Doly (75). Die Übernachtskultur der Bakterien wurde bei 12.000 UpM für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment mit 200µl Lösungspuffer (10mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Roth) und 25mM Tris-HCl (pH 8) (Merck)) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz unter vorsichtigem Schütteln 200µl 5M K-Acetat, pH 5 (Riedel-de Haën, Seelze) hinzugegeben und für 20 Minuten in einem Eisbad inkubiert, danach für 20 Minuten bei 12.000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, um ein sauberes Pellet zu erhalten. Das Pellet wurde mit 500µl Isopropanol (J. T. Baker) versetzt, gut gemischt und für 20 Minuten bei 12.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 70%igem Ethanol (Merck, Karlsruhe) gewaschen, noch einmal zentrifugiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wurde das Sediment mit 100µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl (pH 8) (Merck) und 1mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Roth)) gelöst. Nach Zugabe von 100µl 5M NH₄-Acetat (Merck, Darmstadt) wurde das Sediment für 15 Minuten im Eisbad inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 12.000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 2,5fachen Volumen 96%igen Ethanol (Merck) gefällt. Anschließend wurde die Lösung für 15 Minuten bei 12.000UpM und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol (Merck, Karlsruhe) gewaschen, erneut für 5 Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, luftgetrocknet und in 50µl H₂O resuspendiert. Zur Qualitätskontrolle und zur Quantifizierung der DNA wurden Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem-ME Agarose, FMC) und photometrische Konzentrationsbestimmungen (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) durchgeführt.

3.6.2 Präparation der cDNA-Matrizen

Das zur Gewinnung der Riboproben verwendete Reninplasmid wurde bereits in anderen Experimenten der Gruppe von S. Bachmann (Charité, Berlin) verwendet. Für die Transkription der *Antisense-Probe* wurde das Plasmid mit HindIII linearisiert, um mit der T7-Polymerase (Roche) von der T7-Promotorstelle beginnend die Renin mRNA zu polymerisieren. Für die Generierung der Senseprobe wurde der Vektor mit KpnI linearisiert, um mit der Sp6-Polymerase (Roche) die mRNA herzustellen (alle Restriktionsendonukleasen von Invitrogen, Carlsbad, CA). Die erhaltene mRNA wurde mittels Lithium-Chlorid/Ethanol fällung (4M LiCl/100% Ethanol) gereinigt. Zur Qualitätskontrolle und zur Quantifizierung der mRNA wurden Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem-ME Agarose, FMC) und photometrische Konzentrationsbestimmungen (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) durchgeführt.

3.6.3 *In vitro* Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben

Zur Herstellung der markierten mRNA-Proben wurde ein Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix (Invitrogen)) verwendet. Für die Transkription wurden jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids zusammen mit 12 µl sterilem H₂O (Braun aqua ad inject. (B. Braun, Melsungen)), 2 µl Transkriptionspuffer (Roche), 2 µl DIG-Labeling Mix, 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Roche) und 1 µl RNase-Inhibitor (Fermentas, Burlington) für 2½ Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Verdau der cDNA-Matrize in einer ¼-stündigen Inkubation mit DNase (Boehringer). Die erhaltene RNA wurde mit Lithiumchlorid und 100% Ethanol über zwei Stunden bei -20°C gefällt, mit 80% Ethanol bei 4°C gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen. Um die mRNA zu quantifizieren und die Güte des Transkriptionsproduktes zu beurteilen, wurden photometrische Konzentrationsbestimmungen (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) und Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem-ME Agarose, FMC) durchgeführt.

3.6.4 *In situ*-Hybridisierung der Digoxigenin-markierten Riboproben

Für die *In situ* Hybridisierung (ISH) wurden Gefrierschnitte von 5µm Dicke verwendet. Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryostat (CM3000, Leica) hergestellt, auf silanisierte (1% Aminopropyltriethoxysilan in H₂O (Sigma)) Objektträger aufgebracht und für 15 Minuten in eisgekühltem 4%igen Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach mehreren Waschschritten (3 x 5 Minuten PBS, 2 x 5 Minuten H₂O, 2 x 5 Minuten PBS) und einem Deproteinierungsschritt (10 Minuten 0,1M HCl in PBS) wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,25%iger Essigsäure/0,1M Triethanolamin (J. T. Baker, Sigma) inkubiert. Es folgten zwei weitere, 5-minütige Waschschriffe in PBS und die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 Minuten in 70%, 80% und 96% Ethanol). Nachdem die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wurden, konnten sie mit dem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid (Merck), 40mM Tris-HCl (Merck) / HCl; pH 7,4, 25mM EDTA (Roth), 20mM NaCl, 0,25 mg/ml tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung (100x = 0,05% Ficoll, 0,05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% bovines Serumalbumin) (alle Produkte soweit nicht anders angegeben von Boehringer, Mannheim)) bedeckt und 1 bis 2 Stunden bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Nach Entfernen des Prähybridmix wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200mM Tris-HCl, pH 7,4; 1mM EDTA, pH 8; 0,2M Dithiothreitol (Biomol, Hamburg), 0,33M NaCl, 5mg/ml tRNA, 1mg/ml Heringesperma (beides Boehringer), 10x Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat (Sigma) und 200ng Digoxigenin-markierter Riboprobe (die optimale Sondenkonzentration wurde anfangs austitriert)) überschichtet. Die Schnitte wurden für 18 bis 20 Stunden bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurden jeweils *Sense*- und *Antisense*-Hybridisierungen durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer Natriumzitratlösung (2x Standard Sodium Citrat, SSC = 18% NaCl/15% Na-Citrat (beides Merck)) gewaschen. Es folgten weitere Waschschriffe in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 Minuten in 0,38 x SSC/50% deionisiertem Formamid und 1 Stunde in 0,1 x SSC/50% deionisiertem Formamid, beide Waschschriffe bei 40°C; 2 x 10 Minuten in 0,5 x SSC und 10 Minuten in 0,2 x SSC bei Raumtemperatur).

3.6.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte nach einer halben Stunde Inkubation mit Blockiermedium (1% Boehringer Blockingreagenz, 0,5% Rinderserumalbumin in 100mM Tris-HCl, pH7,5 /150 mM NaCl gelöst) mit einem alkalische-Phosphatase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer), 1:500 in Blockiermedium verdünnt, beschichtet. Nach 1 bis 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (Nitroblau-Tetrazolium und 5Bromo-4Chloro-3Indolyl-Phosphat pH 9,5) unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur durchgeführt und nach 40 Minuten abgestoppt. Nachdem die Schnitte für 15 Minuten in Tris-Puffer (100mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) gewaschen wurden, folgten zwei weitere Waschschrte für jeweils 15 Minuten in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin/PBS (Merck) eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.7 NADPH-Diaphorase-Reaktion

Zur Demonstration der Gewebeaktivität der NO-Synthase wurde die NADPH-Diaphorasereaktion durchgeführt. Hierbei wird Nitroblau-Tetrazolium in Gegenwart von NADPH durch die katalytische Aktivität der NO-Synthase der MD zu einem blauen Farbstoff umgesetzt (76). Zu diesem Zweck wurden am Kryostat (CM3000, Leica) 5µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf aminosilanbeschichtete Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten 30 Minuten luftgetrocknet. Nach der Hydrierung der Schnitte für 2 x 15 Minuten PBS; pH 7,4 bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte mit dem Entwicklungspuffer (0,01% Nitroblau Tetrazolium, 0,3% Triton X, 0,1% β-NADPH (alle: Sigma) in 0,1M Phosphatpuffer; pH 7,5) beschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Um die Spezifität dieser Reaktion zu kontrollieren, wurde ein Teil der Schnitte mit modifiziertem Entwicklungspuffer (NADH statt NADPH enthaltend) inkubiert, was zu einem Ausbleiben der Blaufärbung führte. Bei Vorliegen eines gut sichtbaren Signals in der MD wurde die Entwicklung durch Waschen (2x15 Minuten) in PBS bei

Raumtemperatur gestoppt. Alle Objektträger wurden im gleichen Experiment prozessiert und die Reaktion nach exakt 40 Minuten gestoppt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch.

3.8 Statistische Auswertung

Alle quantitativen Daten wurden als Mittelwert präsentiert. Die Immunoblots wurden densitometrisch ausgewertet, indem die Werte auf die jeweiligen Kontrollen (=100%) normalisiert wurden. Für die histologische Auswertung wurden entweder die Intensität der Färbung oder die positiv markierten Zellen in Bezug auf die Anzahl der im Sichtfeld des Mikroskops befindlichen Glomerula gesetzt, woraus ein Verhältnis zwischen positiven Zellen und Glomerula gebildet wurde.

Für die statistische Vergleichbarkeit der Werte wurde bei gleicher Varianz der unpaarige T-Test oder bei ungleichen Varianzen der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Resultate

4.1 Klinische Parameter und funktionelle Daten

Die siebenwöchige Behandlung von Ratten mit Methimazol führte zu einer dramatischen Abnahme der fT_3 -Konzentration im Serum (fT_3 : 0,1ng/l gegenüber 1,8ng/l \pm 0,08ng/l Kontrollniveau). Dieser Wert bestätigte den Erfolg der Methimazolbehandlung und bewies die experimentelle Einstellung einer Hypothyreose. Das mittlere Körpergewicht war im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 50% des Ausgangsgewichtes erniedrigt. Das Nierengewicht war sogar noch stärker und damit disproportional reduziert. Daraus ergab sich eine geringere Verhältniszahl zwischen Nieren- und Körpergewicht (83,6% des Kontrollniveaus).

Die Urinausscheidung stieg in den hypothyreoten Tieren auf das 1,7-fache der Kontrollgruppe und war begleitet durch eine markante Reduktion der Urinosmolarität (29,6%). Die Kreatinin-Clearance fiel auf 42,7%, die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) war jedoch deutlich angestiegen (3,5-fach). Die Serum-Natriumkonzentrationen waren unverändert im Normbereich. In den hypothyreoten Tieren wurde eine signifikante Erhöhung der Serumkreatininkonzentration gemessen (1,9-fach). Die Serum-Harnstoffkonzentration war verdoppelt.

Aufgrund der beschriebenen Korrelation zwischen Urin-ADH-Konzentration und Serum-ADH-Konzentration wurde eine mögliche Änderung des ADH-Status der Tiere durch Bestimmung des Hormons im Sammelurin überprüft.

Konzentrationen von ADH im Urin von hypothyreoten und Kontrolltieren zeigten keinen Unterschied. Durch die vermehrte Urinausscheidung war die Gesamtmenge des mit dem Urin ausgeschiedenen ADH in den hypothyreoten Tieren signifikant größer als in den Kontrolltieren. Auf die Urinmenge normalisiert ergab sich eine angestiegene Urin-Konzentration von ADH (1,6-fach). Daraus ergab sich die Wahrscheinlichkeit erhöhter Plasma-ADH Spiegel im hypothyreoten Tier.

Durch Substitution von T_3 unter der Methimazolbehandlung normalisierten sich die physiologischen Parameter in einem vierwöchigen Beobachtungszeitraum weitgehend (siehe Tabelle 2, physiologische Daten).

	Kontrolle	Methimazol	Methimazol und T ₃ - Substitution
fT ₃ , ng/l	2,98 ± 0,08	0,8 ± 0,05 # bei 2 Ratten	1,87 ± 0,015
fT ₄ , ng/dl	1,81 ± 0,08	0,1 #	nicht untersucht
Körpergewicht, g	358 ± 8	179 ± 6 **	280 ± 5,7
Nierengewicht, g	1,02 ± 0,02	0,41 ± 0,02	1,65 ± 0,03
Nierengewicht/Körpergewicht	0,0055 ± 0,0003	0,0046 ± 0,0002	0,0059 ± 0,0002
Plasma-Na ⁺ , mmol/l	142,2 ± 2,1	143,4 ± 0,7	nicht untersucht
Plasma-Kreatinin, mg/dl	0,32 ± 0,05	0,62 ± 0,05*	nicht untersucht
Plasma-Harnstoff, mg/dl	46,8 ± 8,2	95,2 ± 7,9*	nicht untersucht
Urin-Volumen, ml/20h	9,4 ± 1	15,7 ± 0,9**	nicht untersucht
Kreatinin-Clearance, ml/min	3,33 ± 1	0,58 ± 0,09**	2,31 ± 0,1
Clearance/1g Nierengewicht	1,64 ± 0,5	0,7 ± 0,09**	1,4 ± 0,1
FE _{Na} in %	0,2 ± 0,12	0,69 ± 0,3*	0,23 ± 0,02
Urinomolarität, mosmol/kgH ₂ O	1805 ± 308	534 ± 43**	nicht untersucht
ADH-Konzentration im Urin, pg/ml	71,02 ± 12	70,1 ± 23	nicht untersucht
ADH-Ausscheidung, pg/20h Sammelurin	678 ± 119	1084 ± 203**	nicht untersucht

Tabelle 2, physiologische Daten der 150g Tiere: Mittelwerte ± Standardabweichungen, # unterhalb der Nachweisgrenze, * P < 0,05; ** P < 0,005

4.2 Immunhistochemische Auswertung

4.2.1 Histomorphologie

Die morphologische Untersuchung der Nieren der hypothyreoten Ratten zeigte eine deutliche Verkleinerung der Glomerula und der proximalen Tubuli im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der glomeruläre Durchmesser war auf etwa 2/3 reduziert, Querschnittsprofile des proximalen Tubulus waren deutlich verkleinert; diese Beobachtungen entsprechen früheren morphometrischen Daten (3).

4.2.2 Verteilung und Signalintensität von NKCC2

Die immunhistochemische Färbung von Nierenschnitten mit anti-NKCC2 Antikörper zeigte sowohl bei den hypothyreoten als auch bei den Kontrollratten normal verteilte Signale ausschließlich im TAL. In den hypothyreoten Tieren konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren ein deutlich sichtbarer Anstieg der NKCC2-Signalintensität selektiv im medullären Teil des TAL festgestellt werden. Die Signalintensität von NKCC2 im kortikalen Anteil des TAL war in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 4).

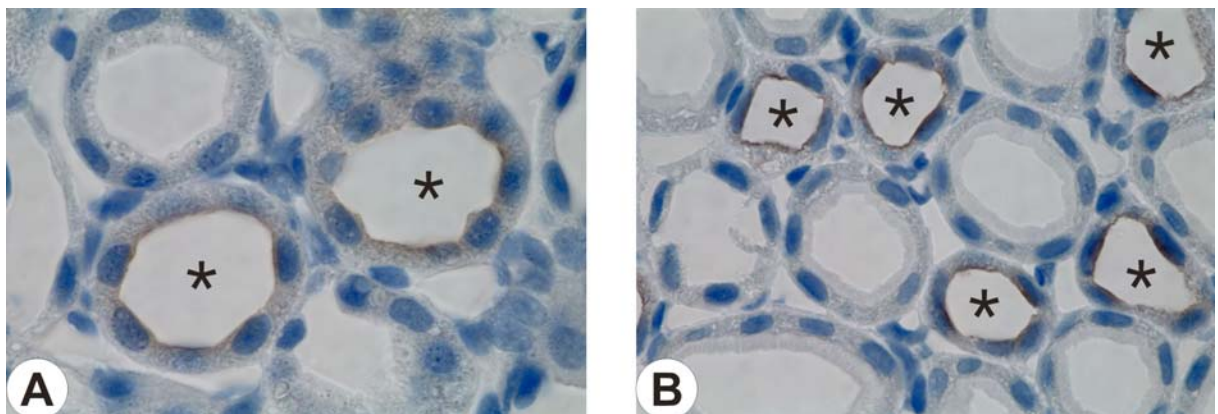


Abbildung 4. Immunfärbung von NKCC2 in Kontrolle (A) und hypothyreoter Niere (B). Der Vergleich von Signalintensitäten für NKCC2 im Epithel des apikalen Abschnittes des mTAL (*) zeigt einen deutlichen Anstieg in (B). Kerne sind mit Hematoxylin gegengefärbt. Vergrößerung 1000x

4.2.3 Verteilung und Signalintensität von Barttin

Der immunhistochemische Nachweis von Barttin in den Nieren der hypothyreoten Ratten und Kontrollratten zeigte normal verteilte Signale im TAL, DCT und CNT sowie in den Schaltzellen des CNT und des Sammelrohrs. Die

mit Methimazol behandelten Tiere zeigten eine ausgeprägte Steigerung der Barttin-Signalintensität im CNT, während im TAL und im medullären Sammelrohr keine deutlichen Unterschiede der Färbung registriert wurden (Abbildung 5).

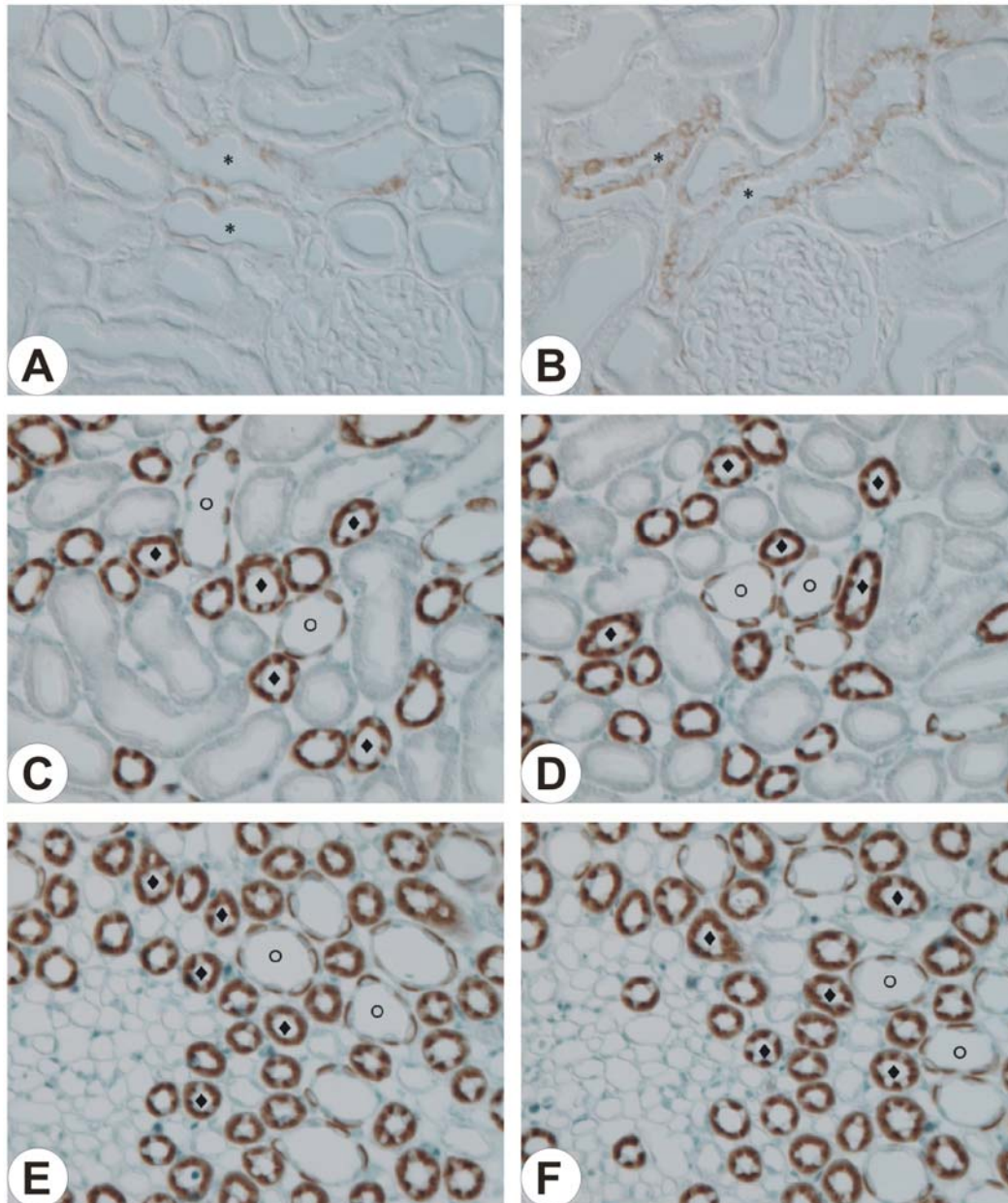


Abbildung 5. Immunfärbung von Barttin an repräsentativen Ausschnitten des Kortex (A, B), des Außenstreifens (C, D) und des Innenstreifens (E, F) von Kontrollnieren (A, C, E) und hypothyreoten Nieren (B, D, F). Für bessere Visualisierung der Veränderungen die Präparate im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) sowie mit Hematoxylin-Gegenfärbung (C-F). * distales Konvolut, O medulläres Sammelrohr (MCD), ♦ mTAL; Vergrößerung 200x

4.2.4 Verteilung und Signalintensität von NCC

Die immunhistochemische Markierung von NCC in den Nieren der hypothyreoten Ratten zeigte ein normales Expressionsmuster in der apikalen Membran des DCT. Es konnten keine Unterschiede in der Intensität oder Lokalisation des immunhistochemischen Signals für NCC zwischen hypothyreoten und Kontrollratten nachgewiesen werden (Abbildung 6).

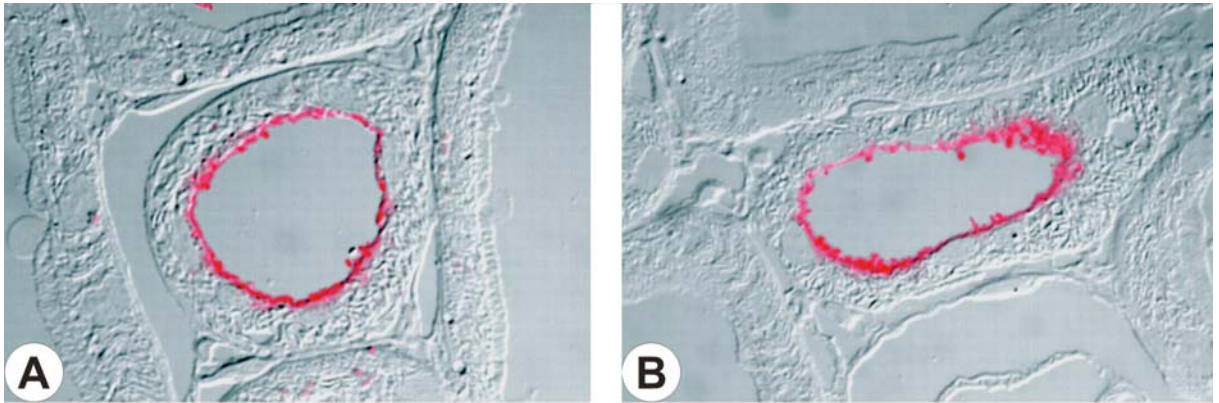


Abbildung 6. Immunfärbung von NCC in Nieren von Kontrolltieren (A) und hypothyreoten Tieren (B). Es wurden keine Unterschiede beobachtet. Vergrößerung 1000x

4.2.5 Verteilung und Signalintensität von α - , β - und γ -ENaC

Die Immunfluoreszenzmarkierung mit dem α -ENaC Antikörper zeigte ein starkes Signal in der apikalen Membran der Hauptzellen des kortikalen Sammelrohrs. Die Färbung des medullären Sammelrohrs war gleichmäßig im Zytoplasma der Zellen verteilt, was sich mit früheren Studien an gesunden Ratten deckte. Es konnten keine Unterschiede des Expressionsmusters zwischen den hypothyreoten und den Kontrollratten festgestellt werden (Abbildung 7).

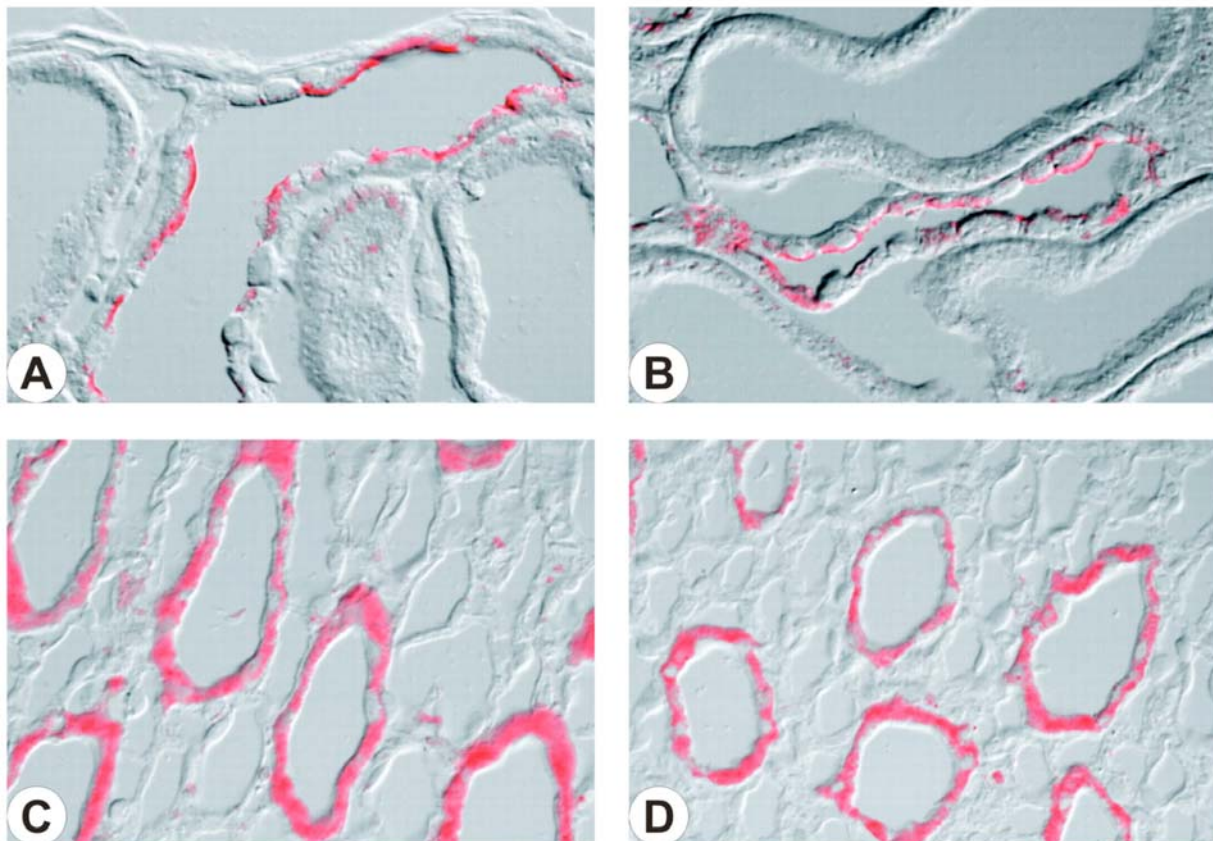


Abbildung 7. Immunfärbung von α -ENaC in Nieren von Kontrollen (A,C) und hypothyreoten Tieren (B,D). Das Signal in der apikalen Membran der Hauptzellen von CCD (A,B) und MCD (C,D) zeigt keine Gruppenunterschiede. Vergrößerung 1000x.

4.2.6 Verteilung und Signalintensität von AQP2

Das immunhistochemische Signal für AQP2 war bei Kontrollratten zytoplasmatisch verteilt sowie als luminaler Saum in den Sammelrohrhauptzellen erkennbar. Bei den hypothyreoten Tieren fand sich eine signifikante Abweichung hiervon. Hier konnte ein deutlich gesteigertes, luminales AQP2 Signal bei gleichzeitiger Verringerung des zytoplasmatischen Anteils beobachtet werden. (Abbildung 8).

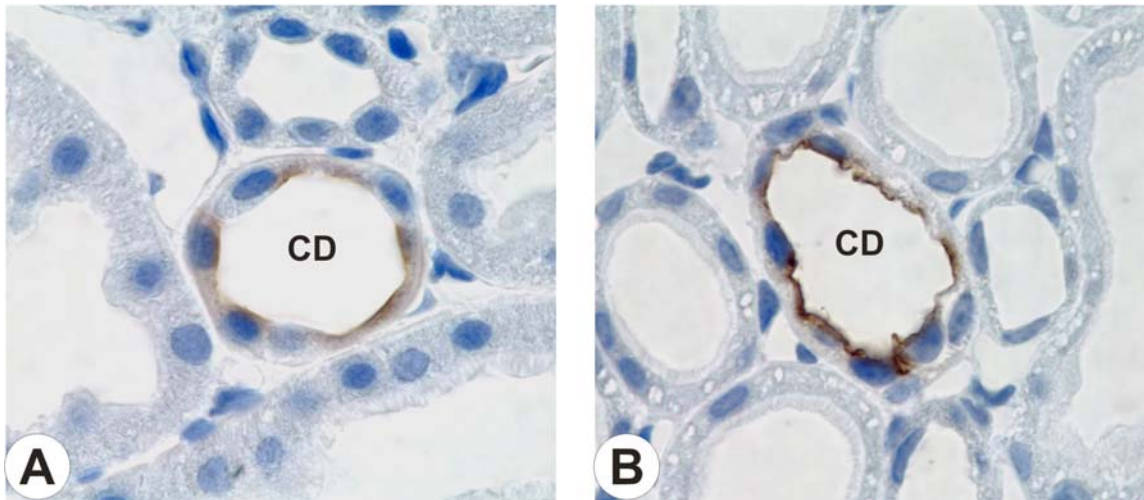
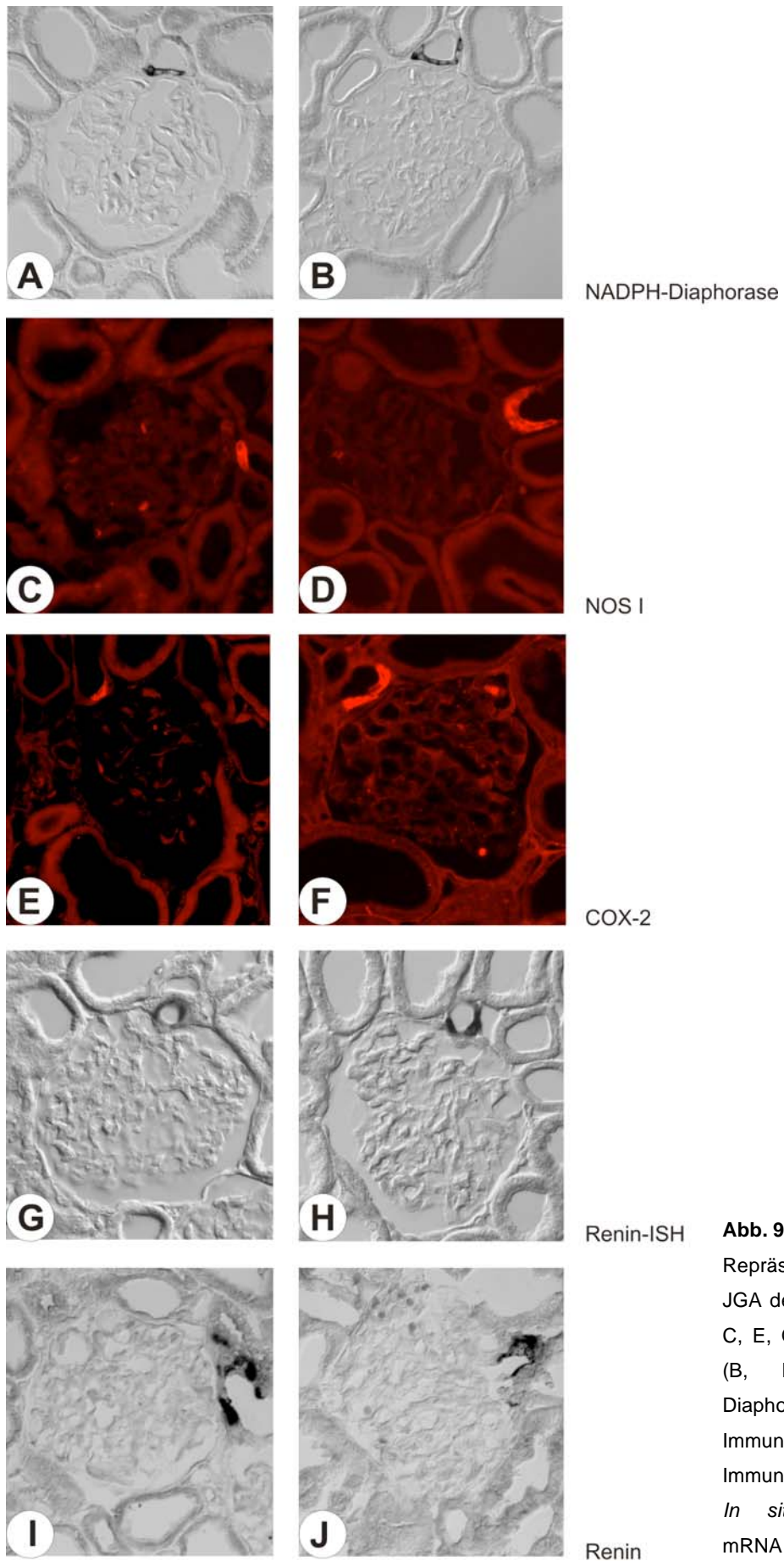


Abbildung 8. Immunfärbung von AQP2 in Nieren von Kontrollen (A) und hypothyreoten Tieren (B). Das Signal in der apikalen Membran der Hauptzellen von CCD zeigt bei hypothyreoten Tieren eine luminale Intensivierung (B). Hematoxylin-Gegenfärbung; Vergrößerung 1000x.

4.2.7 Verteilung und Signalintensität der JGA Parameter NOS1, COX-2 und Renin

Die semiquantitative Auswertung der NOS1 Aktivität mittels NADPH-Diaphorasereaktion zeigte in den hypothyreoten Nieren eine erhöhte Anzahl positiver MD-Zellen (Abbildung 9 A,B; Tabelle 3). Parallel zur Steigerung der Aktivität war die Immunreaktivität für NOS1 in Zellen der MD ebenfalls erhöht (Abbildung 9 C,D; Tabelle 3). Die COX-2-Immunreaktivität in den Zellen der MD war ebenfalls parallel erhöht (Abbildung 9 E,F; Tabelle 3). Die Renin mRNA war nicht verändert, während die Renin-Immunreaktivität gesteigert war (Abbildung 9 G-J; Tabelle 3).

**Abb. 9.**

Repräsentative Immunfärbungen des JGA der Nieren von Kontrolltieren (A, C, E, G, I) und hypothyreoten Tieren (B, D, F, H, J). NADPH-Diaphorasereaktion (A und B), Immunreaktivität von NOS1 (C und D), Immunreaktivität von COX-2 (E und F), *In situ*-Hybridisierung von Renin mRNA (G und H) und Immunreaktivität von Renin (I und J). Vergrößerung 400x.

	Kontrolle	Methimazol
	positive Zellen pro Glomerulum	
NOS1	0,92 ± 0,06	1,28 ± 0,21 *
NADPH-Diaphorase	0,72 ± 0,25	1,10 ± 0,25 *
COX-2	0,60 ± 0,18	1,14 ± 0,20 *
Renin	0,21 ± 0,07	0,39 ± 0,09 *
Renin <i>In situ</i> -Hybridisierung	0,14 ± 0,06	0,13 ± 0,08

Tabelle 3. Resultate der semiquantitativen immunhistochemischen Auswertung der JGA-Parameter. * $p < 0,05$

4.3 Proteinexpression aus Nierenhomogenisaten

4.3.1 Western blot

Die densitometrische Auswertung der Western blots für NHE3 und NaPi2a zeigte in den hypothyreoten Tieren eine deutliche Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 10; Tabelle 4). Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression in den hypothyreoten Tieren für NKCC2 und Barttin signifikant gesteigert. Die Signalstärken für NCC, die ENaC Untereinheiten und für Na, K-ATPase zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Für AQP2 zeigte sich in den hypothyreoten Tieren eine deutliche Steigerung der Proteinexpression.

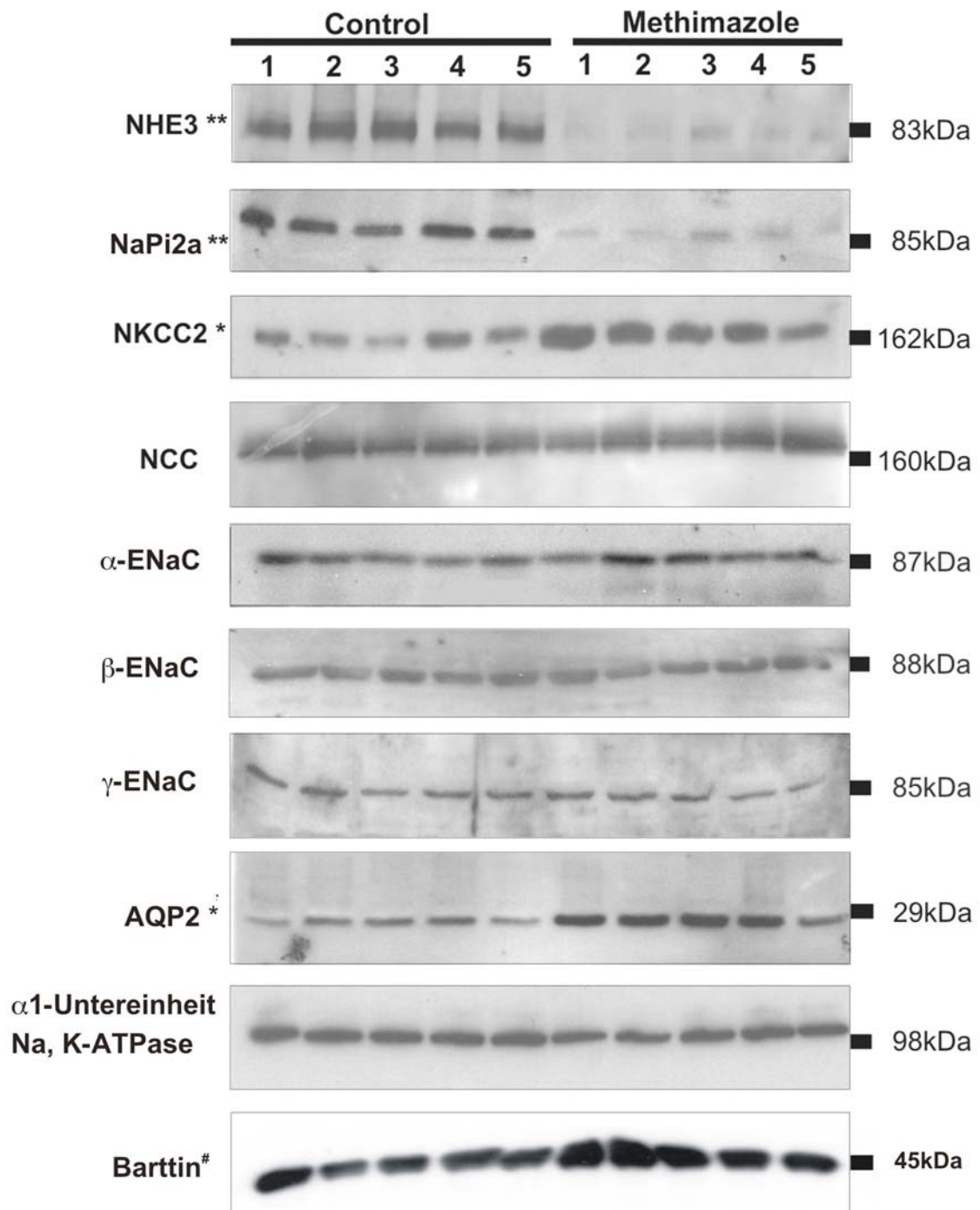


Abbildung 10. Immunreaktive Banden nach SDS PAGE und Western blot, erzeugt mit Hilfe von Antikörpern gegen NHE3, NaPi2a, NKCC2, α -, β -, γ - Untereinheit von ENaC, AQP2, α 1-Untereinheit von Na, K-ATPase, und Barttin. ** P < 0,0001, * P < 0,005, # P < 0,05

	Kontrolle Prozent	Methimazol Prozent der Kontrolle
NHE3	100 ± 7,3	12 ± 1,4**
NaPi2a	100 ± 8,4	14,4 ± 4,2**
NKCC2	100 ± 12	196 ± 18,7*
Barttin	100 ± 11,3	143 ± 11,4 [#]
NCC	100 ± 6	108 ± 1,1
α-ENaC	100 ± 7,4	111,6 ± 6
β-ENaC	100 ± 12,8	102,3 ± 9,7
γ-ENaC	100 ± 13,3	103 ± 7,1
Na, K-ATPase	100 ± 2,8	98 ± 6,1
AQP2	100 ± 15,7	250,3 ± 27,8*

Tabelle 4. Densitometrisch ermittelte Werte der Western blots von Abbildung 10. ** P < 0,0001, * P < 0,005, # P < 0,05

4.3.2 Rechnerische Präsentation der Werte

Für die Western blots wurden Taschen der Gele immer mit der gleichen Menge an Gesamtprotein geladen. Auf Grund des geringeren Nierengewichts der hypothyreoten Tiere wurde weniger Gesamtprotein gewonnen als von den Kontrolltieren. Daher ergibt sich, dass die Anteile der Transporter-Expressionsstärken bei den hypothyreoten Tieren - bezogen auf die jeweilige Gesamtnierenmenge - größer war als die der Kontrolltiere. Um dies in der Auswertung zu berücksichtigen, wurden die densitometrisch ermittelten Werte auf das Gesamtprotein bezogen, indem das Produkt aus der Gesamtproteinmenge und den densitometrisch ermittelten Werten gebildet wurde. Die Ergebnisse zeigten eine Reduktion der Proteinmenge für NHE3 und NaPi2a (Tabelle 5). Ebenso waren NCC, die ENaC Untereinheiten sowie die Na, K-ATPase signifikant erniedrigt.

Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Nierenfunktion erschien es weiterhin sinnvoll, die Werte auf einen physiologischen Parameter zu beziehen, der an den tubulären Transportprozess gekoppelt ist. Daher wurden die Proteinmengen auf die Kreatinin-Clearance normalisiert. Es zeigte sich eine starke Reduktion von NHE3 und NaPi2a, während die restlichen Transporter erhöhte Expressionen zeigten (Tabelle 5). Besonders stark angestiegen waren

NKCC2 und AQP2; dieser Befund wurde auf zellulärer Ebene durch die immunhistochemischen Unterschiede bestätigt (s.o.).

	Kontrolle (#)	Methimazol (#)	Kontrolle (°)	Methimazol (°)
	Normalisiert auf Gesamtprotein, %		Gesamtprotein/Kreatinin-Clearance, %	
NHE3	100 ± 2,6	4,3 ± 0,5 **	100 ± 9,4	21,9 ± 1,2 *
NaPi2a	100 ± 3	5,1 ± 1,5 **	100 ± 9,8	26,6 ± 3,0 *
NKCC2	100 ± 4,3	70,5 ± 6,7	100 ± 7,6	361,4 ± 5,2 **
NCC	100 ± 2,2	38,9 ± 0,4 *	100 ± 7,6	200,8 ± 5,5 *
α-ENaC	100 ± 2,7	40,2 ± 2,2 *	100 ± 7,7	204,2 ± 6,2 *
β-ENaC	100 ± 4,6	36,8 ± 3,5 *	100 ± 4,3	193,7 ± 5,1 **
γ-ENaC	100 ± 4,8	37,1 ± 2,5 *	100 ± 9,2	187,6 ± 5,3 **
AQP2	100 ± 5,6	90,1 ± 9,2 **	100 ± 9,4	443,1 ± 21,0 **
α ¹ -Na, K-ATPase	100 ± 1	35,2 ± 2,2 *	100 ± 9,6	184,2 ± 5,8 **
Barttin	100 ± 42	88,1 ± 22,7	100 ± 11,3	143,0 ± 11,4 *

Tabelle 5. Rechnerische Darstellung der densitometrisch ermittelten Werte der Western blots. (#), Werte auf Gesamtprotein normalisiert, (°) Werte auf Kreatinin-Clearance normalisiert. ** P < 0,0001, * P < 0,05

4.3.3 Methimazol behandelte und gleichzeitig T₃-substituierte Tiere

Um einen direkten Einfluss von Methimazol auf die Expression der Salz- und Wassertransporter auszuschließen, wurden methimazolbehandelte Ratten mit T₃ substituiert. Der Erfolg der Behandlung wurde durch die fT₃-Serumkonzentration kontrolliert. Die Konzentration der Schilddrüsenhormone war in den substituierten Tieren deutlich höher als in den mit Methimazol behandelten Tieren ($1,87 \pm 0,02$ vs. $0,8 \pm 0,05$ ng/l), lag jedoch niedriger als in den euthyreoten Kontrolltieren ($2,98\text{ng/l} \pm 0,08\text{ng/l}$). Nach 4 Wochen Substitution mit T₃ glich sich das Körpergewicht den Kontrolltieren an ($280 \pm 5,7\text{g}$ bei den substituierten vs. $276 \pm 4\text{g}$ bei den Kontrolltieren). Das Nierengewicht, bezogen auf das Körpergewicht ($0,0059 \pm 0,0002$ vs. $0,0055 \pm 0,0003$, Tabelle 2) sowie auch die Kreatinin-Clearance, bezogen auf das Nierengewicht ($1,4 \pm 0,1\text{ml} \times \text{min}^{-1}/1\text{g}$ Nierengewicht vs. $1,64 \pm 0,5\text{ml} \times \text{min}^{-1}/1\text{g}$ Nierengewicht, Tabelle 2), näherten sich dem Kontrollniveau an. Die densitometrische Auswertung der Western blots zeigte eine Normalisierung der Proteinmenge von NHE3 ($81,5 \pm 6,2\%$ vs. $100 \pm 4,1\%$ Kontrollniveau), NKCC2 ($139,5 \pm 4\%$ vs. $100 \pm 3,1\%$), NaPi2a ($56 \pm 2\%$ vs. $100 \pm 8\%$) und AQP2 ($158,9 \pm 6,2\%$ vs. $100 \pm 5,1\%$).

5 Diskussion

Beim Menschen ist die Hypothyreose im Vollbild assoziiert mit Hyponatriämie bei non-osmotischer ADH-Freisetzung und verminderter GFR; der Phänotyp geht bis hin zum klinischen Bild des Myxödems (77). ADH-Freisetzung und erniedrigte GFR können über mangelhafte Harnverdünnung bei fortgeschrittener Hypothyreose verdecken, dass bei diesem Krankheitsbild eigentlich eine Konzentrierungsstörung zugrunde liegt, die bei moderater Hypothyreose auch im Tiermodell belegt worden ist (4). Eine Abnahme der proximalen NaCl-Resorption ist beobachtet worden (78), und eine spätere Studie hat die Reduktion proximaler und distaler Transporter bei mäßiggradiger Hypothyreose im Tiermodell aufgedeckt, allerdings bei unveränderter GFR und normalen ADH-Werten; einige tubuläre Transporter und Kanäle, hierunter NHE3, NKCC2 und Aquaporine waren dabei in ihrer Expression vermindert, was den Konzentrierungsdefekt belegen sollte (4).

In unserer Studie wurde ein Modell mit stärker ausgeprägter Hypothyreose gewählt. Die Ratten mit Methimazol-induzierter Hypothyreose zeigten erhöhte ADH-Werte, verringerte GFR, und eine ausgeprägte Verringerung des normalen Zuwachses von Körper- und Nierengewicht. Der Harnfluss und die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) waren ebenfalls gesteigert. Dazu waren in der Tat, wie in der genannten Studie (4) die Expression von Proteinen, die mit dem Natrium- und Wassertransport in Zusammenhang stehen, verändert, wenn auch in anderem Umfang. Die exogene Substitution von T_3 konnte diese Veränderungen der Transporter und Kanäle rückgängig machen. Daraus folgt, dass das Pharmakon Methimazol selbst keine direkte Auswirkung auf die Transporterexpression hatte. Da die Unterschiede in Nierengröße (entspricht Nierenmasse bzw. Nierengewicht) und GFR zwischen den Gruppen bedeutend waren, musste die Entscheidung, ob die Proteinmenge für einen ins Auge gefassten Transporter unverändert geblieben, gestiegen oder gesunken war, unter der Abwägung getroffen werden, diese beiden Parameter mit einzurechnen. Wir haben daher einerseits die densitometrischen Werte aus den Western blot-Ansätzen für die Transporter normalisiert auf das Nierengewicht

und durch Einsatz gleicher Proteinmengen pro Gelspur standardisiert, da es plausibel erschien, anzunehmen, dass zwischen Nierenmasse und Protein-Abundanz eine lineare Beziehung besteht. Andererseits haben wir auch die Gesamtmenge der Proteine pro Niere absolut errechnet und diese Werte auf die GFR bezogen ausgedrückt. Letztlich haben wir zusätzlich die immunhistochemische Signalstärke berücksichtigt, die die Proteinmenge eines Transporters oder Kanals in einer individuellen Epithelzelle anzeigt.

Alle Transporter- und Kanalproteine in unserer Studie waren in ihrer Menge entweder erniedrigt oder unverändert nach Methimazolbehandlung, sofern sie auf die Nierenmasse normalisiert angegeben wurden. Somit ergaben sich für NHE3 und NaPi2a starke Absenkungen, während NKCC2 und AQP2 unverändert waren bzw. immunhistochemisch ein verstärktes Signal zeigten. NCC und die ENaC Untereinheiten sowie auch die Na, K-ATPase waren unverändert und zeigten auch immunhistochemisch keine Unterschiede.

Normalisiert auf die individuelle GFR zeigten NHE3 und NaPi2a ebenfalls verringerte Abundanzen, während die übrigen, distalen Transportproteine Anstiege zeigten. Die letzteren wiesen damit auf ihre Regulation bei Hypothyreose hin, die einer verstärkten Transportleistung bei gegebener Filtratmenge entsprechen dürfte; Grund kann eine proximal verringerte tubuläre Resorption sein, die damit distal ausgeglichen werden könnte.

Die parallele Verringerung von NHE3- und NaPi2a-Mengen der hypothyreoten Nieren ist im Einklang mit früheren Daten (18, 26). Eine abgesenkte Expression dieser Parameter wurde auch bei Ratten mit chronischem Nierenversagen gefunden (79), und da wir bei den hypothyreoten Ratten angestiegene Serum-Harnstoffkonzentration und Serum-Kreatininspiegel fanden, könnten diese Aspekte analog zur Veränderung der Transportermengen beigetragen haben. Reduzierte GFR und verringertes tubulärer Harnfluss, die beide den luminalen Na/H-Austausch verringern, könnten ebenfalls eine reduzierte NHE3-Expression bewirkt haben (80). Allerdings ist ein erniedrigter proximal-tubulärer Transport auch bei Hypothyreose unter noch im Normbereich liegender GFR

beobachtet worden, was eher das Argument stärkt, dass T_3 als direkter Stimulator der Transkriptionsraten für NHE3 und NaPi2a fungiert (11, 18).

Ungeachtet der erniedrigten GFR war der NKCC2 - als bedeutendster NaCl-Transporter des distalen Nephrons - bei Hypothyreose unverändert bzw. bei Einrechnung von GFR und Nierenmasse sowie im immunhistochemischen Bild in seiner Menge gesteigert. Es ist wahrscheinlich, dass für diese Zunahme die verringerte proximale Resorption mit nachfolgendem Anstieg der distalen Natrium-Ladung verantwortlich ist (81). Es ist allerdings auch denkbar, dass die Anstiege, die für NKCC2 und parallel auch für AQP2 beobachtet worden sind, mit einer erhöhten Freisetzung von ADH und V2-Rezeptor-vermittelter Signalgebung im Zusammenhang stehen. ADH reguliert mehrere Ionentransporter des Nephrons (35, 82, 83), zu denen auch mit Blick auf den medullären NaCl-Transport im TAL der NKCC2 gehört (35, 84). Die Auswirkungen der Hypothyreose auf die ADH-Freisetzung sind bei Patienten und Tiermodellen unterschiedlich dargestellt worden (85-88). Allerdings wurden zumeist nur die Plasma-ADH-Spiegel bestimmt, die kurzfristigen Veränderungen durch Faktoren wie Stress und experimentellen Bedingungen unterworfen sind und daher als Prädiktoren für die Aktivität des ADH-Systems nicht bedingungslos geeignet sind (85). Um hier bessere Einsicht zu gewinnen, haben wir die Harn-ADH-Spiegel bestimmt und fanden hier die ADH-Ausscheidung bei der hypothyroiden Gruppe signifikant vermehrt, was für eine Intensivierung der Biosynthese von NKCC2 und AQP2 durch ADH spricht.

Weitere vorliegende Daten sprechen für eine ADH-abhängige Aktivierung auch von Na(Cl)-Transportern des distalen Konvoluts und des Sammelrohrsystems (59, 81, 82). In unserer Studie waren NCC und die Untereinheiten des Na-Kanals ENaC in der Tat, sofern auf die GFR normalisiert, hochregelt bei der hypothyreoten Gruppe; da sich jedoch beim Bezug auf die Nierenmasse sowie im immunhistochemischen Bild keine Änderung ergab, scheint der Einfluss von Schilddrüsenhormonmangel auf diese Transporter von untergeordneter Bedeutung.

Als ein weiterer Umstand muss allerdings berücksichtigt werden, dass ADH auf Rezeptorebene bei Hypothyreose eine verringerte Wirksamkeit besitzen könnte. Verringerte cAMP-Freisetzung wurde hierzu im Nierenmark in einer älteren Studie gefunden (89), und auch in Leberzellen wurden ähnliche Befunde erhoben (90). Es kann also sein, dass im hypothyreoten Organismus die ADH-V2R-vermittelte Signalkette in ihrer Wirkung reduziert ist. Ein weiterer Faktor, der die Wirksamkeit von ADH ebenfalls verringern könnte, dürfte durch eine Verringerung der Osmolyte des medullären Interstitiums entstehen und damit die verminderte Harnkonzentrierungsfähigkeit sowie den erhöhten Harnfluss bei Hypothyreose erklären; Messungen wurden hierzu in früherer Zeit vorgenommen (91).

Ein weiterer Grund für die Saluresis bei Hypothyreose kann die reduzierte Na, K-ATPase-Aktivität und die begleitende Triebkraftverringerung zur Aufrechterhaltung des Ionenkonzentrationsgradienten im renalen Konzentrierungsmechanismus sein; dies wurde für den proximalen Tubulus und das Sammelrohrsystem berichtet (15). Herabgesetzte Na, K-ATPase-Aktivität ist offenbar assoziiert mit einer verringerten Expression der β -Untereinheit der Natrium-, „Pumpe“ (9). Auch soll die Mineralokortikoid-Sensitivität und damit wiederum nachfolgend die Na, K-ATPase-Aktivität durch T_3 gefördert werden (15); dies kann auch für NCC, zumindest anteilig im distalen DCT, und für den ENaC von Bedeutung sein, da diese durch Mineralokortikoide aktivierbar sind. Da in unserer Studie die Na, K-ATPase jedoch nur geringgradig verändert war, indem sie – wie auch NCC und ENaC – nur parallel zum Nierengewicht bei den hypothyreoten Ratten in ihrer Abundanz verringert war (α 1-Untereinheit), stellt sich die Frage, ob es eines zusätzlichen, belastenden Faktors bedarf, um im hypothyreoten Organismus tatsächlich eine T_3 -Mangel-bedingte, kausale Leistungsverminderung dieser Proteine zu bewirken, wie anderweitig vermutet (92).

Weiterhin ist es vorstellbar, dass strukturelle Veränderungen der Niere bei Schilddrüsenunterfunktion zum vermuteten Mangel an distaler Salzresorption führen könnten. So konnten wir Informationen bestätigen, die auf eine Disproportionalität der renalen gegenüber der allgemeinen Wachstumsstörung

verweisen (3, 93). Eine Vermessung der Länge mikrodissasierter Nierentubuli hat ergeben, dass hauptsächlich die Länge proximalen und distalen Tubuli für die disproportionale Größe der Niere verantwortlich waren, während die Reduktion des glomerulären Wachstums eher im Rahmen der allgemeinen Wachstumsretardierung des Körpers erfolgt war (3). Nimmt man an, dass die distale Filtrat-Ladung bei hypothyreoten und gesunden Tieren ähnlich war, so erscheint es damit plausibel, dass die distale Filtratresorption schon bei gleicher Funktion der relevanten Transporter im hypothyreoten Zustand eine verminderte Leistung erbringen könnte.

Abschließend haben unsere Daten weiterhin gezeigt, dass die hypothyreote Stoffwechsellage das lokale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System deutlich beeinflusst. Die gesteigerten Expressionswerte der Macula densa-Parameter NOS-1 und COX-2 deuten auf eine verringerte Salzladung des Filtrats auf Höhe der Macula densa hin (94, 95). Trotz des angenommenen proximal-tubulären Transportdefizits könnte es durch eine überschießende Aktivierung von NKCC2 im medullären Abschnitt des TAL zu einer verminderten Salzbeladung an der Macula densa kommen. Die vermehrte Ausscheidung von ADH und die gesteigerte Expression von AQP2 weisen darauf hin, dass über V2R-Stimulation eine Aktivierung in der Tat der Salztransport im medullären TAL gesteigert sein könnte (35). Die erhöhten Renin-Expressionswerte der hypothyreoten Gruppe zeigen auch in die Richtung einer verminderten Salzladung auf Höhe des JGA, da in einer solchen Konstellation die juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole gleichfalls aktiviert sind (40, 96). Eine verringerte Salzladung an der Macula densa kann weiterhin eine Steigerung der GFR einleiten (97, 98), die im hypothyreoten Organismus eine kompensatorische Rolle zur Aufrechterhaltung der Filtration spielen könnte.

Zusammenfassend können folgende grundlegende Überlegungen zu den hier beschriebenen Versuchsergebnissen angestellt werden.

Funktionell besteht, wie seit langem bekannt (99), die Notwendigkeit einer intakten Schilddrüsenfunktion, um den renalen Salzhaushalt aufrecht zu erhalten. Die in unserer Studie erarbeiteten Daten zur Expression von Na-transportierenden Kotransporter-, Austauscher- und Kanalproteinen ergeben

indirekte Hinweise auf geänderte transepitheliale NaCl-Transportleistungen in den einzelnen Tubulusabschnitten. Die in den hypothyreoten Ratten stark angestiegene fraktionelle Natriumausscheidung stützt diese Sicht. Allerdings konnten in dieser Studie keine Hinweise auf eine profund gestörte Bilanz des Salzhaushaltes bei Hypothyreose beobachtet werden, was Ergebnisse älterer Studien bestätigt (7). Zusätzliche Manipulationen wie die Behandlung mit salzarmer Diät, aber auch mit Salz- oder Wasserbeladung scheinen erforderlich, um funktionell die Bilanz empfindlicher zu stören und den Sachverhalt einer übermäßigen Natriumausscheidung im hypothyreoten Organismus tatsächlich zu spiegeln (99-101).

6 Zusammenfassung

Einleitung: Die Hypothyreose führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Organismus. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen führt beim Heranwachsenden zu einer Wachstumsretardierung, die mit einer Verkleinerung der Nieren einhergeht. Beeinträchtigt sind neben dem Wachstum der Niere Struktur, Funktion und Biosynthese nierenspezifischer Genprodukte. Hypothyreose führt daher zu renalen Funktionsstörungen wie reduzierter GFR und Kreatinin-Clearance, verminderter Salzresorption renaler Epithelien, Beeinträchtigung des Konzentrationsmechanismus und einer Fehlregulation des Wasserhaushalts. Im proximalen Tubulus wurde verminderte Expression des Natrium-Protonen Austauschers Typ 3 (NHE3), des Natrium-Phosphat-Kotransporters Typ 2a (NaPi2a) sowie generell der tubulären Natrium-Kalium-ATPase (Na, K-ATPase) berichtet.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Expression distaler Natriumchlorid-Kotransporter (Bumetanid-sensitiver Na,K,2Cl-Kotransporter Typ 2 [NKCC2], Thiazid-sensitiver Na,Cl-Kotransporter [NCC]), des epithelialen Natriumkanals (ENaC), der Na, K-ATPase und des Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) mit Blick auf die Funktion des renalen Konzentrationsmechanismus und mögliche Mechanismen des Salzverlusts in der Niere zu untersuchen.

Methoden: Junge adulte Ratten wurden in Versuchs- und Kontrollgruppe aufgeteilt. Beide Gruppen hatten freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser. Der Versuchsgruppe wurde 0,05% Methimazol im Trinkwasser über 7 Wochen zur Induktion einer Hypothyreose verabreicht. Um den direkten Einfluss von Methimazol zu kontrollieren, wurde in einer weiteren Versuchsgruppe zusätzlich zur Methimazolbehandlung Schilddrüsenhormon (T_3) substituiert. Den Kontrollen wurde Wasser verabreicht. Klinische Parameter, Nierengewicht und Nierenfunktionsdaten wurden erhoben. Am Versuchsende wurden bei einem Teil der Tiere die Nieren perfusionsfixiert und histochemisch aufgearbeitet, bei den übrigen wurden die Nieren unfixiert entnommen und per Western blot auf die Expression von Transportproteinen und parakrinen Mediatoren hin untersucht.

Resultate: Die Nieren- und Körpergewichte sowie die Kreatinin-Clearance der behandelten Gruppen waren stark reduziert. Die Glomerula waren deutlich verkleinert. Harnfluss und fraktionelle Natrium-Ausscheidung waren gesteigert, Plasma-Natriumspiegel jedoch unverändert. Endokrine Indikatoren wie renales Renin und Harn-ADH-Werte) waren stark erhöht. Die Proteinmengen von NHE3 und NaPi2a waren reduziert. Die Proteinmengen für NKCC2 und AQP2 waren, bezogen auf die Kreatinin-Clearance als Spiegel der Nierenfunktion, im Vergleich zur Kontrollgruppe stark angestiegen. Ebenfalls gesteigert waren die in der Macula densa exprimierten und der Signalmodulation am juxtaglomerulären Apparat dienenden Enzyme NO-Synthase-1 (NOS1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2).

Konklusion: Unsere Resultate weisen trotz unbeeinflusster Plasma-Natriumspiegel auf drastische Veränderungen essentieller Nierenparameter bei experimenteller Hypothyreose im Rattenmodell hin. Die Proteinmengen für NHE3 und NaPi2a sind - vermutlich sowohl durch Schilddrüsenhormonmangel als auch durch die verringerte GFR - stark abgesunken. Im Gegensatz hierzu ist der NKCC2 der aufsteigenden Henle-Schleife vermehrt exprimiert. Die vermehrte Harnausscheidung von ADH als Spiegel erhöhter ADH-Plasmakonzentration kann hiermit im Zusammenhang stehen, da NKCC2 durch ADH über V2-Rezeptorbindung in seiner Biosynthese und Funktion stimuliert wird. Hierdurch kann es am juxtaglomerulären Apparat zu einer verminderten Salzbeladung an der Macula densa kommen, die wiederum die beobachtete Stimulation der juxtaglomerulären Modulatoren NOS1 und COX-2 in Gang setzt. Die gesteigerte Reninsynthese ist hiermit im Einklang. Eine erhöhte AQP2-Expression kann als Antwort auf das vermehrte ADH mit einer zusätzlichen Aktivierung der renalen Harnkonzentrierung verstanden werden. Die Aktivierung von NKCC2, AQP2 und den juxtaglomerulären Parametern könnte somit bedeuten, dass der Organismus dem Volumenverlust hiermit entgegenwirkt. NCC, ENaC, und Na, K-ATPase waren nur mäßig verändert und spielen wahrscheinlich bei dieser Kompensation eine untergeordnete Rolle.

Da die Natriurese im *Steady state* bei erhöhtem Harnfluss stabil war, ist auch für das Tiermodell anzunehmen, dass eine zusätzliche Belastung der Salz- und Wasserhomöostase, etwa durch Salzbeladung, wie beim Menschen bekannt, bei hypothyreoter Stoffwechsellage mit überhöhter Natriurese und klinischen Symptomen einhergehen würde; die vorgelegten Daten legen hier den Grundstein für ein besseres Verständnis der ablaufenden Veränderungen.

7 Literaturverzeichnis

1. Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd. 1. Urban & Fischer Bei Elsevier; 2002
2. Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, Reville P. The thyroid and the kidney. *Kidney Int.* 1974;6:346-365.
3. Bradley SE, Coelho JB, Sealey JE, Edwards KD, Stephan F. Changes in glomerulotubular dimensions, single nephron glomerular filtration rates and the renin-angiotensin system in hypothyroid rats. *Life Sci.* 1982;30:633-639.
4. Cadnapaphornchai MA, Kim YW, Gurevich AK, Summer SN, Falk S, Thurman JM, Schrier RW. Urinary concentrating defect in hypothyroid rats: role of sodium, potassium, 2-chloride co-transporter, and aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:566-574.
5. Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Yang J, et al. Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F672-8.
6. Davis RG, Madsen KM, Fregly MJ, Tisher CC. Kidney structure in hypothyroidism. *Am J Pathol.* 1983;113:41-49.
7. Katz AI, Emmanouel DS, Lindheimer MD. Thyroid hormone and the kidney. *Nephron.* 1975;15:223-249.
8. Estevez R, Boettger T, Stein V, et al. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature.* 2001;414:558-561.
9. Horowitz B, Hensley CB, Quintero M, Azuma KK, Putnam D, McDonough AA. Differential regulation of Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and beta subunit mRNA and protein levels by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 1990;265:14308-14314.
10. Schmitt R, Dittrich AM, Groneberg D, Griethe W. Hypoosmolare Hyponatriämie als Leitsymptom bei Hypothyreose. *Med Klin.* 2002;97:484-487.

11. Sorribas V, Markovich D, Verri T, Biber J, Murer H. Thyroid hormone stimulation of Na/Pi-cotransport in opossum kidney cells. *Pflugers Arch.* 1995;431:266-271.
12. Kriz W. TRPC6 - a new podocyte gene involved in focal segmental glomerulosclerosis. *Trends Mol Med.* 2005;11:527-530.
13. Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin.* Urban & Fischer Bei Elsevier; 2006
14. De Santo NG, Capasso G, Kinne R, et al. Tubular transport processes in proximal tubules of hypothyroid rats. Lack of relationship between thyroidal dependent rise of isotonic fluid reabsorption and Na⁺ -K⁺ -ATPase activity. *Pflugers Arch.* 1982;394:294-301.
15. Barlet C, Doucet A. Triiodothyronine enhances renal response to aldosterone in the rabbit collecting tubule. *J Clin Invest.* 1987;79:629-631.
16. Aronson PS. Ion exchangers mediating Na⁺, HCO₃⁻ and Cl⁻ transport in the renal proximal tubule. *J Nephrol.* 2006;19 Suppl 9:S3-S10.
17. Biber J, Gisler SM, Hernando N, Wagner CA, Murer H. PDZ interactions and proximal tubular phosphate reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287:F871-5.
18. Cano A, Baum M, Moe OW. Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. *Am J Physiol.* 1999;276:C102-8.
19. Murer H, Hopfer U, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J.* 1976;154:597-604.
20. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet.* 1998;19:282-285.
21. Biber J, Custer M, Magagnin S, et al. Renal Na/Pi-cotransporters. *Kidney Int.* 1996;49:981-985.
22. Custer M, Lotscher M, Biber J, Murer H, Kaissling B. Expression of Na-P(i) cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am J Physiol.* 1994;266:F767-74.
23. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int.* 2006;70:1548-1559.

24. Hernando N, Gisler SM, Pribanic S, et al. NaPi-IIa and interacting partners. *J Physiol*. 2005;567:21-26.
25. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:531-542.
26. Alcalde AI, Sarasa M, Raldua D, et al. Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. *Endocrinology*. 1999;140:1544-1551.
27. Kohrle J, Rasmussen UB, Rokos H, Leonard JL, Hesch RD. Selective affinity labeling of a 27-kDa integral membrane protein in rat liver and kidney with N-bromoacetyl derivatives of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J Biol Chem*. 1990;265:6146-6154.
28. Schomburg L, Riese C, Michaelis M, et al. Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology*. 2006;147:1306-1313.
29. Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Schrier RW. Clinical update on renal aquaporins. *Biol Cell*. 2005;97:357-371.
30. Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. Springer, Berlin; 2004
31. Hediger MA, Smith CP, You G, Lee WS, Kanai Y, Shayakul C. Structure, regulation and physiological roles of urea transporters. *Kidney Int*. 1996;49:1615-1623.
32. Kim YH, Kim DU, Han KH, et al. Expression of urea transporters in the developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F530-40.
33. Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, et al. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet*. 2001;29:310-314.
34. Seyberth HW. An improved terminology and classification of Bartter-like syndromes. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4:560-567.
35. Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jons T, Muller-Esterl W, Bachmann S. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293:F1166-77.

36. Obermuller N, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest.* 1996;98:635-640.
37. Schrier RW. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1820-1832.
38. Schnermann J, Levine DZ. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:501-529.
39. Hashimoto S, Huang Y, Briggs J, Schnermann J. Reduced autoregulatory effectiveness in adenosine 1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F888-91.
40. Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 1998;274:R263-79.
41. Harris RC. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17:64-69.
42. Schnermann J. Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1735-1738.
43. Harris RC BMD. Harris RC and Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F1-11.
44. Paliege A MD, Medina C, Pasumarthy A, Huang YG, Bachmann S, Briggs JP, Schnermann JB, Yang T. Inhibition of nNOS expression in the macula densa by COX-2-derived prostaglandin E(2). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287:F152-9.
45. Obermuller N, Bernstein P, Velazquez H, et al. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol.* 1995;269:F900-10.
46. Loffing J, Loffing-Cueni D, Hegyi I, et al. Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int.* 1996;50:1180-1190.
47. Reilly RF, Shugrue CA, Lattanzi D, Biemesderfer D. Immunolocalization of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in rabbit kidney. *Am J Physiol.* 1993;265:F327-32.
48. Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R, Ellison DH. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat Embryol (Berl).* 1999;200:447-468.

49. Bostanjoglo M, Reeves WB, Reilly RF, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1347-1358.
50. Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC. Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol.* 1994;127:1907-1921.
51. Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287:F593-601.
52. Loffing J, Kaissling B. Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284:F628-43.
53. Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol.* 1994;267:C1682-90.
54. Canessa CM, Schild L, Buell G, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature.* 1994;367:463-467.
55. Rossier BC. 1996 Homer Smith Award Lecture. Cum grano salis: the epithelial sodium channel and the control of blood pressure. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:980-992.
56. Rossier BC, Canessa CM, Schild L, Horisberger JD. Epithelial sodium channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994;3:487-496.
57. Fommei E, Iervasi G. The role of thyroid hormone in blood pressure homeostasis: evidence from short-term hypothyroidism in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1996-2000.
58. Boini KM, Nammi S, Grahammer F, Osswald H, Kuhl D, Lang F. Role of serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in glucocorticoid regulation of renal electrolyte excretion and blood pressure. *Kidney Blood Press Res.* 2008;31:280-289.

59. Nicco C, Wittner M, DiStefano A, Jounier S, Bankir L, Bouby N. Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension*. 2001;38:1143-1149.
60. Seldin DW, Giebisch GH. *The kidney : physiology and pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:2 v.
61. Knepper MA, Inoue T. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:560-564.
62. Lorenz D, Krylov A, Hahm D, et al. Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells. *EMBO Rep*. 2003;4:88-93.
63. Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S, Marumo F. Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:861-867.
64. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1013-1017.
65. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Yamamoto T, Kuwahara M, Marumo F. Immunolocalization and effect of dehydration on AQP3, a basolateral water channel of kidney collecting ducts. *Am J Physiol*. 1997;272:F235-41.
66. Kim YH, Kwon TH, Christensen BM, et al. Altered expression of renal acid-base transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F1244-57.
67. Klein JD, Murrell BP, Tucker S, Kim YH, Sands JM. Urea transporter UT-A1 and aquaporin-2 proteins decrease in response to angiotensin II or norepinephrine-induced acute hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:F952-9.
68. Schrier RW. Vasopressin and aquaporin 2 in clinical disorders of water homeostasis. *Semin Nephrol*. 2008;28:289-296.
69. Trepanier LA. Medical management of hyperthyroidism. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2006;21:22-28.
70. Diederich S, Eckmanns T, Exner P, Al-Saadi N, Bahr V, Oelkers W. Differential diagnosis of polyuric/polydipsic syndromes with the aid of

- urinary vasopressin measurement in adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54:665-671.
71. Biber J, Murer H, Forster I. The renal type II Na⁺/phosphate cotransporter. *J Bioenerg Biomembr*. 1998;30:187-194.
 72. Brooks HL, Sorensen AM, Terris J, et al. Profiling of renal tubule Na⁺ transporter abundances in NHE3 and NCC null mice using targeted proteomics. *J Physiol*. 2001;530:359-366.
 73. Klussmann E, Rosenthal W. Role and identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin-mediated aquaporin-2 translocation. *Kidney Int*. 2001;60:446-449.
 74. Hager H, Kwon TH, Vinnikova AK, et al. Immunocytochemical and immunoelectron microscopic localization of alpha-, beta-, and gamma-ENaC in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F1093-106.
 75. Birnboim HC DJ. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7:1513-1523.
 76. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1995;268:F885-98.
 77. Discala VA, Kinney MJ. Effects of myxedema on the renal diluting and concentrating mechanism. *Am J Med*. 1971;50:325-335.
 78. Michael UF, Barenberg RL, Chavez R, Vaamonde CA, Papper S. Renal handling of sodium and water in the hypothyroid rat. Clearance and micropuncture studies. *J Clin Invest*. 1972;51:1405-1412.
 79. Kwon TH, Frokiaer J, Fernandez-Llama P, Maunsbach AB, Knepper MA, Nielsen S. Altered expression of Na transporters NHE-3, NaPi-II, Na-K-ATPase, BSC-1, and TSC in CRF rat kidneys. *Am J Physiol*. 1999;277:F257-70.
 80. Preisig PA. Luminal flow rate regulates proximal tubule H-HCO₃ transporters. *Am J Physiol*. 1992;262:F47-54.
 81. Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol*. 2001;171:227-234.

82. Bankir L, Fernandes S, Bardoux P, Bouby N, Bichet DG. Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:1920-1928.
83. Kwon TH, Nielsen J, Moller HB, Fenton RA, Nielsen S, Frokiaer J. Aquaporins in the kidney. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;95-132.
84. Reeves WB and Andreoli TE. Sodium chloride transport in the loop of Henle, distal convoluted tubule, and collecting duct. *The Kidney (3rd ed)* Philadelphia, PA: LWW. 2000;3rd. ed.
85. Howard RL, Summer S, Rossi N, Kim JK, Schrier RW. Short-term hypothyroidism and vasopressin gene expression in the rat. *Am J Kidney Dis.* 1992;19:573-577.
86. Iwasaki Y, Oiso Y, Yamauchi K, et al. Osmoregulation of plasma vasopressin in myxedema. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:534-539.
87. Kim JK, Summer SN, Schrier RW. Cellular action of arginine vasopressin in the isolated renal tubules of hypothyroid rats. *Am J Physiol.* 1987;253:F104-10.
88. Seif SM, Robinson AG, Zenser TV, Davis BB, Huellmantel AB, Haluszczak C. Neurohypophyseal peptides in hypothyroid rats: plasma levels and kidney response. *Metabolism.* 1979;28:137-143.
89. Harkcom TM, Kim JK, Palumbo PJ, Hui YS, Dousa TP. Modulatory effect of thyroid function on enzymes of the vasopressin-sensitive adenosine 3',5'-monophosphate system in renal medulla. *Endocrinology.* 1978;102:1475-1484.
90. Meier CA, Fabbro D, Meyhack I, et al. Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement on the level of protein kinase C and protein kinase A in rat liver. *FEBS Lett.* 1991;282:397-400.
91. Reville P, Stephan F. [Determination of the intrarenal gradient of concentration of urea and sodium in hypothyroid rats and adrenalectomized rats]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1967;161:174-179.
92. Pacha J, Pohlova I, Zemanova Z. Hypothyroidism affects the expression of electrogenic amiloride-sensitive sodium transport in rat colon. *Gastroenterology.* 1996;111:1551-1557.

93. Bradley SE, Bradley GP, Stephan F. Role of structural imbalance in the pathogenesis of renal dysfunction in the hypothyroid rat. *Trans Assoc Am Physicians*. 1972;85:344-352.
94. Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol*. 1995;269:F793-805.
95. Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 1:S37-42.
96. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:310-319.
97. Harris RC, Cheng H, Wang J, Zhang M, McKanna JA. Interactions of the renin-angiotensin system and neuronal nitric oxide synthase in regulation of cyclooxygenase-2 in the macula densa. *Acta Physiol Scand*. 2000;168:47-51.
98. Skott O, Briggs JP. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science*. 1987;237:1618-1620.
99. Stephan F, Metz B, Jahn H, Reville P. [Action of pitressin and oxytocin on the urinary excretion of sodium and potassium in the normal rat and in the hypothyroid rat.]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1959;153:1264-1267.
100. Fregly MJ, Brimhall RL, Galindo OJ. Effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the sodium balance of rats. *Endocrinology*. 1962;71:693-700.
101. Holmes EWJ, DiScala VA. Studies on the exaggerated natriuretic response to a saline infusion in the hypothyroid rat. *J Clin Invest*. 1970;49:1224-1236.

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

März 2003 Posterpräsentation bei dem jährlichen Meeting der Anatomischen Gesellschaft in Dresden. Kahl T; Schmitt R; Bachmann S. Upregulation of juxtaglomerular NOS 1, COX-2 and Renin in hypothyroid rats.

Schmitt, R; Klusmann, E; Kahl, T; Ellison DH; Bachmann, S. Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol.*2003;284:F1097-F1104.

Schmitt, R; Kahl T; Mutig K; Bachmann S. Selectively reduced expression of thick ascending limb Tamm-Horsfall protein in hypothyroid kidneys. *Histochem Cell Biol.*2004;121:319–327.

Mutig K; Paliege A; Kahl T; Jons T; Muller-Esterl W; Bachmann S. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1166-77.

März 2008 Posterpräsentation beim jährlichen Meeting der Anatomischen Gesellschaft in Innsbruck. Kahl T; Mutig K; Böhlick A; Rampoldi L; Kumar S; Bachmann S. Kidney Na,K,2Cl-cotransporter (NKCC2) is regulated by Tamm-Horsfall protein (THP).

Welker P; Böhlick A; Mutig K; Salanova M; Kahl T; Schlüter H; Blottner D; Ponce-Coria J; Gamba G; Bachmann S. Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Sep;295(3):F789-802.

Erklärung

„Ich, Thomas Kahl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Renal Expression von Salztransportern und Aquaporin 2 in hypothyreoten Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

20.10.2009

Unterschrift