

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

DISSERTATION

**Die Regulation von Komponenten des Renin-Angiotensin
Systems und des Wasserkanals Aquaporin 1 im proximalen
Tubulus der Niere**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcus Pohl

aus Schwedt/Oder

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Funktionen der Niere	7
1.2 Funktionen des proximalen Tubulus	7
1.2.1 Transepithelialer Wassertransport durch AQP1	9
1.2.2 Proteinendozytose durch Megalin	10
1.3 Tubuloglomerulärer Feedback	10
1.4 Glomerulotubuläre Balance	11
1.5 Renin-Angiotensin System	12
1.5.1 Angiotensinogen	13
1.5.2 Renin und Prorenin	14
1.5.3 ACE und ACE2	14
1.5.4 Angiotensin II	15
1.6 Das lokale Renin-Angiotensin System im proximalen Tubulus	16
1.6.1 Angiotensinogen	16
1.6.2 Renin	17
1.6.3 ACE und ACE2	17
1.7 Lokales Renin-Angiotensinogen System und die Regulation von Resorptionsvorgängen im proximalen Tubulus	18
2 Zielsetzung der Arbeit.....	20
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen	22
3.2 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung	23
3.2.1 Isolierung und Präparation der Bürstensaummembran-Fraktion	23
3.2.2 Verifizierung der Bürstensaummembran-Präparation	24
3.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung und quantitative RT-PCR	24
3.4 Proteinquantifizierungen	25

3.5 Quantifizierungen von Angiotensinogen und Renin in Urin	25
3.6 SDS-PAGE und Immunblotting	26
3.7 Immunhistochemische Analyse	27
3.8 Elektronenmikroskopie	27
3.9 Herstellung von Fusionsproteinen und Konstrukten der Megalindomänen	28
3.10 <i>Pull down</i> -Assay und Ko-Immunpräzipitation	28
3.11 Zellkultur	29
3.12 Transzytoseexperimente	30
3.13 Parazellulärer Transport	30
3.14 Biotinylierung von Proteinen der Zelloberfläche	31
3.15 Bestimmung der Wassertransportkapazität von AQP1	31
3.16 Messung von intrazellulärem Kalzium	32
3.17 <i>In vitro</i> Mikroperfusion von isolierten proximalen Tubuli	32
3.18 Verwendete Antikörper	33
3.19 Statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Verifizierung der Bürstensaummembran-Präparation	34
4.2 Die Expression von Komponenten des RAS im proximalen Tubulus	34
4.2.1 Die Lokalisation von Angiotensinogen-mRNA und -Protein sowie die Aufnahme von radioaktiv markiertem Angiotensinogen	34
4.2.2 Quantifizierung der Angiotensinogen-mRNA in isolierten Einzelnephronsegmenten	37
4.2.3 Angiotensinogen im Megalin-defizienten proximalen Tubulus	38
4.2.4 Angiotensinogen als spezifischer Ligand von Megalin	40
4.2.5 Intrazelluläre Wege von Angiotensinogen	42
4.2.6 Transzytose von Angiotensinogen und Angiotensin II	44
4.2.7 Lokalisation und Expression von Renin im proximalen Tubulus	47
4.2.8 Lokalisation und Expression von ACE und ACE2 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus	48
4.3 Wassertransport durch AQP1 im proximalen Tubulus	51
4.3.1 Expression von AQP1 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus	51
4.3.2 Lokalisation und Trafficking von AQP1 in Opossum Kidney-Zellen (OKZ)	53
4.3.2.1 Charakterisierung von AQP1-OKZ	53

4.3.2.2 Trafficking von AQP1 in AQP1-OKZ	54
4.3.3 Veränderter Wassertransport in AQP1-OKZ unter Kurzzeitstimulation	56
4.3.4 Kurzzeit-Trafficking von AQP1 im isolierten proximalen Tubulus	56
5 Diskussion.....	58
5.1 Koexpression von Komponenten des RAS im proximalen Tubulus	58
5.1.1 Angiotensinogen im proximalen Tubulus der Niere	58
5.1.2 Lokalisation und Expression von Renin	62
5.1.3 Lokalisation und Expression von ACE und ACE2	63
5.1.4 Intrazelluläre Wege der proximal tubulären RAS-Komponenten	65
5.2 AQP1 im proximalen Tubulus der Niere	66
5.2.1 Lokalisation von AQP1 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus	67
5.2.2 Kurzzeit-Trafficking von AQP1 im isolierten proximalen Tubulus	68
5.2.3 Trafficking von AQP1 und Aktivierung des Wassertransportes in Zellkultur	69
5.2.4 Regulation von AQP1 im Kontext der glomerulotubulären Balance	71
6 Zusammenfassung.....	73
Abstrakt (Deutsch)	73
Abstract (English)	75
7 Literaturverzeichnis.....	77
Erklärung.....	87
Curriculum vitae.....	89
Publikationen.....	91
Danksagung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	lat. <i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ACE	engl. <i>angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACE2	engl. <i>angiotensin converting enzyme 2</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
AQP1	Aquaporin Isoform 1
AT ₁ -Rez.	Angiotensinrezeptor Typ 1
AT ₂ -Rez.	Angiotensinrezeptor Typ 2
BBM	engl. <i>brush border membrane</i> , Bürstensaummembran
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
Caco	Cacodylat-Puffer, Cacodylsäure-Natriumsalz-A. dest.
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure, DNS
EGTA	engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> , Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GST	Glutathion-S-Transferase
Haes	Hydroxyethylstärke
HEK-EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung

JGA	juxtaglomerulärer Apparat
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LBD	Ligandenbindungsdomäne (von Megalin)
LDL	engl. <i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaPi-IIa	Natrium-Phosphat-Kotransporter Isoform 2a
NHE3	Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 3
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter Isoform 2
OKZ	OK-Zellen engl. <i>opossum kidney</i> (Beutelratten Niere) - Zellen
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PCT	engl. <i>proximal convoluted tubule</i> , gewundener proximaler Tubulus
PFA	Paraformaldehyd
PST	engl. <i>proximal straight tubule</i> , gerader proximaler Tubulus
RAP	engl. <i>receptor-associated protein</i> , Rezeptor-assoziiertes Protein
RBP	Retinol bindendes-Protein
RPR	Renin/Prorenin-Rezeptor
RAS	Renin-Angiotensin System
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS-PAGE	SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TER	engl. <i>trans-epithelial resistance</i> , transepithelialer Widerstand
TGF	tubuloglomerulärer Feedback
Tight Junction	engl. Schlussleiste, lat. <i>Zonula occludens</i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Funktionen der Niere

Die Niere nimmt in der Regulation und Modulation der systemischen Elektrolyt-, Volumen- und Proteinhomeostase eine zentrale Rolle ein. Über selektive Transport- und Resorptionsschritte entlang des gesamten Nephrons wird die Aufrechterhaltung eines konstanten physiologischen Blutdrucks sowie der Plasmakonzentrationen der lebenswichtigen Elektrolyte Natrium, Kalium, Phosphat, Kalzium und Chlorid gewährleistet. Gleichzeitig werden harnpflichtige Substanzen, wie z. B. Harnsäure, Harnstoff und Kreatinin, eliminiert. Die Bedeutung der Niere für die Regulation des Hormonhaushaltes spiegelt sich in der Bildung von Erythropoetin, Calcitriol und Renin wider. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts formulierte der Physiologe Ernest H. Starling die Wechselbeziehung zwischen der Kontrolle der Volumen- und Elektrolythomöostase und einer leistungsfähigen kardialen Funktion. Täglich werden in den beiden menschlichen Nieren ca. 180 Liter Primärharn gebildet, dies entspricht einer glomerulären Filtrationsrate von ca. 120 ml pro Minute. Von dieser Flüssigkeitsmenge werden pro Tag jedoch lediglich 2-3 Liter als Urin ausgeschieden. Dies bedeutet, dass entlang des Nephrons ca. 99% der primär filtrierten Flüssigkeit sowie der darin gelösten Stoffe wieder rückresorbiert werden müssen.

1.2 Funktionen des proximalen Tubulus

Vorangegangene Untersuchungen der Nierenphysiologie führten zur Erkenntnis, dass der proximale Tubulus einen wichtigen Anteil an der Regulation sowohl des systemischen extrazellulären Milieus als auch des Renin-Angiotensin Systems (RAS) und des systemischen Blutdrucks hat (13). Der proximale Tubulus gliedert sich anatomisch in einen gewundenen Teil (proximales Konvolut, engl. *proximal convoluted tubule* - PCT bzw. S1 und S2 Segment) und in einen geraden Abschnitt (Pars recta, engl. *proximal straight tubule*, PST bzw. S3 Segment). In den frühen Abschnitten des proximalen Tubulus erfolgen Transportprozesse, die zu einer Verringerung der Protein- und Ionenbeladung des Primäfiltrates führen. Mit Übergang in die mittleren Abschnitte des proximalen Tubulus treten weitere Transportvorgänge, wie die Resorption von Wasser, hinzu (13). Transzelluläre und parazelluläre Transportvorgänge, die die

Diffusion kleiner Moleküle aus dem Primärfiltrat ins Interstitium ermöglichen, laufen parallel ab (89). In den späten Anteilen des proximalen Tubulus stellt die Wasserresorption durch den Wasserkanal Aquaporin Isoform 1 (AQP1) die prädominante Eigenschaft des Epithels dar (30). Insgesamt werden dem Primärfiltrat auf luminaler Seite entlang des proximalen Tubulus ca. 60-80% des initial glomerulär filtrierte Wassers entzogen (30).

Eine weitere wesentliche proximal tubuläre Funktion ist die Endozytose von glomerulär filtrierte Proteinen und Peptiden, deren Molekulargewicht 80 kDa nicht übersteigt, da größere Proteine unter physiologischen Bedingungen nicht unmittelbar frei glomerulär filtrierbar sind (88). Das proximal tubuläre Resorptionsspektrum erstreckt sich quantitativ entsprechend der glomerulären Filtrationseigenschaften auf frei filtrierte Proteine, deren Molekulargewicht kleiner als 15 kDa ist, bis hin zu Albumin, welches mit einem Molekulargewicht von ca. 69 kDa jedoch nur noch eingeschränkt filtrierte wird (72). Die im proximalen Tubulus stattfindende Protein- und Peptidendozytose wird über den Multi-Liganden Rezeptor Megalin und den mit Megalin assoziierte Rezeptor Cubilin gewährleistet (53, 72).

Neben der Proteinendozytose stellt die aktive und passive Resorption von Elektrolyten und gelösten organischen Stoffen eine wesentliche Leistung des proximalen Tubulus dar. In Abhängigkeit von systemischem Blutdruck und extrazellulärem Volumen sowie von der Aktivität des RAS und des sympathischen Nervensystems werden im proximalen Tubulus etwa zwei Drittel des primär filtrierte Natriums aktiv resorbierte (13). Ein arterielle Hypertonus sowie eine extrazelluläre Natrium- und Volumenüberladung führen kurzfristig zur Verminderung der fraktionellen Natriumresorptionsleistung des proximalen Tubulusepithels, wohingegen die Aktivierung des RAS und des sympathischen Nervensystems diese erhöhen können (13, 49). Für die proximal tubuläre Natrium-, Protonen- und Phosphatregulation sind der Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 3 (NHE3, engl. *sodium hydrogen exchanger*) und der Natrium-Phosphat-Kotransporter Isoform 2a (NaPi-IIa) verantwortlich, deren Funktion eng mit der Aktivität des RAS und dem Endozytoseapparat des Epithels bzw. dem hormonellen Einfluss durch das Parathormon verknüpft ist (3, 13, 29, 46, 49). Im Rahmen des Transportes von Natrium, Phosphat und Protonen dringen, im Sinne eines Ladungsausgleiches, auch Anionen wie Chlorid-Ionen und Hydrogencarbonat-Ionen durch passive Transportprozesse in die tubulären Epithelien. Des Weiteren kann dem Primärfiltrat über passive Resorptionsvorgänge Wasser entzogen werden, weil durch

die nach intrazellulär gerichtete Elektrolytresorption ein transzellulärer osmotischer Gradient entsteht (89). Dem passiven Wasserstrom in die Epithelien können auch frei gelöste organische Stoffe, wie z. B. Harnstoff, folgen (89).

Ein zusätzlicher Transportmechanismus des proximalen Tubulus ist die aktive transzelluläre Sekretion, bei der sowohl endogene Stoffe, wie Sulfate und Harnsäure, aber auch Fremdstoffe, wie Arzneimittel (Schleifendiuretika, Penizilline), in das Tubuluslumen sezerniert werden (89). In Ergänzung hierzu bestehen aktive und passive Sekretionsmechanismen für Stoffe, die unmittelbar in den Tubuluszellen gebildet und nach luminal sezerniert werden. Dies gilt z.B. für Ammoniak und intrazellulär entstandene Protonen.

1.2.1 Transepithelialer Wassertransport durch AQP1

Der in der apikalen und basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimierte Wasserkanal AQP1 hat im proximalen Tubulus einen Anteil von ca. 80% an der Wasserresorption des Primärfiltrates (30). Die AQP1-Expressionsrate nimmt vom frühen S1 bis zum späten S3 Segment des proximalen Tubulus stetig zu, setzt sich im dünnen absteigenden Teil der Henle'schen Schleife fort und endet mit dem Übergang im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (50). Analysen eines Tiermodells mit proximal tubulärer Deletion von AQP1 zeigten, dass die Abwesenheit von AQP1 zu einer Reduktion des osmotisch gerichteten, transepithelialen Flüssigkeitstransportes auf bis zu 20% führten (24, 51). Der quantitativ hohe Wassertransport steht demnach in direkter Abhängigkeit zur Expression von AQP1 und nur ca. ein Fünftel der luminalen Flüssigkeit werden parazellulär bzw. über andere Transportprozesse resorbiert (51). Die hohe Wasserpermeabilität von AQP1 steht in funktionellem Zusammenhang mit der Resorption von im Primärfiltrat gelösten Stoffen (30), da die proximal tubulären Resorptionsvorgänge in physiologischer Weise nahezu isoosmolar ablaufen (24). Das Expressionsprofil von AQP1 ist durch Transskriptionsvarianten und Mechanismen der Ubiquitylierung und Degradation charakterisiert (52). Peter Agre, der 2003 für die Charakterisierung der Aquaporine den Nobelpreis für Chemie erhielt, beschrieb AQP1 als einen Kanal, der konstitutiv exprimiert sei (30). Eine mögliche Aktivierung von AQP1 durch Forskolin, welches als Stimulator der Adenylylcyclase die Entstehung des Botenstoffes cAMP aus ATP fördert, wurde diskutiert. Diese These konnte jedoch in voneinander unabhängigen Analysen nicht reproduziert werden (30). Andere Faktoren,

welche die AQP1 Expression regulieren, sind Gegenstand aktueller Studien. Als mögliche Modulatoren der tubulären Wasserresorptionsleistung werden intratubuläre Flussveränderungen (25, 73, 74) und aktivierende parakrine Kalziumsignalwege beschrieben (58).

1.2.2 Proteinendozytose durch Megalin

Megalin, ein in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus stark exprimierter Multi-Liganden Scavenger-Rezeptor, verdankt seinen Namen dem hohen Molekulargewicht von ca. 600 kDa (53). Megalin gehört zur Familie der *Low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren und besteht aus vier extrazellulär ständigen Ligandenbindungsdomänen (LBD) sowie einem intrazellulären C-Terminus. Megalin ist ein Endozytoserezeptor, der die Resorption zahlreicher primär filtrierter Proteine, wie z. B. von Albumin (72) und vom Vitamin-D-Bindungsprotein (53), vermittelt. Eine Expressionsreduktion von Megalin im proximalen Tubulus führt zur Störung des intrazellulären Endozytoseapparates und vermindert die Resorptionsrate von Peptiden und Proteinen drastisch, wodurch deren Exkretion über den Urin ansteigt (3). Ferner wird das intrazelluläre Trafficking von luminal ständigen Transportern, wie NaPi-IIa und NHE3, sowie deren Zurückverlagerung in intrazelluläre Kompartimente durch eine Megalindefizienz beeinflusst (45). Zur Analyse der Megalinfunktion wurde durch Prof. Willnow *et. al* (MDC, Berlin) ein Mausmodell mit einer konditionellen renalen Megalindeletion entwickelt. Die Megalindefizienz tritt bei diesen transgenen Tieren in Form eines Mosaikdefekts der Megalinexpression im proximalen Tubulus der Niere auf (2), wodurch Megalin-positive und Megalin-defiziente Tubuluszellen im Epithelverbund gleichzeitig nebeneinander vorzufinden sind (1, 3). Dieses Modell erlaubt die parallele morphologische Untersuchung des Megalin-abhängigen Traffickings von membranären Transportern bzw. Kanälen sowohl an vollständig intaktem als auch an Megalin-defizientem Epithel.

1.3 Tubuloglomerulärer Feedback

Die Kreislaufregulation wird durch das sympathische Nervensystem, durch systemische Effekte des RAS und durch weitere endokrine Systeme gesteuert. Auf Organebene sind lokale Steuersysteme aktiv. Hier ragt die Niere insofern heraus, als dass regulatorische

Mechanismen einerseits die Organfunktion, andererseits aber auch systemische Funktionen betreffen. So wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) autoregulativ durch den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus (TGF) moduliert, welcher für eine Anpassung der Nierenfunktion an sich verändernde Blutdrücke sorgt und umgekehrt werden systemische Volumenparameter damit beeinflusst (22). Der TGF beschreibt eine Sofortkorrektur der GFR und der tubulären Beladung mit Soluten und Flüssigkeit mittels einer Konstriktion bzw. Dilatation des Vas afferens vom dazugehörenden Glomerulus (31). Ist die GFR kurzfristig zu hoch und wird die tubuläre Resorptionskapazität für Natrium überschritten, wird im distalen Tubulus an der Macula densa über den Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter Isoform 2 (NKCC2) die erhöhte Salzkonzentration detektiert. Über Prostaglandin-abhängige Signalwege erfolgt die selektive Konstriktion des zum betreffenden Glomerulus führenden Vas afferens, woraufhin der renale Blutfluss und die GFR kurzfristig absinken. Die durch den TGF induzierte Autoregulation der GFR resultiert in einer unmittelbaren proximal tubulären Reduktion der Elektrolyt- und Wasserbeladung und macht eine kurzfristige funktionelle Anpassung der Transporter, Rezeptoren und Wasserkanäle im proximalen Tubulus notwendig.

1.4 Glomerulotubuläre Balance

Die Wechselbeziehung zwischen einer variierenden GFR und der daraus resultierenden veränderten Funktion der Salz- und Wasserresorption im proximalen Tubulus der Niere wird als glomerulotubuläre Balance (GTB) bezeichnet (25, 26). Nach dem Modell der GTB kann im proximalen Tubulus die tubuläre Resorptionskapazität kurzfristig erhöht werden, sobald im Rahmen einer gesteigerten GFR das proximal tubuläre Salz- und Wasserangebot spontan erhöht ist (26). Dieses Prinzip beruht auf dem linearen Zusammenhang zwischen GFR und tubulärer Ionenbeladung (26). Für die Aktivierung und Modulation der GTB scheint die Ausprägung der luminalen Auslenkung der epithelialen Mikrovilli in der Bürstensaummembran von Bedeutung zu sein. In früheren Publikationen wurde diesbezüglich postuliert, dass die Mikrovilli als Sensoren agieren, die die luminalen Strömungsveränderungen detektieren und dies an die intrazellulär anknüpfenden Aktinfilamente der Tubuluszelle übermitteln (27). Über sich daran anschließende Aktivierungen von NHE3 sowie der H⁺-ATPase erfolge dann die proportional vermehrte Resorption von Natrium und Hydrogencarbonat im proximalen

Tubulus (27). Die Effekte der GTB sind von denen des TGF jedoch klar zu trennen. Die GTB beschreibt die Modulation der proximal-tubulären Resorptionsleitung im Falle einer gesteigerten GFR und kann z.B. eine Salzüberladung im distalen Tubulus, welche den TGF aktiviert, potenziell nicht verhindern (26, 27). Im Gegensatz zum TGF sind die Kaskaden der GTB, welche variierende Resorptionsraten in Anpassung an die GFR vermitteln, nicht vollständig beschrieben. Die oben genannte Auslenkung der Mikrovilli und die intratubuläre Flussgeschwindigkeit per se werden als derzeit wichtigste Einflussgrößen diskutiert (25, 74).

1.5 Renin-Angiotensin System

Das RAS ist eine wichtige regulatorische Kaskade zur Erhaltung der Homöostase des Extrazellulärvolumens und des systemischen Blutdrucks. Fehlregulationen des RAS sind bei Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung, dem Diabetes mellitus sowie der chronischen Niereninsuffizienz pathogenetisch relevant. Der für den Organismus bedeutendste Effektor des RAS ist das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II).

Am Anfang der Kaskade des Ang II-Syntheseweges steht das Protein Angiotensinogen (83). Angiotensinogen ist das Substrat für die Aspartyl-Protease Renin, welches die 10 N-terminalen Aminosäuren von Angiotensinogen abspaltet, wodurch das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) entsteht (32). Renin wird größtenteils in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGA) der Vasa afferentia der Niere gebildet (82). Von Ang I kann durch das ubiquitär vorkommende *angiotensin converting enzyme* (ACE) ein C-terminales Dipeptid abgespalten werden, wodurch das Oktapeptid Ang II entsteht. Systemische und lokale Effekte von Ang II werden über die Aktivierung der Angiotensinrezeptoren vom Typ 1 (AT₁-R) und Typ 2 (AT₂-R) vermittelt (Abb. 1). Auf lokaler Ebene sind jedoch auch direkte Ang II Wirkungen, unabhängig von den Rezeptoren, beschrieben worden (49, 55).

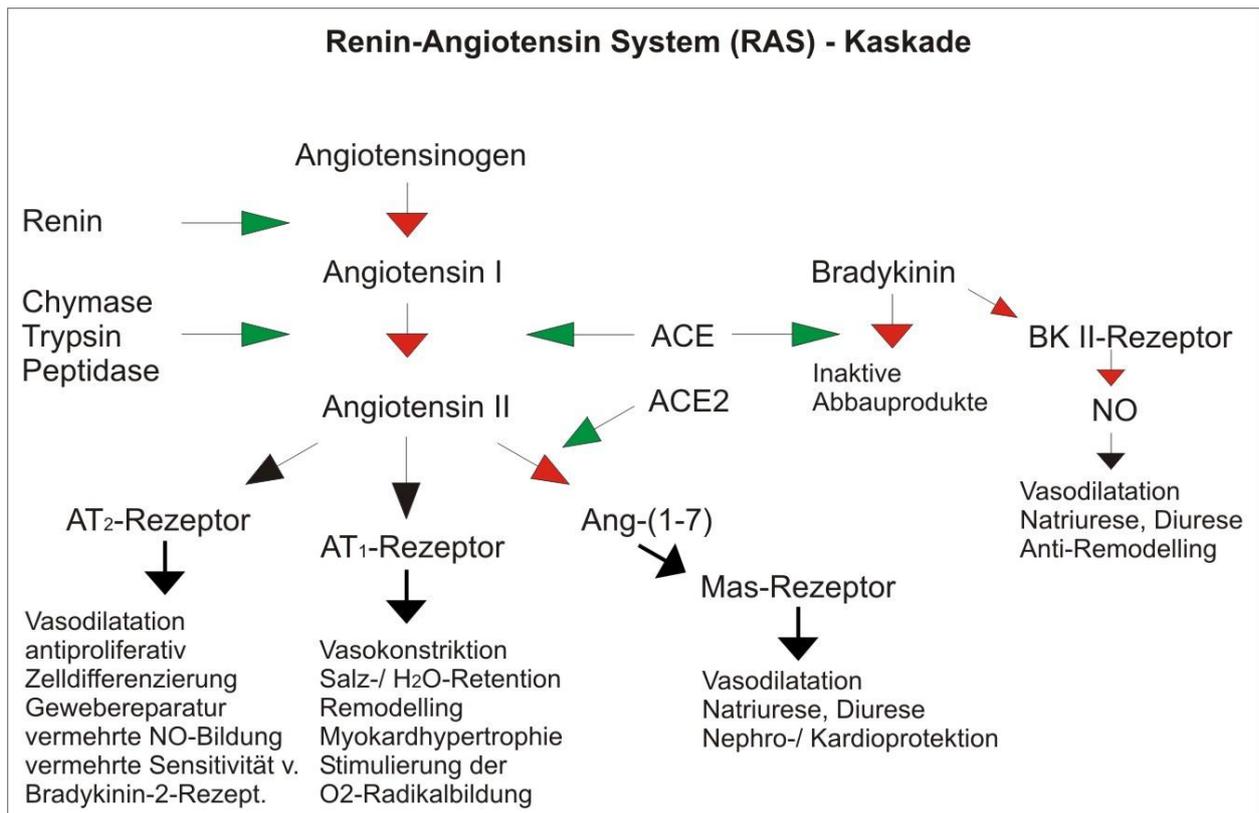


Abb. 1. Übersicht des Renin-Angiotensin Systems. Enzymatische Reaktionen sind durch grüne Pfeile dargestellt. Konversionsstufen von Proteinen, Peptiden und Prozessierungsschritte sind rot markiert. Lokale und systemische Effekte sind mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Abkürzungen: Angiotensinrezeptor-Typ 1 (AT₁-Rezeptor) und -Typ 2 (AT₂-Rezeptor), Angiotensin 1-7 (Ang-[1-7]), ACE (engl. *angiotensin converting enzyme*, Angiotensin-konvertierendes Enzym), ACE2 (engl. *angiotensin converting enzyme 2*, Angiotensin-konvertierendes Enzym 2), Bradykininrezeptor B₂ (BK II-Rezeptor), Stickstoffmonoxid (NO). Quelle: Auer J. Journal für Kardiologie 2007; 14 (1-2): 35-37.

1.5.1 Angiotensinogen

Angiotensinogen, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 49,8 - 66 kDa, wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und durch die Hepatozyten in den Blutkreislauf sezerniert, wo durch Renin die Spaltung des Proteins zu Ang I stattfindet (32). Die Sekretionsmenge von Angiotensinogen durch die Leber ist neben der Plasma-Reninaktivität der wichtigste Faktor in der Limitierung der systemischen Ang II-Synthese (83). Die Menge des in der Leber synthetisierten Angiotensinogens wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben der Steigerung des Plasma-Angiotensinogen Spiegels, der im Sinne eines positiven Feedbacks stimulierend auf die Angiotensinogen Sekretion wirkt, führen vor allem gesteigerte systemische Spiegel von Glukokortikoiden zur vermehrten Angiotensinogen Synthese (83). Die Angiotensinogen Sekretion korreliert dabei eng mit der durch Glukokortikoide beeinflussbaren Angiotensinogen Expression (84), weshalb bei Patienten mit einem Cushing Syndrom

(Hyperkortisolismus) zum Teil deutlich erhöhte Angiotensinogen-Plasmaspiegel nachweisbar sind (85). Umgekehrt führt eine Nebenniereninsuffizienz zur Reduktion der Angiotensinogen Synthese (83).

1.5.2 Renin und Prorenin

Hauptsyntheseort für Renin und dessen Vorläuferprotein Prorenin sind die epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere (22, 39, 82). (Pro-) Renin wird jedoch nicht nur durch die Niere, sondern auch durch andere Organe, wie z.B. die Glandula submandibularis, sezerniert. Das in seinem löslichen Zustand inaktive Prorenin macht ca. 90% des Plasmapreninspiegels aus, nur ca. 10% sind dabei tatsächlich aktives Renin (32). Im Plasma kann Trypsin über eine limitierte Proteolyse Prorenin zu Renin konvertieren (34, 39). Daraus resultierende Steigerungen der Renin-Plasmakonzentration können kurzfristig die plasmatische Ang I- und Ang II-Synthese erhöhen. Im Gegensatz hierzu führen kurzfristige Erhöhungen der Angiotensinogen Synthese in der Leber nicht zu signifikanten kurzfristigen Veränderungen von Ang I- und Ang II-Plasmakonzentrationen (34, 84). Neben seiner direkten enzymatischen Funktion kann (Pro-) Renin an einen eigenen Rezeptor binden, den Renin/Prorenin-Rezeptor (RPR) (21, 23). Bindet das Vorläuferprotein Prorenin an seinen Rezeptor, wird das Prosegment abgespalten und es entsteht Renin. Am RPR kann Renin damit enzymatisch aktiv werden und intrazelluläre Signalkaskaden initiieren, welche z. B. das *transforming growth factor-β* Gen aktivieren, wodurch eine Fibroseentstehung auf Organebene begünstigt wird (21).

1.5.3 ACE und ACE2

ACE ist ein sowohl membrangebundenes als auch im Plasma frei zirkulierendes Enzym mit Dipeptidyl-Carboxypeptidaseaktivität, welches ubiquitär zumeist auf luminaler Seite von Endothelzellen exprimiert wird (39, 83). Die Expression von ACE ist gewebsspezifisch unterschiedlich, hohe Expressionsraten finden sich vor allem in der Lunge (85). ACE enthält katalytische N-terminale und C-terminale Abschnitte. Diese spalten das biologisch inaktive Dekapeptid Ang I zum Oktapeptid Ang II (21, 83). Die im Plasma nachweisbaren Konzentrationen von Ang II reflektieren somit in erster Linie die Leistung der Renin- und ACE-Enzymkaskade (81). In Konkurrenz zur ACE Funktion

existiert mit der Spaltung von Ang I zu Ang II durch die Serinprotease Chymase offenbar ein weiterer Mechanismus der Ang II-Synthese (18, 34). Chymase wird im Serum physiologischerweise unverzüglich durch Serinprotease-Inhibitoren inaktiviert, so dass kein relevanter Einfluss auf die systemische Ang II-Synthese besteht. Da Chymase großteils von aktivierten Mastzellen exprimiert wird, ist deren enzymatische Aktivität jedoch in akut entzündlichem Gewebe von Bedeutung (34).

Das ACE2 gilt als Gegenspieler des ACE (65) und wird wie dieses ebenfalls ubiquitär exprimiert (44). Hohe Expressionsraten finden sich im proximalen Tubulus der Niere sowie im kardialen Gefäßsystem (19, 20). ACE2 kann unter anderem das Oktapeptid Ang II zum Heptapeptid Ang (1-7) konvertieren und somit physiologisch frei verfügbares Ang II eliminieren. Ang (1-7) vermittelt im Gegensatz zu Ang II insbesondere gewebeprotective und vasodilatative Effekte (19, 20). Die von ACE2 erzielten Effekte auf Blutdruck, Gefäßtonus und Zellproliferation stehen größtenteils den Effekten, die durch ACE und Ang II vermittelt werden, entgegen (44, 86). ACE2 ist wie ACE eine Carboxypeptidase, allerdings unterscheiden sich beide Enzyme signifikant in ihrer Struktur und Regulation (21). Aktuell wird ACE2 als möglicher protektiver Modulator der Ang II Effekte auf Organebene angesehen (21, 33, 34).

1.5.4 Angiotensin II

Ang II ist als physiologisch aktive Komponente des RAS bedeutsam in der Regulation des Blutdrucks sowie der systemischen Natrium- und Wasserbilanz. Ang II vermittelt seine Effekte über den AT₁-R und den AT₂-R, die prinzipiell gegensätzliche Funktionen haben. Der AT₁-R ist für vasokonstriktorische und blutdrucksteigernde Prozesse verantwortlich (32). Außerdem sind Auswirkungen seiner Signalgebung auf die Freisetzung von Vasopressin und Aldosteron, auf Gewebsfibrose, Atherosklerose, Natriumretention (43), Insulinresistenz (17) sowie auf zelluläres Wachstum und Zellmigration bekannt (16, 33). Die über den AT₂-R vermittelten Effekte werden als potenziell gewebeprotectiv angesehen. Dazu zählen Funktionen wie die Vasodilatation und die Inhibition von Zellproliferation (39). Entsprechend diesen sehr umfassenden Wirkungen wurde Ang II primär als ein systemisch zirkulierendes und systemisch wirkendes Hormon diskutiert (83, 85). In den letzten Jahren wurde in den meisten Organen, inklusive der Niere, jedoch ebenfalls ein lokales RAS definiert und die Regulation von RAS-Komponenten wurde auf parakriner bzw. lokaler Ebene untersucht

(21, 23, 33, 34). Die Ang II Wirkungen betreffen auf Organebene der Niere, unabhängig von den klassischen systemischen Wirkungen des AT₁-R und AT₂-R, parakrine und intrazelluläre Prozesse. Dazu zählen etwa die Beeinflussung des Shuttlings von Transportern, wie NHE3, oder des Traffickings von Proteinen (49, 55).

1.6 Das lokale Renin-Angiotensin System im proximalen Tubulus

Die Regulation des Blutdrucks sowie der Wasser- und Elektrolythomöostase wird nicht nur als Effekt des systemischen RAS sondern auch als Effekt eines lokalen RAS der Niere (34, 36) anerkannt. Die Frage nach möglichen Ursachen von Endorganschäden - wie etwa der hypertensiven Nephropathie, die auf dem Boden einer arteriellen Hypertension mit konsekutiver glomerulärer Hyperfiltration beruht - führte in den letzten Jahren zur fokussierten Betrachtung des renalen RAS. In der Niere sind alle Komponenten des RAS vorzufinden (23, 34) und Ang II wird über unterschiedliche, voneinander unabhängige Mechanismen lokal gebildet (34). Vor allem der proximale Tubulus ist vor dem Hintergrund, dass dort Angiotensinogen, Renin, ACE sowie Angiotensinrezeptoren nachgewiesen wurden, für die Fragestellung nach einer lokalen, intrarenalen RAS-Regulation besonders interessant (35). Eine unphysiologische Aktivierung von RAS-Komponenten im proximalen Tubulus der Niere wird aktuell als eine der Ursachen für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie sowie der Progression von chronischer Organschädigung diskutiert (34, 36). Die bisher vorliegenden funktionellen Daten belegen vielfach die Relevanz eines lokalen RAS, doch die Diskrepanz zwischen lokaler versus systemischer Biosynthese und endozytischer Aufnahme der verschiedenen RAS-Komponenten sowie deren zelluläre Verarbeitung konnte bisher nicht vollständig geklärt werden (35, 40, 43, 60).

1.6.1 Angiotensinogen

Angiotensinogen ist im proximalen Tubulus auf mRNA-Ebene detektierbar (38) und auch immunreaktives Angiotensinogen-Protein wurde intrazellulär lokalisiert, wenngleich keine klare segmentale Zuordnung von mRNA- und Proteinsynthese gezeigt werden konnte (38, 39). Aufgrund nachweisbar niedriger interstitieller jedoch hoher intraluminaler Angiotensinogen-Proteinspiegel wurde vermutet, dass lokal gebildetes Angiotensinogen nach luminal sezerniert wird (38, 40). Entsprechend wurden

unter Normalbedingungen bereits signifikante Mengen von Angiotensinogen im Urin gefunden (40). Unter Ang II Stimulation zeigte sich eine vierfach gesteigerte Angiotensinogen-Exkretion im Urin (41) und eine salzarme Diät führte ebenso zur vermehrten Angiotensinogen Urinausscheidung bei den Versuchstieren (38). Ob proximal tubulär synthetisiertes Angiotensinogen zu hohen interstitiellen Ang II Spiegeln beiträgt, ist zurzeit jedoch noch nicht geklärt. Luminal nachweisbares Angiotensinogen scheint sich zu einem gewissen Anteil auch über glomeruläre Filtration im proximalen Tubulus anzureichern (71). Im Gegensatz zu Renin (36 bis 40 kDa) und analog zu Albumin ist Angiotensinogen angesichts seiner Molekularmasse von 61 bis 65 kDa jedoch nicht uneingeschränkt frei filtrierbar (38, 71), so dass der Ursprung des Angiotensinogens im Urin nicht genau quantifizierbar ist. In diesem Zusammenhang wurde eine mögliche Anreicherung von glomerulär filtriertem Angiotensinogen im Epithel des proximalen Tubulus durch Endozytose-vermittelte Aufnahme kontrovers diskutiert (32, 34, 38). Im Epithel des distalen Tubulus bzw. im Sammelrohr konnten bisher keine signifikanten Mengen von Angiotensinogen nachgewiesen werden (32, 33).

1.6.2 Renin

Die Hauptquelle des zirkulierenden und des intrarenalen Renins ist der juxtaglomeruläre Apparat (22, 39, 63). Im proximalen Tubulus und im Verbindungstubulus der Niere ist Renin ebenfalls lokalisierbar (38) und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es aus dem Ultrafiltrat endozytiert und proximal tubulär in subapikalen Vesikeln gespeichert werden könnte (39). Die intratubuläre Flüssigkeit enthält dagegen nur sehr geringe Konzentrationen von Renin (38). Der sichere Nachweis von Renin-mRNA war im proximalen Tubulus bisher nur unter Verwendung hochsensitiver PCR-Techniken möglich, so dass dessen intratubuläre *de novo*-Synthese von untergeordneter Rolle scheint (38, 42). Aufgrund des Nachweises von Ang I-Konzentrationen im proximalen Tubulus, die ca. 10-fach gegenüber dem Plasmaspiegel erhöht sind, wird Renin als ein lokales, parakrin und autokrin wirkendes Hormon angesehen (32).

1.6.3 ACE und ACE2

Im proximalen Tubulus wurden intraluminale Ang II-Mengen detektiert, die ca. 100-fach höher als jene im Plasma waren (35). Der intratubuläre hohe Ang II-Gehalt kann jedoch

allein durch glomeruläre Filtration nicht erklärt werden, so dass von einer lokalen Synthese ausgegangen werden muss (43). ACE wird nicht nur in den Endothelzellen der renalen Gefäße, sondern auch in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus stark exprimiert (79). Darüber hinaus findet sich gelöstes ACE auch intraluminal in der proximal tubulären Flüssigkeit (32). Aufgrund der Präsenz aller übrigen RAS-Komponenten ist die lokale Enzym-Substrat-Interaktion zur Entstehung von Ang II aus Ang I (43) gewährleistet. Die lokale Produktion von Ang II im proximalen Tubulus ist demnach eng mit der Expression von ACE verknüpft (34, 35).

ACE2 wird in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus zusammen mit ACE stark kolokalisiert exprimiert und ist in gelöster Form auch intraluminal nachweisbar (20). Die divergierenden Effekte von ACE und ACE2 konzentrieren sich unmittelbar auf das proximale Tubulusepithel (65). Dies ist insofern hervorzuheben, als dass eine Kolokalisation beider Enzyme ausschließlich im Epithel des proximalen Tubulus und nicht in den renalen Gefäßen oder Glomerula nachweisbar ist (20).

1.7 Lokales Renin-Angiotensinogen System und die Regulation von Resorptionsvorgängen im proximalen Tubulus

Die Regulation der Elektrolyt- und Wassertransportprozesse sowie die Steuerung der Endozytose unterliegen im proximalen Tubulus systemischen, hormonellen, strukturellen und parakrinen Einflüssen, wobei die Existenz des lokalen RAS eine gesonderte Rolle spielt.

Die Natriumresorption wird im Wesentlichen durch die Expression von NHE3 und NaPi-IIa in der Bürstensaummembran bestimmt (13). Hierbei wird die luminale Expression von NaPi-IIa primär hormonell über die Parathormon-Wirkung gesteuert (46). Zusätzlich können Einschränkungen der Endozytosekapazität des proximalen Tubulus, wie sie bei Megalindefizienz auftreten, zur verminderten hormonellen Steuerbarkeit von NaPi-IIa führen (45). Systemische Einflussgrößen, wie die Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie eine Verminderung des extrazellulären Volumens, führen zur vermehrten Insertion der Transporter in die Mikrovilli der Bürstensaummembran, wodurch ein anti-natriuretischer Effekt erzielt wird (13). Auf lokaler Ebene ist die Präsenz der Komponenten des RAS für die Elektrolytresorption von Bedeutung: Durch die Akkumulation von Ang II kann die Aktivität von NHE3 und NaPi-IIa drastisch gesteigert werden (43, 49). Im Gegensatz hierzu wurde postuliert, dass erhöhte

tubuläre Flussraten zur lokalen Suppression des RAS führen und die konsekutiv verminderte Ang II-Produktion eine Aktivitätsminderung der Natriumtransporter verursacht (13). Dem lokalen RAS werden somit parakrine Funktionen zugeschrieben (13, 38). Die lokale Expression der Komponenten des RAS scheint dabei eng mit dem Endozytoseapparat des proximalen Tubulusepithels verknüpft zu sein: Ang II wird dort sowohl tubulär sezerniert (35) als auch über Megalin endozytiert (55). Des Weiteren beeinflusst eine gestörte Megalinexpression die Protein- und Elektrolytverarbeitung im proximalen Tubulus (3), somit ist von einer gegenseitigen Wechselbeziehung zwischen RAS und intrazellulärem Endozytoseapparat auszugehen (60). Die durch das lokale RAS regulierte proximal tubuläre Natriumresorption wirkt sich zudem auf die isoosmolar ausgerichtete Wasserresorption aus und findet Ausdruck in der Funktion von AQP1 im Rahmen variabler intratubulärer Flussraten (24, 26).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Expression der Komponenten des Renin-Angiotensin Systems im proximalen Tubulus der Niere ist heterogen und von unterschiedlichen Einflussfaktoren auf deren lokale Synthese, Speicherung und Prozessierung abhängig. Für das Reninsubstrat Angiotensinogen wurde im proximalen Tubulus sowohl sein Transkript als auch das Protein nachgewiesen, so dass sich die Frage stellte, ob intrazellulär und intraluminal nachweisbares Angiotensinogen originär dem tubulären Epithel entstammt oder anteilig über glomeruläre Filtration und tubuläre Resorption in den proximalen Tubulus gelangt. Der proximale Tubulus ist anatomisch in 3 Abschnitte gegliedert und weist in seinen Resorptions- und Endozytoseeigenschaften segmentale Unterschiede auf, die sich in der segmentspezifischen Ionen- und Wasser-Resorptionsfähigkeit widerspiegeln. Mit dieser Kenntnis wurde das Ziel formuliert, die Angiotensinogen Transkript- und Proteinexpression segmentspezifisch zu untersuchen, um den Ursprung des tubulären Angiotensinogengehaltes zu lokalisieren. Mit der Annahme, dass Angiotensinogen im proximalen Tubulus endozytiert würde und mit der Kenntnis, dass die Endozytoseleistung segmental variieren kann, wurde als weitere These formuliert, dass die zelluläre Aufnahme von Angiotensinogen im proximalen Tubulus möglicherweise segmental unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Zur Differenzierung dieser Frage sollte die Endozytose-vermittelte Aufnahme von RAS-Komponenten aus dem Primärfiltrat sowie deren Speicherung und Verarbeitung untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde die Expression und Funktion des Multiliganden-Rezeptors Megalin mit der Fragestellung untersucht, ob Angiotensinogen und Angiotensin II, für welches bereits eine Megalinbindungsstelle identifiziert wurde, glomerulär filtriert und mittels Megalin tubulär endozytiert werden. Die potenziellen Interaktionen wurden an Megalin-defizienten Mausnieren sowie an einer Zelllinie mit proximal tubulären Eigenschaften (Opossum Kidney Zelllinie) untersucht. Mittels Proteinbindungsstudien, Transzytoseversuchen und immunhistochemischer Auswertungen sollte dabei die Frage geklärt werden, ob die Expression von RAS-Komponenten im proximalen Tubulus konstitutiven Charakter trägt oder in Abhängigkeit zur Endozytosefähigkeit des proximal tubulären Epithels steht. Die Rolle von Megalin für die Aufnahme von Liganden aus dem Primärfiltrat sollte dabei im Rahmen von zellexperimentellen sowie immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Auswertungen analysiert werden.

Der Einfluss von Megalin auf die Funktion und Expression der Elektrolyttransporter des proximalen Tubulus und Komponenten des RAS, wie Angiotensin II, ist in Vergangenheit bereits demonstriert worden. Vor diesem Hintergrund sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit untersucht werden, ob die Expression und Funktion des für die proximal tubuläre Wasserresorption hauptsächlich verantwortlichen Wasserkanals Aquaporin Isoform 1 (AQP1) in Abhängigkeit zur Megalin-Expression steht. Außerdem bestand die Fragestellung, ob für AQP1 Aktivierungsmechanismen existieren, die im Rahmen der glomerulotubulären Balance von Bedeutung sind und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass intratubuläre Flussveränderungen AQP1 kurzfristig steuern könnten. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten die Auswirkungen von variablen Flussraten auf die AQP1-Funktion und -Expression sowohl an Opossum Kidney Zellen, für welche zur besseren Darstellung eigens eine endogene Überexpression von AQP1 generiert wurde, als auch an isolierten proximalen Tubuli von Mausnieren analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Versuche wurden an männlichen *Sprague-Dawley* (SD) Ratten, an transgenen Angiotensinogen-überexprimierenden TGR-(hAGT1623)-Ratten (87) und an Mäusen mit Megalin-teildefizienten Nieren [Megalin lox/lox; apoECre (1, 3, 8)], hier benannt Cre(+), und an Kontrollen derselben Züchtung mit renaler Megalin-Wildtyp-Expression (Megalin lox/lox), hier benannt Cre(-), durchgeführt. Das Körpergewicht der Ratten betrug 250 - 300g; die Mäuse wogen 15 bis 25 g und das Alter der Tiere reichte von 10 bis 15 Wochen. Die mosaikförmige Deletion von Megalin im proximalen Tubulus der transgenen Niere ermöglicht die vergleichende Analyse von nebeneinander befindlichen Megalin-positiven und Megalin-defizienten Tubuluszellen (45). Der Umfang der Megalinexpression der Tubuli der Cre(+) Tiere reicht von 10 - 50% (2). Die Ausprägung der Megalinexpression in den Cre(+) Mausnieren wurde anhand der Bestimmung der Menge des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) im Urin getestet, da beide Parameter in ihrer Nachweisbarkeit invers miteinander korrelieren (2). Dafür wurden über Nacht gesammelte Urinproben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western blot Analyse mit anti-DBP Antiserum (Dako, Glostrup, Dänemark) untersucht. Die Intensität des DBP-Signals wurde mit dem Signal eines aufgereinigten DBP-Standards einer zuvor definierten Menge verglichen. Diejenigen Tiere, die ca. 50 µg DBP / ml Urin ausschieden, entsprechend einer 70 - 90%igen Megalin-Gendeletion (2), wurden für die Experimente ausgewählt. Die Tiere (gesamt: n=24) wurden in zwei Gruppen [Knockout = Cre(+) und Kontrollen = Cre(-); je n=12) eingeteilt. Je eine Hälfte der Gruppe diente der Perfusionsfixation und der immunhistochemischen Auswertung, die andere Hälfte wurde für die biochemische Auswertung herangezogen. Die Versorgung der Tiere erfolgte unter den erforderlichen Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter. Sämtliche Tierversuche wurden unter strikter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien der Berliner Senatsverwaltung durchgeführt (Reg G 0178/03).

3.2 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung

Die Versuchstiere wurden mittels einer intraperitonealen Injektion von Natrium-Pentobarbital (0,06 mg/g Körpergewicht) anästhesiert. Für die immunhistochemische Analyse wurden je 6 Mausnierenpaare pro Gruppe perfusionsfixiert. Dafür wurde die Aorta abdominalis distal der Abgänge der Arteriae renales freipräpariert, inzidiert und über einen Polyethylenschlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Die retrograde Perfusionsfixation wurde mit einer Vorspüllösungsinfusion [Caco/Haes (4%)-Puffer (Haes, MgCl₂·6*H₂O), 300 mosmol, pH 7,35] für die Dauer von 15 Sekunden begonnen. Der intravasale Druckausgleich wurde durch eine gleichzeitige Eröffnung der Vena cava inferior gewährleistet. Die anschließende Fixierung des Gewebes erfolgte unter einem Druck von 180 mmHg mit Caco/Haes (4%)-Puffer inklusive 3% Paraformaldehyd (PFA) für 5 Minuten. Die perfusionsfixierten Nieren wurden nach der Entnahme halbiert. Das Gewebe für Gefrierschnitte wurde zum Schutz vor Artefakten über Nacht bei 4°C in Sucrose/Caco-Puffer (800 mosmol, pH 7,4) gelagert, anschließend schockgefroren und bei -80°C konserviert. Das Gewebe für die Paraffineinbettung wurde mit Fixierlösung [Caco/Haes (4%)/ PFA (3%)] bei 4°C über Nacht behandelt und im Institut für Pathologie der Charité eingebettet. Für die Isolierung von Bürstensaummembran-Fractionen (engl. *brush border membrane*, BBM) wurden je sechs Mäuse laparotomiert, die Nieren entnommen, entkapselt, gewogen, halbiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für die Elektronenmikroskopie wurde das Gewebe in LR White (Methacrylat) eingebettet.

3.2.1 Isolierung und Präparation der Bürstensaummembran-Fraktion

Die BBM-Fractionen wurden durch eine zweistufige Magnesium-Präzipitationstechnik gewonnen (56). Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt (Rotor JA-20, Ultrazentrifuge J2-H8, Beckman), die Resuspensionsschritte erfolgten mittels Ultraschall-Homogenisator (Sonicator Bandelin Sonoplus GM 70). Die bei -80°C gelagerten Nieren wurden mittels Skalpell in kortikale und medulläre Anteile separiert. Die kortikalen Anteile wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 15 ml Isolationspuffer [300 mM D-Mannitol, 5 mM EGTA, 16 mM HEPES, 10 mM Tris-Base, pH 7,5; Protease-Inhibitor (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim) 1 Tablette/ 50 ml] homogenisiert (3). Vom kortikalen Homogenat wurde 1 ml für die Quantifizierung des

Gesamtproteingehaltes sowie zur Bestimmung der Aktivitäten der BBM-Markerenzyme Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und alkalische Phosphatase (AP) zurückbehalten. Zum restlichen Ansatz wurden 21 ml einer MgCl₂-Lösung [A. dest. (4°C), MgCl₂·6·H₂O] bis zu einer Konzentration von 12 mmol/l gegeben. Nach 25 Minuten auf Eis wurde der Ansatz bei 3.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und Pellet P1 verworfen. Der Überstand S1 wurde bei 39.000 x g für 45 Minuten zentrifugiert. Das Pellet P2 wurde in einem 12 mM MgCl₂-Resuspensionspuffer (150 mM D-Mannitol, 2,5 mM EGTA, 6 mM Tris-Base, pH 7,5, MgCl₂·6·H₂O) homogenisiert und für 25 Minuten auf Eis bei 4°C gekühlt. Die Resuspension wurde bei 3.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und Pellet P3 verworfen. Der Überstand S3 wurde bei 39.000 x g für 45 Minuten zentrifugiert; Das Pellet P4 wurde für einen weiteren Reinigungsschritt in 30 ml Resuspensionspuffer (300 mM D-Mannitol, 16 mM Hepes, 10 mM Tris-Base, pH 7,5) homogenisiert und erneut bei 39.000 x g für 45 Minuten zentrifugiert. Das Pellet P5, entsprechend einer angereicherten BBM-Fraktion, wurde in 200 µl des zuletzt beschriebenen Resuspensionspuffers aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Verifizierung der Bürstensaummembran-Präparation

Die Qualität der Präparation der BBM-Fractionen zum Zweck der Western blot Analyse proximal tubulärer Proteine wurde vorab kontrolliert. Dazu wurden die BBM-ständigen Markerenzyme AP und GGT mittels eines klinisch-chemischen Analyseautomaten (Modular P, Roche, Hitachi) quantifiziert (14).

3.3 *In situ*-Hybridisierung und quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression von Angiotensinogen wurde mittels einer *In situ*-Hybridisierung unter Nutzung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (Roche Diagnostics, Berlin) sowie mittels [³⁵S]-radioaktiv markierter Angiotensinogen-cRNA untersucht (Protokoll siehe Referenz 60). Die *Sense*-RNA-Proben und *Antisense*-Proben wurden durch die *In vitro*-Transkription von 800 Basenpaaren der cDNA der *coding region* von Angiotensinogen erzeugt. Für die *In situ*-Hybridisierung wurden Paraffinschnitte von 5 µm Dicke, entsprechend einem etablierten Protokoll (4), verwendet. Das Signal wurde mit einem Entwicklungspuffer [Nitroblau-Tetrazoliumsalz und 5-Bromo-4-Chloro-3-

Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrat, sowie Levamisol (Sigma, St. Louis, USA) zur Hemmung endogener Phosphatasen; pH 9,5] entwickelt. Zur Kontrolle wurden die *Sense*-RNA-Proben parallel mit *Antisense*-Proben inkubiert.

Für die segmentspezifische Quantifizierung von Angiotensinogen-mRNA wurden Nieren von SD-Ratten entfernt, die proximalen Tubuli disseziert und geordnet nach S1-, S2- und S3-Segment sortiert (60). Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Tubuli mittels RNeasy-total-RNA-kit (Qiagen) isoliert. 5 µg RNA jeder Präparation wurden zur Synthese von cDNA verwendet (Invitrogen cDNA Synthese Kit). Die Angiotensinogen-Genexpression wurde durch quantitative RT-PCR Technik mittels TaqMan-System analysiert und in Korrelation zur Expression des Referenz-Gens GAPDH gestellt (60). Die RT-PCR für AQP1 wurde ebenfalls mittels TaqMan-System durchgeführt (3).

3.4 Proteinquantifizierungen

Sämtliche Proteinkonzentrationen von Homogenaten der BBM-Fraktionen und von Zelllysaten wurden über einen kolorimetrischen Proteinassay auf Grundlage der Biuret-Reaktion (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) ermittelt. Der für diese Methode spezifische Farbkomplex steigt mit der Konzentration an reagierendem Protein in seiner Farbintensität proportional an. Zur Durchführung der Biuret-Reaktion werden alle Proben bei 65°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch die spektrophotometrische Messung der Extinktion der Proben bei 562 nm wurde mit Hilfe einer Eichkurve die entsprechende Proteinkonzentration errechnet. Die Eichkurve wurde zuvor mittels einer linearen Verdünnungsreihe mit BSA (bovines Serumalbumin) definiert. Zur Verifikation des Proteingehaltes wurden die Proben nach Auftrennung über die SDS-PAGE mit Coomassiereagenz gefärbt und die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe ermittelt.

3.5 Quantifizierungen von Angiotensinogen und Renin in Urin

Die Urine von Cre(+) und Cre(-) Mäusen wurden über 24 Stunden in dafür geeigneten metabolischen Käfigen gesammelt und die Urindaten dann über SDS-PAGE und Western blot Analysen mit den entsprechenden Antikörpern ausgewertet. Die Proteinmengen wurden densitometrisch erfasst und statistisch ausgewertet.

3.6 SDS-PAGE und Immunblotting

Die BBM-Fractionen sowie die Homogenate aus Zelllysaten wurden in Probenpuffer (1% SDS, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 0,5% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris, pH 6,8) aufgenommen und zur Denaturierung für 3 Minuten bei 96°C inkubiert. Die Transportproteine der BBM-Fractionen wurden durch SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und ihre Masse wurde anhand eines SDS-PAGE Markers (Dual Color Precision Marker, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) bestimmt. Die für die SDS-PAGE benötigten Utensilien waren eine Elektrophoresekammer (BioRad-Laboratories), Elektrophorese-Puffer (SDS 0,1%, Glycin 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,3) sowie je nach Molekulargewicht des Zielproteins 6 - 12%ige Acrylamid-Gele. Die Dauer der Probenauftrennung im SDS-PAGE variierte je nach Proteingröße und Gelzusammensetzung zwischen 2 - 5 Stunden, längstens jedoch bis zum Erreichen des untersten Gelabschnittes durch die sogenannte Lauffront. Die Proteinübertragung vom Gel auf Nitrozellulose-Membranen (Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte durch Western blotting in einem *Tank-Sandwich*-System (Bio-Rad) mit Transferpuffer [Tris 25 mM, Glycin 192 mM, Methanol 10% (v/v), ad *A. dest.*]. Zur Kontrolle der Menge des Gesamtproteingehaltes der einzelnen Proben wurden die Membranen für 2 Minuten mit Ponceau-Rot (0,5%) angefärbt und anschließend mit *A. dest.* gewaschen. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden mit 5% Magermilchpulver in PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur, anschließend bei 4°C über Nacht. Dann wurden die Membranen dreimal mit PBS (mit 0,1%-Tween, pH 7,5) sowie mit PBS allein gewaschen und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern (1:3000 in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen für 1 Minute mit Luminol-Reagenz (ECL, Amersham Pharmacia, Freiburg) inkubiert. In einer Dunkelkammer wurden anschließend die Autoradiographiefilme (Hyperfilm ECL) belichtet und entwickelt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch (Software: Bio-Profil Bio-ID image, Vilber Lourmat, Frankreich). Alle Daten wurden auf β -Aktin als standardisiertes Referenzprotein normiert.

3.7 Immunhistochemische Analyse

Gefrierschnitte von 5 µm Dicke wurden auf Chromgelatine (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haën)-beschichtete Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet, 10 Minuten in PBS/ Triton X-100 (0,5%) gelagert, mit Blocking-Reagenz (5 % Milchpulver in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, mit Primärantikörpern beschichtet und 1 bis 2 Stunden auf einem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C belassen. Paraffinschnitte von 5 µm Dicke wurden in einer absteigenden Xylol-Ethanolreihe (Xylol 100% 2 x 10 Minuten, Ethanol 2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 80%, 1 x 70% je 5 Minuten) entparaffinisiert und ebenfalls mit Primärantikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern, welche direkt fluoreszenzmarkiert (Cy-2, Cy-3, Cy-5) oder Teil des Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Systems (anti-Primärantikörperspezies mit HRP-gekoppelt; 1:50 in Blocking-Reagenz für 1 Stunde) waren. Für Letztere folgte nach dem Waschen der Schnitte in PBS die Entwicklung eines enzymatischen Signals mit 0,1% Diaminobenzidin (DAB; Sigma, St. Louis, USA) und 0,02% H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in PBS. Für unterschiedliche Gewebeschnitte, welche mit identischen Primärantikörpern inkubiert wurden, war zur Erhaltung der Vergleichbarkeit die Dauer der Signalentwicklung exakt zeitgleich. Das Abstoppen der Entwicklung erfolgte in PBS. Bei Doppelfärbungstechniken wurden zur Verifizierung der Signale die jeweiligen einzelnen Primär- und Sekundärantikörper auf entsprechenden Folgeschnitten separat kontrolliert. Alle Antikörper wurden generell nacheinander folgend inkubiert, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte qualitativ nach Signalintensität (Durchlichtmikroskop: Leica DMRB mit Epifluoreszenzzusatz, Konfokalmikroskop: Multilaser Confocal Scanning Microscope, TCS SP-2, Leica Microsystems). Die Autoradiographische Darstellung von [¹²⁵I]-markiertem Angiotensinogen erfolgte nach dem Protokoll lt. Ref. 60.

3.8 Elektronenmikroskopie

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden Ultradünnschnitte von in LR White-Harz-eingebettetem Gewebe mit 5% Milchpulver in PBS geblockt, mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert und dann geeignete 5 nm- und 12 nm-Gold-gekoppelte

Sekundärantikörper appliziert. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 906) ausgewertet.

3.9 Herstellung von Fusionsproteinen und Konstrukten der Megalindomänen

Das *Receptor-associated protein* (RAP) und Angiotensinogen (AGT) wurden als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteine hergestellt. Das RAP-GST-Konstrukt wurde freundlicherweise von T. Willnow (MDC, Berlin) überlassen. Für die Herstellung des Expressionskonstruktes von AGT wurde die Nukleotidsequenz von AGT entsprechend den Aminosäuren 25-477 in den Vektor pGEX-4T-1 gekloniert. Die Produktion von GST, RAP-GST und AGT-GST wurde nach Herstellerprotokoll vorgenommen (Amersham Bioscience, Freiburg). Die Sequenzen der Ligandenbindungsdomänen (LBD) 1 bis 4 sowie des c-Terminus inklusive der transmembranären Domäne von Megalin wurden in den pCEP-Pu-Vektor kloniert, welcher n-terminal 6 His- und myc-tags enthält (Originalklone von T. Willnow, MDC, Berlin).

3.10 Pull down-Assay und Ko-Immünpräzipitation

Die Fusionsproteine GST, RAP-GST und AGT-GST wurden an *Glutathion-Sepharose Beads* immobilisiert und mit BBM-Fractionen aus Mausnierenrinde, gelöst in RIPA-Puffer (Tris HCl 50 mM, Igepal 1%, Natrium-deoxycholat 0,25%, NaCl 150 mM, SDS 0,05%, CaCl₂ 1,5 mM), für 5 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Silberfärbungen (nach Herstellerprotokoll) bzw. Western blots ausgewertet. Für die Herstellung der Silberfärbung wurde dreimal nacheinander eine Ethanol-Essigsäurelösung (10% Ethanol; 0,5% Eisessig) auf das Acrylamid-Gel gegeben und jeweils für drei Minuten inkubiert. Der zweite Schritt bestand aus der Sensitivierung [0,1 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (Merck) in 500 ml A. dest.] und der Inkubation des Gels in einer Silbernitratlösung (0,1% AgNO₃) für 10 Minuten. Durch Zugabe einer Entwicklerlösung [15 g Na₂CO₃ (Merck), 1mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (Merck) in 250ml A. dest., 125 µl Formaldehyd 37% (Roth)] wurde das an die Proteine gebundene Silbersalz sichtbar gemacht. Zum Abstoppen der Färbereaktion kam eine Stopplösung (60 ml Essigsäure, 220 ml Ethanol, 220 ml A. dest.) zur Anwendung. Zwischen den einzelnen Schritten

folgten ausgiebige Spülungen mit *A. dest.* Danach wurde das Gel zur nachfolgenden densitometrischen Auswertung entweder getrocknet oder feucht in Folie geschweißt. Für die Ko-Immunpräzipitation wurden die Konstrukte der Megalin-LBDs 1 - 4 sowie des c-Terminus in humane embryonale Nierenzellen (HEK-EBNA - Zelllinie) transfiziert. Anschließend wurden die jeweiligen translatierten Proteine isoliert und durch Protein G *Sepharose-Beads* unter Nutzung eines anti-c-myc Antikörpers immobilisiert. Nach der Inkubation der *Beads* mit RAP-GST und AGT-GST und mehrmaligen Waschschritten wurden die Eluate mittels SDS-PAGE und Western blot analysiert und mit einem Kaninchen-anti-c-myc Antikörper dargestellt. GST diente als Negativkontrolle.

3.11 Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente wurden *Opossum kidney* - Zellen (OKZ) verwendet (freundlichsten überlassen von H. Murer, Zürich). Diese besitzen die grundsätzlichen Eigenschaften proximal tubulären Epithels (57). Zudem wurde eine OK-Zelllinie mit einem AQP1 Konstrukt (AQP1-OKZ) stabil transfiziert. Dazu wurde die vollständige Sequenz von Ratten-AQP1-cDNA (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) in passende *BamHI*- und *HindIII*-Restriktionsschnittstellen des eukaryotischen Vectors pCDNA 3.1 (Invitrogen) kloniert. Die stabile Transfektion der OKZ mit dem Konstrukt AQP1-pcDNA 3.1 wurde durch eine über Geneticin vermittelte Wachstumsselektion [0,4 bis 2 mg/ml Geneticin (G418, Sigma-Aldrich)] bewerkstelligt. Beide Zelllinien wurden bei 37°C und 95% Sauerstoff / 5% CO₂ in *high-glucose* (450 mg/dl) DMEM-Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penizillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert; die AQP1-OKZ erhielten zusätzlich 0,4mg/ml Geneticin. Für Polaritäts- und Transportstudien wurden die AQP1-OKZ auf PET Zellkultur-Filtern (0,4 µm Porengröße, Falcon) kultiviert. Vor dem Aussäen der Zellen wurde jeder Filter mit Matrigel (BD Biosciences) beschichtet. Die Ausrichtung der polarisierten Zellschichten sowie die Integrität der interzellulären Kontakte wurden mit Hilfe der Bestimmung des transepithelialen Widerstandes (TER) ermittelt. Ein TER größer als 160 Ohm/cm² wurde dabei als optimal für die folgenden Experimente etabliert (10), Voraussetzung hierfür war die vollständige Konfluenz der Zellen.

3.12 Transzytoseexperimente

Die OKZ wurden auf PET Zellkultur-Filtern (0,4 µm Porengröße, Falcon) in 6-Well Kammern kultiviert. Diese Filter erlauben ein polarisiertes Wachstum der Zellen, die Ausbildung von *tight junctions* und die Möglichkeit, die Passage von Substanzen entlang der Zellschichten zu verfolgen. Es befindet sich durch diese Art der Zellkultivierung jeweils eine flüssigkeitsgefüllte Kammer (entsprechend 1 ml) über und eine flüssigkeitsgefüllte Kammer unter der polarisierten Zellschicht. Sämtliche Experimente wurden an vollständig konfluenten Zellen vorgenommen und die Dichtigkeit des Zellverbundes wurde mit der Messung des TER und des parazellulären Transports sichergestellt. Angiotensinogen und Ang II wurden kommerziell erworben (Sigma-Aldrich, München). 24 Stunden vor jedem Experiment wurden die OKZ mit FCS-freiem Medium inkubiert. Um die Transzytose von Komponenten des RAS zu untersuchen, wurden die OKZ entweder mit Ang II oder Angiotensinogen (Konzentration je 10 µg/ml), bzw. zusammen mit 200 µg/ml RAP-GST und 10 µM Colchizin, das irreversibel die Mikrotubuli hemmt, inkubiert. In Kombination mit Ang II wurden die Zellen zusätzlich mit 10 µM Valsartan (Diovan[®], Novartis) inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Flüssigkeiten aus den unteren Kammern entnommen und untersucht. Der Gehalt von Ang II wurde mit einem Enzymimmunoassay (EIA, Phoenix Pharmaceuticals Inc., ohne Kreuzreaktion mit Ang 1-7) bestimmt. Die Konzentrationen von Angiotensinogen wurden, nachdem die Proteine über Nacht bei 4°C mit 100% saturierter Ammonium-sulfatlösung präzipitierten, mittels SDS/PAGE und Western blot analysiert. Die Bestimmung der Konzentrationen von Angiotensinogen erfolgte anhand einer densitometrischen Signal-Auswertung mit Hilfe von Proteinstandards, die in allen Western blot-Analysen stets mit angelegt wurden [10 µg/ml (entsprechend 100%) bis 0,1 µg/ml; in absteigender Reihenfolge].

3.13 Parazellulärer Transport

Die Transzytoseexperimente bedingen eine zu 100% konfluente und integre Zellschicht, so dass mit Hilfe der Messung des parazellulären Transports eines Makromoleküls die Unversehrtheit der Zellschicht getestet werden musste. Dafür wurde 10 µg/ml Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Dextran (Molekulargewicht 5 kDa) in FCS-freiem Zellkulturmedium gelöst und auf die obere Kammer eines Transwell-Filters gegeben.

Nach einer Stunde wurden von der oberen und der unteren Kammer Proben entnommen und die jeweiligen FITC-Dextran-Konzentrationen mittels Photo-Fluorometrie (Exzitation 492 nm; Emission 520 nm; Shimadzu RF5000) gemessen.

3.14 Biotinylierung von Proteinen der Zelloberfläche

Die AQP1-OKZ wurden auf 6 cm großen Petrischalen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Ab 12 Stunden vor den Experimenten wurden die Zellen FCS-frei inkubiert. Dann folgte eine Inkubation über 60 Minuten mit 100 µmol 8-bromo-cAMP, 100 µmol 8-bromo-cGMP bzw. für die Simulation von Scherstress (engl. *fluid-shear stress*, FSS) erfolgte das Schütteln der Petrischalen im Inkubator auf einem Orbital-Schüttler bei einer Frequenz von 1 Hz. Die Zellen wurden anschließend mit PBS (4°C) gewaschen und deren Oberflächenproteine unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Pierce) nach Herstellerprotokoll biotinyliert. Die Zellen wurden dann entsprechend den Hersteller-Hinweisen weiterbehandelt. Nach der Auflösung der Zellen wurden die biotinylierten Zelloberflächen-Proteine zur Präzipitation mit Streptavidin-Agarose Beads inkubiert. Nach Entfernung der ungebundenen Proteine wurden die gebundenen Proteine von den Beads eluiert und über Western blot Analysen ausgewertet. Das biotinylierte AQP1 der Zelloberfläche wurde unter Nutzung des spezifischen Kaninchen anti-AQP1 Antikörpers quantifiziert und im Vergleich zur zellulären Gesamtexpression von AQP1 ausgewertet, welche über die Western blot-Auswertung des Gesamt-Zelllysates bestimmt wurde.

3.15 Bestimmung der Wassertransportkapazität von AQP1

Die Transportkapazität von AQP1 wurde über die Messung der [³H]-H₂O Aufnahme über die apikale Membran der AQP1-OKZ gemessen. Dafür wurden die AQP1-OKZ einschichtig auf Transwellfiltern kultiviert und analog den Bedingungen der Oberflächen-Biotinylierungs-Experimente behandelt. Die Behandlung wurde durch schnelle Waschschriffe mit PBS (4°C) unterbrochen und 2 µCi/ml [³H]-H₂O für 30 Sekunden auf die apikale Seite der Zellen gegeben. Zum Abstoppen wurden die Filter dreimal kurz mit Ethanol (96% v/v) gewaschen. Die intrazelluläre Radioaktivität, welche als Maß der [³H]-H₂O Aufnahme in AQP1-OKZ diente, wurde anschließend mit einem Beckman Szintillations-Messgerät bestimmt.

3.16 Messung von intrazellulärem Kalzium

Um die Veränderung intrazellulärer Kalziumspiegel der AQP1-OKZ unter dem Einfluss von Scherstress auf die Zelloberflächen zu messen, wurden die AQP1-OKZ transient mit einem Vektor transfiziert, der für ein fluoreszierendes Kalzium-sensitives Protein kodiert (CASE 12, BioCat). Ein relativer Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels der AQP1-OKZ resultierte in einer vermehrten Signalintensität der Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von 491 nm bis 516 nm. Die Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen ($n > 100$) wurde mittels Durchlichtmikroskopie (Leica DMRB mit Epifluoreszenzzusatz) vor und 1 Minute nach Anwendung von Scherstress erfasst und für jede untersuchte Zelle statistisch ausgewertet.

3.17 *In vitro* Mikroperfusion von isolierten proximalen Tubuli

Zur Untersuchung der Bedeutung von intratubulären Flussveränderungen auf die AQP1-Expression wurden proximale Tubuli (S2-Segmente) aus C57-BL/6 Mäusen isoliert (Protokoll siehe Ref. 90) und *in vitro* über eine einlumige Glaspipette druckkontrolliert perfundiert. Die isolierten Tubuli wurden zunächst auf einem temperierten Objektisch eines Auflichtmikroskopes (Axiovert 10, Zeiss) positioniert und deren Morphologie mittels Videoanalyse (Visitron Systems) dokumentiert. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich morphologisch intakte Tubuli verwendet. Der jeweils applizierte intratubuläre Perfusionsdruck wurde über ein automatisiertes Kontrollsystem, welches mit der Perfusionspipette verbunden war, überwacht (sämtliche technische Durchführungen der Mikroperfusion erfolgten durch die AG M. Bleich, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Kiel). Eine niedrige Flussrate (niedriger Perfusionsdruck) wurde als diejenige definiert, welche zur konstanten Öffnung der Tubulusdurchmessers auf 10 μm führte. Eine hohe Flussrate (hoher Perfusionsdruck) wurde als solche definiert, welche den Tubulusdurchmesser auf 20 μm verdoppelte. Nach jeweils 15-minütiger Perfusion wurden die isolierten Tubuli fixiert (5 Minuten in 3% PFA / 0,05% Glutaraldehyd in PBS), in PBS gewaschen, in 1%igem Agar eingebettet und in Natriumazid (0,1% NaN_3 / PBS) konserviert.

3.18 Verwendete Antikörper

Sämtliche (nicht-) kommerzielle Primärantikörper wurden in der AG S. Bachmann, Institut für Anatomie, Charité Berlin, mittels Immunhistochemie bzw. SDS-PAGE und Western blot Analyse mit Referenzproteinen verifiziert. Verwendet wurden:

- anti-ACE (polyklonal, Ziege-anti-Maus, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- anti-ACE 2 (polyklonal, Ziege-anti-Maus, R & D Systems Inc., USA)
- anti- β -Aktin (monoklonal, Maus-anti-Ratte Sigma, Missouri, USA)
- anti-Angiotensinogen (polyklonal, Kaninchen-anti-Maus, frdl. überl. von E. Hackenthal, Heidelberg)
- anti-AQP1 (polyklonal, Kaninchen-anti-Ratte IgG, BD Biosciences)
- anti-clathrin (Sigma, Missouri, USA)
- anti-EEA1 (Sigma, Missouri, USA)
- anti-LAMP-2 (Sigma, Missouri, USA)
- anti-Megalyn (Meerschwein, anti-C-terminales-Peptid, AG S. Bachmann)
- anti-Phalloidin (monoklonal, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- anti-c-myc (Dianova, Hamburg)
- anti-rab11 (Sigma, Missouri, USA)
- anti-Renin (Huhn-anti-Renin, frdl. überl. von A. Kurtz, Regensburg)
- anti-Renin (polyklonal, Ziege-anti-Maus, R & D Systems Inc., USA)
- anti-Tubulin (Sigma, Missouri, USA)
- anti-ZO-1 (Sigma, Missouri, USA).

Die Sekundärantikörper wurden kommerziell erworben bei Dianova, Hamburg (fluoreszenzmarkiert: Cy-2, Cy-3, Cy-5) sowie bei Dako, Glostrup, Dänemark (HRP-konjugiert: Schwein-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG, Huhn-anti-Meerschweinchen IgG)

3.19 Statistische Auswertung

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

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung der Bürstensaummembran-Präparation

Die Isolierung sowie Anreicherung von BBM-Fraktionen wurde über eine zweistufige Magnesium-Präzipitationstechnik und Differentialzentrifugation (56) durchgeführt. Die Effizienz dieser Methode bedurfte zur Sicherstellung einer validen Aussagekraft der Folgeexperimente zuvor einer qualitativen Überprüfung. Die Quantifizierung typischer BBM-ständiger Markerenzyme, wie der alkalischen Phosphatase sowie der Gamma-Glutamyl-Transferase, diente dabei als Qualitätskontrolle der Präparationstechnik (14). Für beide Markerenzyme wurden in den isolierten BBM-Fraktionen signifikante Aktivitätszunahmen im Vergleich zu den Fraktionen des intrazellulären Homogenates gefunden (Tab.1), dies entspricht einer regelhaften BBM-Anreicherung und die Präparationstechnik konnte folglich verifiziert werden (15).

Tab. 1. Aktivität der BBM-Markerenzyme Alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) in isolierter BBM-Fraktion vs. intrazellulärem Homogenat [MW \pm SD, n = 6 pro Gruppe, $p < 0,01$ (#)].

	BBM-Fraktion	Intrazelluläres Homogenat	Expressionsfaktor
AP (U/l)	171,65 \pm 21,36 #	37,42 \pm 16,95	4,59 #
GGT (U/l)	1589,11 \pm 326,78 #	249,50 \pm 44,72	6,37 #

4.2 Die Expression von Komponenten des RAS im proximalen Tubulus

4.2.1 Die Lokalisation von Angiotensinogen-mRNA und -Protein sowie die Aufnahme von radioaktiv markiertem Angiotensinogen

Zur Differenzierung der Lokalisation von Angiotensinogen im Epithel des proximalen Tubulus wurde sowohl die Expression des Proteins als auch der mRNA untersucht. Die *In situ*-Hybridisierung von Nieren männlicher *Sprague-Dawley* (SD) - Ratten erbrachte unter Verwendung von [³⁵S]-radioaktiv markierter Angiotensinogen-cRNA den Nachweis eines proximal tubulären Signals des Angiotensinogen-Transkripts, welches sich auf den geraden Teil des proximalen Tubulus (PST; S2 und S3 Segmente, Abb. 1A) beschränkte. Im sich davor befindlichen gewundenen Teil des proximalen Tubulus

(PCT, S1) konnte hingegen kein Angiotensinogen-Transkript lokalisiert werden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde eine nicht-radioaktive *In situ*-Hybridisierung an transgenen TGR-(hAGT1623)-Ratten durchgeführt, welche das vollständige humane Angiotensinogen-Gen (87) tragen. In diesem Tiermodell führt die Überexpression des humanen Angiotensinogens zu zehnfach erhöhten Serum-Angiotensinogen-Konzentrationen im Vergleich zu endogenen Angiotensinogen-Konzentrationen von Kontrolltieren (87). Das überexprimierte humane Angiotensinogen ist bei den Nagetieren allerdings physiologisch irrelevant, da es durch endogenes Ratten-Renin nicht gespalten und folglich kein Ang II generiert werden kann.

In den Nieren von TGR-(hAGT1623)-Ratten war die Angiotensinogen-mRNA mit Restriktion auf die S2- und S3- Segmente nachweisbar, der PCT bzw. das S1-Segment zeigte jedoch kein Angiotensinogen-mRNA Signal (Abb. 1B). Im Gegensatz dazu war das Angiotensinogen-Protein in subapikalen Kompartimenten des PCT bzw. des S1-Segmentes stark exprimiert (Abb. 1C), die nachfolgenden S2- und S3-Segmente wiesen hingegen ein deutlich vermindertes Protein-Signal auf. In den Kontrolltieren ohne Angiotensinogen-Überexpression präsentierte sich das endogene, renale Angiotensinogen-Protein Expressionsmuster in ähnlicher Form: Die Nachweisbarkeit von Angiotensinogen erstreckte sich überwiegend vom Beginn des proximal gewundenen Teils an bis hin zum Übergang in die späteren S2-Segmente (Abb. 1D). Die segmental differierende Verteilung von Angiotensinogen-mRNA und -Proteinexpression war selektiv an einen speziellen Abschnitt des proximalen Tubulus gebunden. Die Angiotensinogen-Protein Expression im S1-Segment war, bei fehlendem Angiotensinogen-Transkript, nicht aus einer lokalen Synthese resultierend. Im Gegensatz dazu war die Angiotensinogen Biosynthese im S2- und S3-Segment nicht mit der Speicherung von Angiotensinogen-Protein verbunden. Dieser Befund in den Epithelien der S2- und S3-Segmente entsprach weitestgehend der physiologischen Funktion von Angiotensinogen-produzierenden hepatischen Parenchymzellen, welche das Angiotensinogen-Protein im Anschluss an die Synthese unmittelbar sezernieren (84). Um zu prüfen, ob proximal tubuläres Angiotensinogen-Protein einer Endozytose-vermittelten Aufnahme in die Epithelien entstammen könnte, wurde den Versuchstieren [¹²⁵I]-markiertes Angiotensinogen intravenös gespritzt. In der autoradiographischen Auswertung der Nieren, die 20 bis 60 Minuten nach der Injektion perfusionsfixiert wurden, zeigte sich im S1-Segment ein signifikantes Signal für [¹²⁵I]-markiertes Angiotensinogen-Protein. In den S2- und S3-Segmenten hingegen war kein Protein-

Signal zu detektieren (Abb. 1E). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die selektive Angiotensinogen-Protein Expression in den Epithelien des S1-Segmentes aus einer Endozytose-abhängigen Aufnahme des Proteins aus dem Primärfiltrat resultieren könnte.

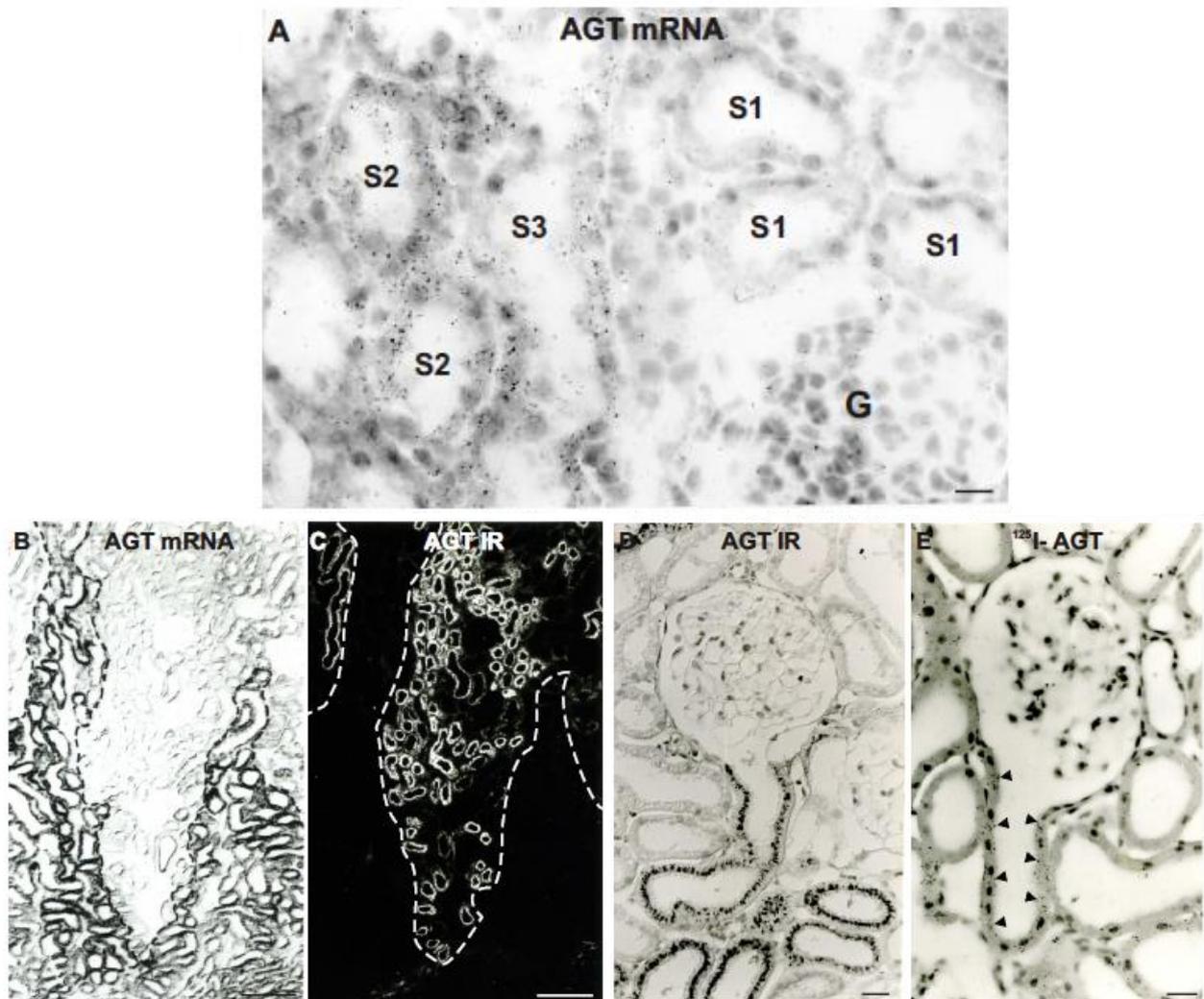


Abb. 1: Die renale Angiotensinogen (AGT) mRNA- und die Protein-Expression in *Sprague-Dawley* (SD)-Ratten (Kontrolltiere) und AGT-transgenen Ratten. A, AGT-Transkript in S2- und S3-Segmenten von SD-Ratten mit [³⁵S]-radioaktiv markierter *In situ*-Hybridisierung; die S1-Segmente und Glomeruli (G) zeigen nur Hintergrundsignal. B und C, Doppelmarkierung für AGT-Transkript (nicht-radioaktive *In situ*-Hybridisierung; B) und AGT-Protein Immunreaktivität (IR; Fluoreszenz-Immunhistochemie; C) in AGT-transgenen Ratten, welche eine Expressionsdivergenz zwischen Transkript und Protein zeigt. Die gestrichelte Linie markiert den Übergang zwischen dem Mark (Signal bei B) und dem Kortex (Signal bei C). D, HRP-Färbung von AGT-Protein in einer SD-Rattenniere; AGT findet sich mit Übergang des Harnpols in das S1-Segment im subapikalen Kompartiment. E, [¹²⁵I]-markiertes AGT kann bereits am Anfang des proximalen Tubulus detektiert werden; das Signal ist mit Pfeilköpfen markiert. Die Signalverteilung ist in D und E gleichartig. Skala in A, D und E = 20 µm; Skala in B und C = 100 µm.

4.2.2 Quantifizierung der Angiotensinogen-mRNA in Einzelnephronsegmenten

Um in Ergänzung zur *In situ*-Hybridisierung die Angiotensinogen-mRNA in den verschiedenen Segmenten des proximalen Tubulus zu quantifizieren, wurden aus 8 verschiedenen SD-Rattennieren die einzelnen Segmente des proximalen Tubulus nach vorheriger enzymatischer Verdauung separat isoliert und analysiert (lt. Protokoll siehe Ref. 60). Dazu wurde jeweils die Menge der Angiotensinogen-mRNA des betreffenden Segmentes in prozentualer Relation zur jeweiligen GAPDH-Expression gesetzt. GAPDH diente dabei als intrazelluläres Standardprotein, da es als wichtiges Enzym der Glykolyse in den meisten Zellen annähernd unabhängig von externen Faktoren exprimiert wird. In der quantitativen Auswertung zeigte sich, dass in den S1-Segmenten eine nur sehr geringe Angiotensinogen-mRNA Expression zu finden ist ($0,02 \pm 0,003\%$). Verglichen mit dem S1-Segment war die Angiotensinogen-mRNA Expression im S1/S2 Segment ebenfalls sehr niedrig ($0,64 \pm 0,361\%$, nicht signifikant). Im Gegensatz dazu war im S3-Segment eine signifikant große Menge an Angiotensinogen-mRNA nachweisbar ($22,77 \pm 2,478\%$; $p < 0,001$; Abb. 2).

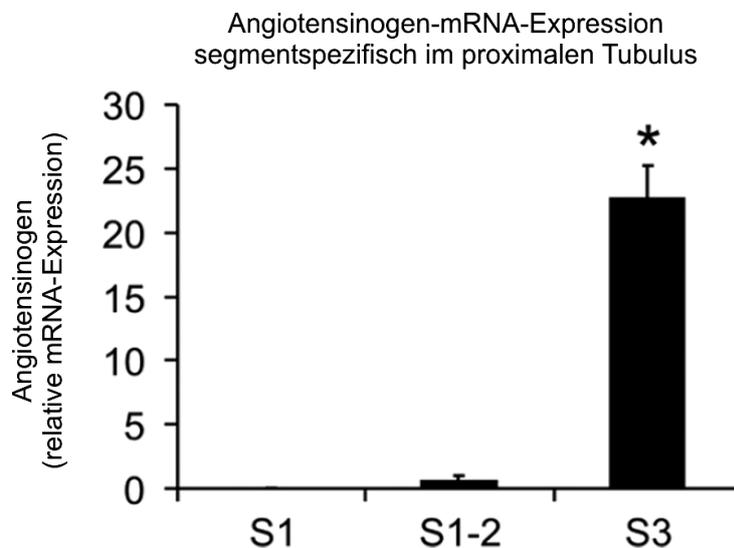


Abb. 2: Angiotensinogen (AGT) mRNA-Expression. Quantitative RT-PCR Analyse der AGT-mRNA von Einzelnephron Präparationen männlicher *Sprague-Dawley* Ratten. Für die S1-S3 Segmente des proximalen Tubulus sind die Expressionsraten der AGT-mRNA im prozentualen Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression dargestellt. $n = 8$, * $p < 0,05$.

4.2.3 Angiotensinogen im Megalin-defizienten proximalen Tubulus

Entsprechend der vorangegangenen Befunde konzentriert sich die Expression von Angiotensinogen im proximalen Tubulus überwiegend auf den PCT bzw. das S1-Segment, beginnend mit dem Harnpol und endend am Übergang zur Pars recta. Die Ausprägung der intrazellulären Angiotensinogenexpression im PCT scheint dabei im Zusammenhang mit einer Endozytose-vermittelten Aufnahme von luminaler Seite zu stehen. Aufgrund der charakteristischen Rolle von Megalin bei Endozytoseprozessen im proximalen Tubulus (53) ist ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von Angiotensinogen und Megalin zu vermuten. Für die Frage, ob die proximal tubuläre Angiotensinogenexpression die Koexpression von Megalin bedingt, wurde das Tiermodell der transgenen Megalin-defizienten Maus [Cre(+)] untersucht, welche einen Mosaikdefekt der Megalinexpression im proximalen Tubulus aufweist. Die Auswertung der Western blots von BBM-Fractionen der Nieren von Kontroll- [Cre(-)] und transgenen [Cre(+)] - Tieren ist in Abb. 3 abgebildet. Hierbei sollte zunächst die Ausprägung der tubulären Megalinexpression in den Megalin-transgenen Tieren dargestellt werden. In der Auswertung zeigte sich eine signifikante Reduktion der Megalinexpression in den BBM-Fractionen der Megalin-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ($-69,5 \pm 7,5\%$; $p < 0,01$).

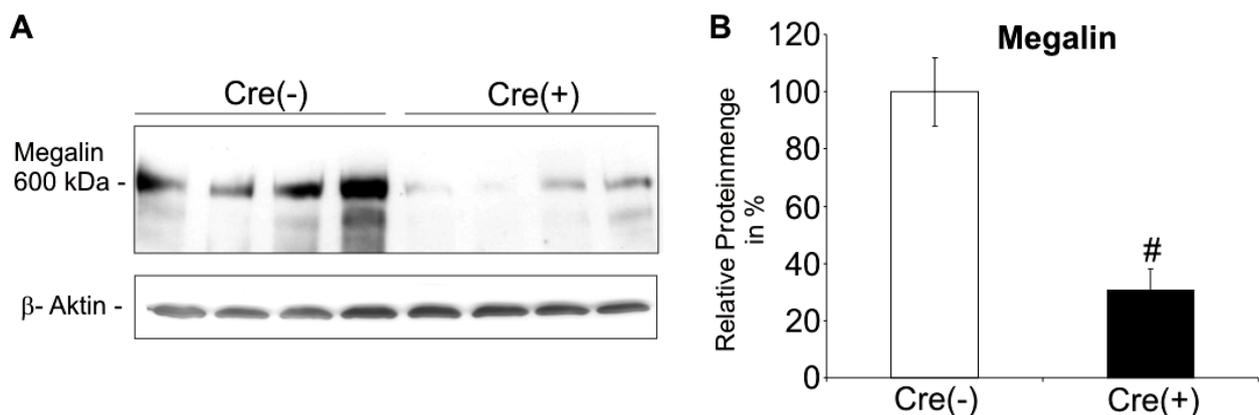


Abb. 3: Verifizierung der reduzierten Megalinexpression in der BBM von Megalin-transgenen Mäusen. (A) Western blot Analyse von Megalin und β -Aktin in Nieren von Cre(-) und Cre(+) Tieren. (B) Die Auswertung der Megalin-Expression zeigt eine signifikante (69,5%ige) Reduktion in den transgenen Cre(+) Tieren im Vergleich zu den Kontrollen, Cre(-). Werte als Mittelwerte \pm SD; n = 4. # $p < 0,01$.

Die immunhistochemische Auswertung von Kryoschnitten des Megalin-defizienten Nierengewebes zeigte, dass immunreaktives Angiotensinogen in den Cre(+) Tieren ausschließlich im subapikalen endosomalen bzw. lysosomalen Kompartiment von Megalin-positiven Zellen lokalisiert war, wohingegen Megalin-defiziente Zellen kein Signal für Angiotensinogen aufwiesen (Abb. 4A). Die Western blot Analyse von BBM-Fraktionen erbrachte den Nachweis einer signifikant verminderten Angiotensinogen-Expression im Megalin-defizienten Cre(+) Gewebe im Vergleich zum Cre(-) Gewebe der Kontrolltiere ($-42,7 \pm 2,1\%$; $p < 0,01$; Abb. 4B). Im Gegensatz dazu waren die Angiotensinogen-Plasmakonzentrationen zwischen den zwei verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich [Cre(-) $100,0 \pm 24,9\%$ vs. Cre(+) $121,0 \pm 29,8\%$; Abb. 4C]. Die Urinausscheidung von Angiotensinogen war, ausgewertet über Western blot Analysen von 24h-Sammelurinen, bei den Cre(+) Mäusen signifikant höher als bei den Cre(-) Mäusen, in deren Sammelurinen Angiotensinogen so gut wie nicht nachweisbar war (Abb. 4D). Diese Resultate geben einen Hinweis darauf, dass die intrazelluläre Anreicherung von Angiotensinogen im proximalen Tubulus möglicher Weise in direkter Abhängigkeit zur Expression von Megalin steht und dass Angiotensinogen aus dem Ultrafiltrat über einen durch Megalin medierten Endozytoseprozess tubulär aufgenommen wird.

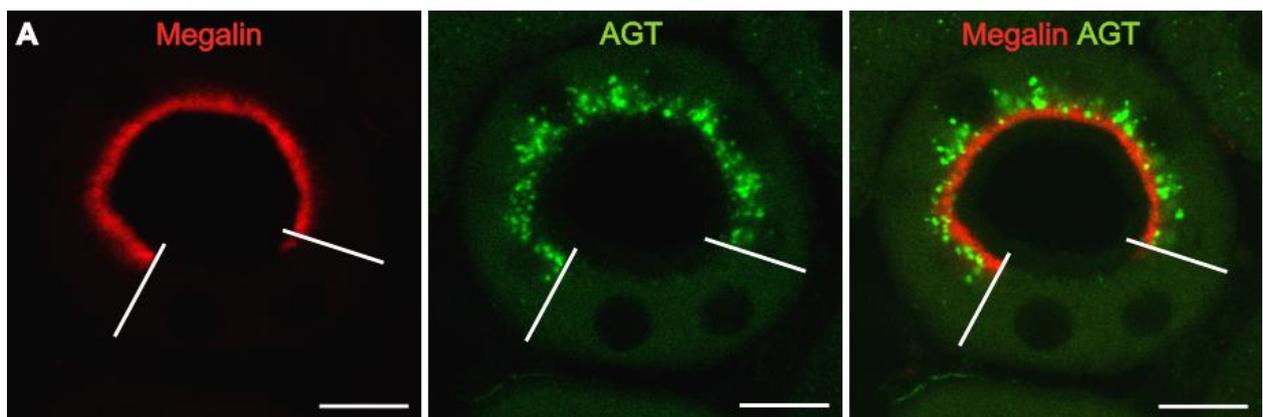


Abb. 4A: Proximal tubuläre Angiotensinogenexpression in Megalin-transgenen Mäusen. Die Doppel-Immunfluoreszenzmarkierungen von Megalin (rot) und Angiotensinogen (AGT, grün) in Megalin-defizienten Cre(+) Nieren zeigen die mosaikförmige Anordnung des Megalin-Signals in einem einzelnen Gewebeschnitt des proximalen Konvoluts. Megalin-positive Zellen zeigen eine subapikale AGT-Verteilung unterhalb der Bürstensaummembran, wohingegen Megalin-defiziente Zellen kein AGT-Signal aufweisen. Skala = 10 μm .

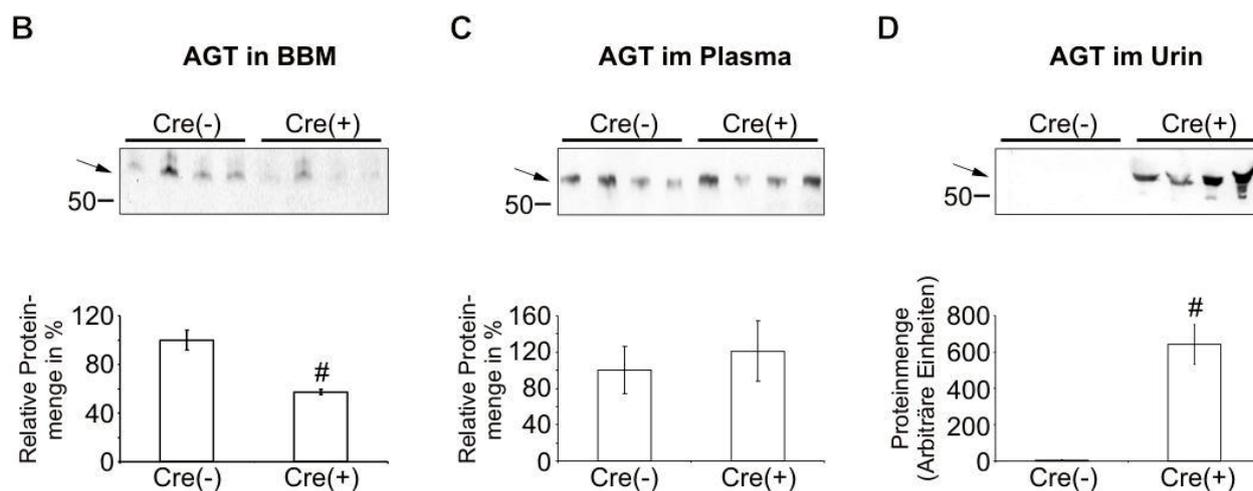


Abb. 4B: Angiotensinogenexpression in Megalin-transgenen Mäusen. Western blot von Angiotensinogen (AGT) in BBM-Fractionen (B), Plasma (C) und Urin (D) von Cre(-) und Cre(+)-Mäusen. Die Pfeile deuten auf die spezifische Bande für AGT bei ca. 55 kDa hin. Werte als Mittelwerte \pm SD; n = 5. # $p < 0,01$.

4.2.4 Angiotensinogen als spezifischer Ligand von Megalin

Megalin ist ein Typ 1 Transmembran-Protein, das aus einer extrazellulären Region, einer einzelnen Transmembrandomäne sowie einem zytoplasmatischen C-Terminus besteht (7). Die Extrazellulärdomäne, verantwortlich für die Bindung von Liganden, enthält vier Regionen von Cystein-angereicherten LDL Rezeptor-Ligandenbindungsdomänen (LBD). Das *receptor-associated protein* (RAP) gilt als potentieller Ligand für alle Mitglieder der LDL Rezeptorfamilie, inklusive Megalin, und kann die physiologische Funktion von Megalin inhibieren (9). Um festzustellen, ob eine spezifische Bindung zwischen Megalin und Angiotensinogen ausgebildet werden kann, wurden *Pull down*-Experimente durchgeführt. Dafür wurden als Negativkontrolle GST (Glutathion) sowie die Fusionsproteine GST-RAP (welches als Positivkontrolle dienen sollte) und GST-AGT als mögliche Bindungspartner eingesetzt und deren Interaktion mit Megalin untersucht. Von den potenziellen Liganden präzipitierten beide Fusionsproteine, GST-RAP und GST-AGT, mit Megalin, welches zuvor aus BBM-Fractionen extrahiert wurde. Der Nachweis der Bindungsfähigkeit der Liganden an Megalin wurde über Silberfärbungen (Abb. 5A) und Western blots (Abb. 5B) von zuvor in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinproben dargestellt. Für GST, welches als Negativkontrolle diente, konnte erwartungsgemäß keine spezifische Bindung mit Megalin nachgewiesen werden.

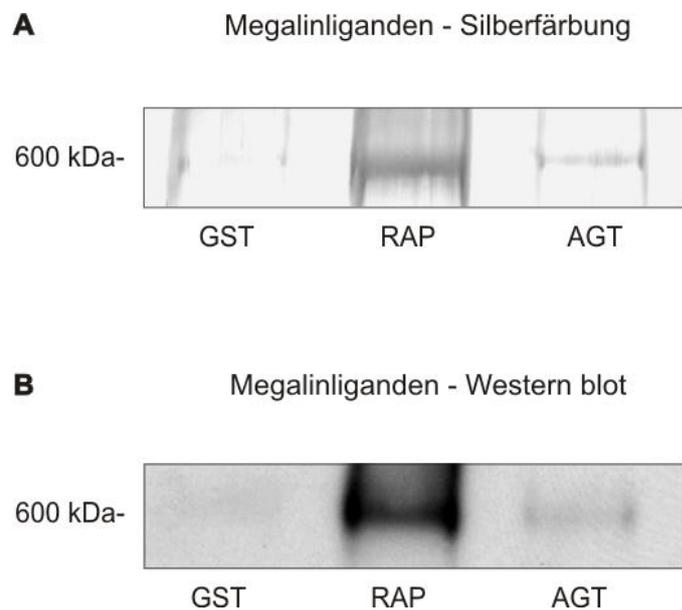


Abb. 5: Megalin bindet Angiotensinogen. (A) Silberfärbung und (B) Western blot eines Megalin *Pull down*-Assays mit GST und den Fusionsproteinen GST-RAP und GST-AGT. Gezeigt wird, dass Megalin (Bande bei ca. 600 kDa) sowohl RAP (Rezeptor assoziiertes Protein, Positivkontrolle) als auch Angiotensinogen (AGT), jedoch nicht GST (Glutathion, Negativkontrolle), bindet.

Der Nachweis der Bindungsfähigkeit von Angiotensinogen an Megalin führte zu der Frage, welche der vier extrazellulären Ligandenbindungsdomänen von Megalin zur Bindung von Angiotensinogen fähig sind. Um die potenziellen Angiotensinogen-Bindungsstellen an den vier verschiedenen extrazellulären Megalin-Ligandenbindungsdomänen (Darstellung der Subdomänen in Abb. 6A) zu lokalisieren, wurden, im Sinne einer Ko-Immunpräzipitation, die Fusionsproteine GST-RAP und GST-AGT mit dem Zelllysate von HEK-EBNA-Zellen inkubiert, welche zuvor mit den isolierten Ligandenbindungsdomänen eins bis vier sowie dem C-Terminus transfiziert worden waren und somit die jeweils translatierten Megalin-Subdomänen enthielten. Nicht nur RAP (Positivkontrolle, Abb. 6B), sondern auch AGT (Abb. 6C) präzipitierte mit allen vier extrazellulären Megalin-Ligandenbindungsdomänen, jedoch nicht mit dem intrazellulären C-Terminus.

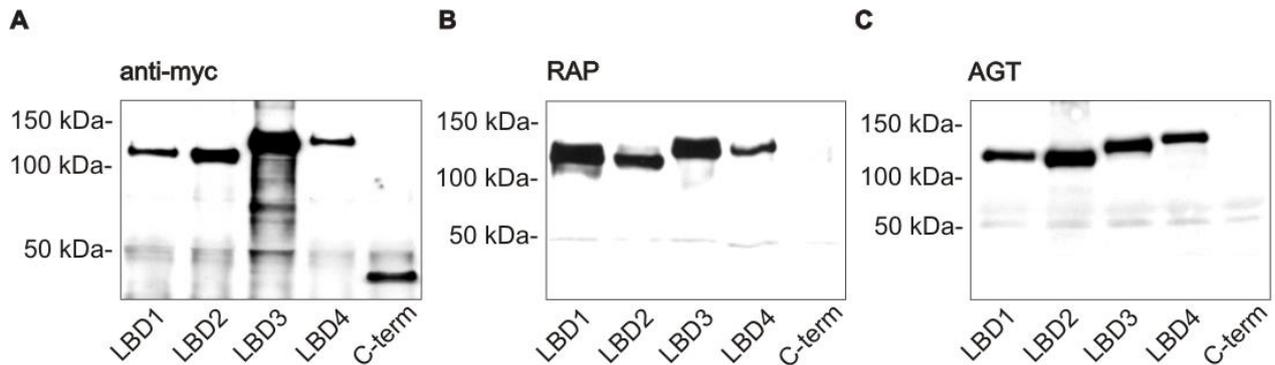


Abb. 6: Alle 4 extrazellulären Megalinligandenbindungsdomänen binden Angiotensinogen. Ko-Immunpräzipitation und Darstellung der extrazellulären Megalin Ligandenbindungsdomänen (LBD) 1-4 und des C-Terminus (C-term) im Western blot. (A) Nativer Nachweis der myc-tag-markierten Megalin-LBDs und des C-Terminus. (B, C) RAP (B, Positivkontrolle) und Angiotensinogen (C, AGT) binden als spezifische Liganden an alle vier extrazellulären LBDs von Megalin, jedoch nicht an den intrazellulären C-Terminus.

4.2.5 Intrazelluläre Wege von Angiotensinogen

Um das intrazelluläre Trafficking von Angiotensinogen im Epithel des proximalen Tubulus zu identifizieren, wurde dessen Lokalisation in unterschiedlichen Endozytosekompartimenten nachverfolgt. Dazu wurden die Antikörper *anti-Clathrin* für Clathrin-Vesikel, *anti-EEA1* für frühe Endosomen, *anti-Rab11* für Recycling-Endosomen und *anti-LAMP-2* für Lysosomen verwendet und jeweils zusammen mit einem Angiotensinogen-Antikörper auf Nierengewebeschnitten von (Cre-)-Mäusen inkubiert. Sämtliche Doppelmarkierungen wurden immunhistochemisch ausgewertet. Angiotensinogen konnte sowohl in Clathrin-Vesikeln als auch in frühen Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 7A und 7B). Immunreaktive Signale für Angiotensinogen fanden sich ebenfalls in den der Endozytose nachgeschalteten Strukturen von Recycling-Endosomen und Lysosomen (Abb. 7C und 7D). Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass Angiotensinogen über einen sich der Endozytose anknüpfenden Pfad prozessiert und sowohl endosomal gespeichert als auch lysosomal degradiert werden kann.

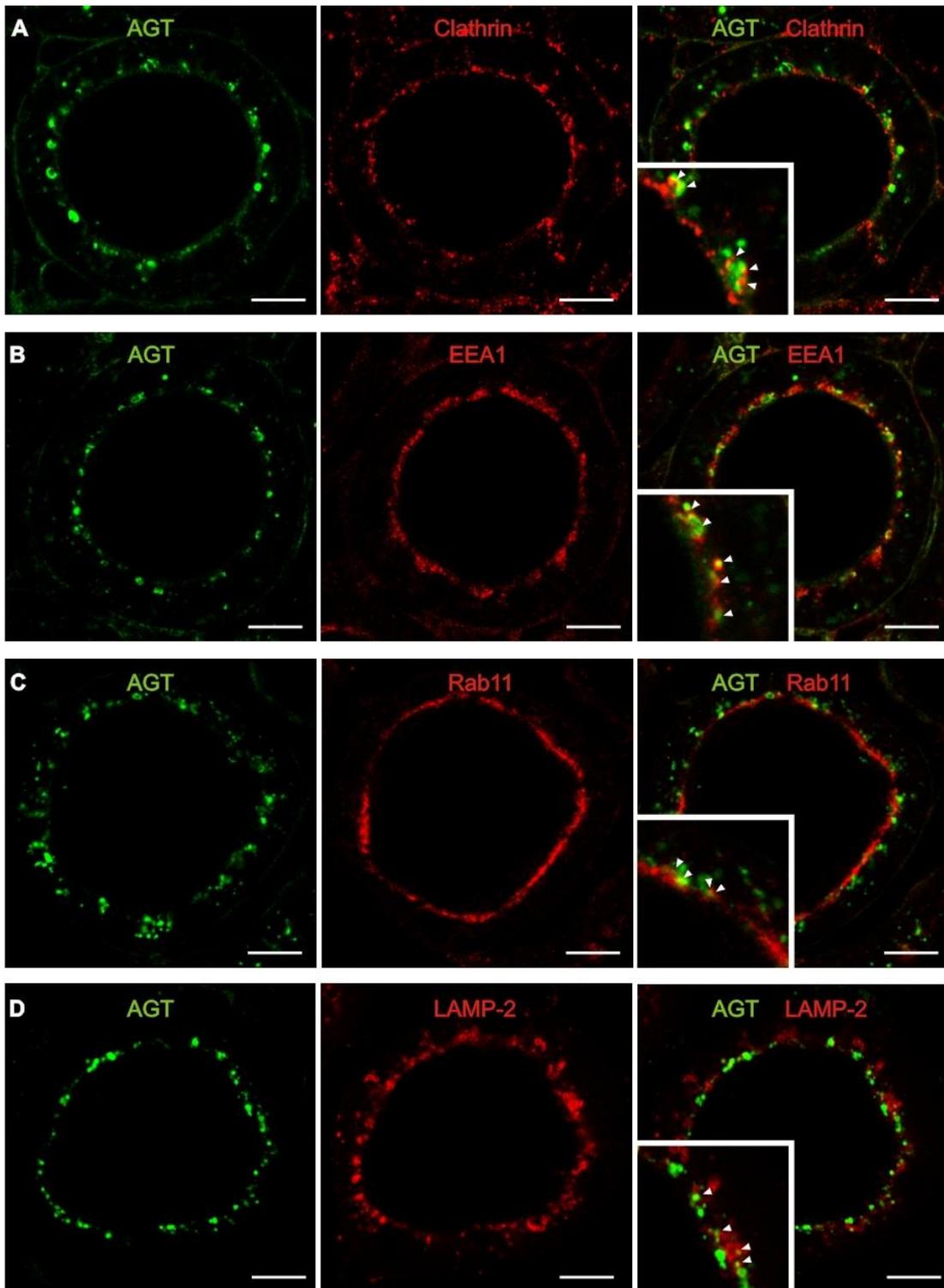


Abb. 7: Intrazelluläre Lokalisation von Angiotensinogen (AGT) im proximalen Tubulus (A bis D). Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von AGT (grün) mit einem *anti-Clathrin* Antikörper, der Clathrin-Vesikel markiert (rot; A); der *anti-EEA1* Antikörper markiert frühe Endosomen (rot; B), der *anti-Rab11* Antikörper markiert Recycling Endosomen (rot; C), der *anti-LAMP-2* Antikörper markiert Lysosomen (rot; D). In den Overlay-Bildern (rechts) zeigen die Fenster in Vergrößerung die Kolo­kalisierung von AGT und dem entsprechend markierten intrazellulären Kompartiment (Überlagerung = gelb, markiert durch Pfeilköpfe). AGT ist in allen vier untersuchten intrazellulären Kompartimenten vertreten. Skala = 10 µm.

4.2.6 Transzytose von Angiotensinogen und Angiotensin II

Für die Fragestellung, ob für Angiotensinogen und für Ang II, dessen Megalin-vermittelte Endozytose bereits früher nachgewiesen wurde (55), ein Mechanismus des transzellulären Transportes, als Ausdruck einer Endozytose-vermittelten Rückgewinnung des Proteins / Peptids, existiert, wurden Opossum Kidney-Zellen (OKZ) auf permeablen (PET)-Zellkulturfiltern in einem Zweikammersystem kultiviert und Transzytoseversuche durchgeführt. Das Filtersystem bietet das Konstrukt einer mit Nährmedium gefüllten oberen und unteren Kammer, so dass eine nahezu physiologische Kultivierung der Zellen erfolgen kann. Die OKZ exprimieren den für den proximalen Tubulus charakteristischen Multiliganden-Rezeptor Megalin in einer hohen Konzentration. Dargestellt wurde dies in der immunhistochemischen- und Western blot Analyse der OKZ (Abb. 8A und 8B).

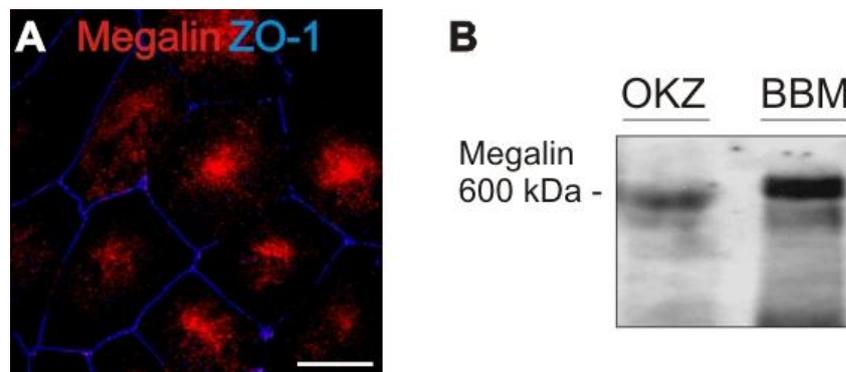


Abb. 8: Megalinexpression in der Opossum Kidney-Zelllinie (OKZ). (A) Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung zeigt ein vesikuläres Signal für Megalin (rot) in OKZ; die Zellgrenzen (blau) wurden mit einem anti-ZO-1 Antikörper markiert. (B) Western blot. Das OKZ-Lysat (links) zeigt analog zur Kontrolle (Mausnieren BBM-Fraktion, rechts) das Signal für die Megalinexpression bei ca. 600 kDa. Skala = 10 μ m.

Durch die Kultivierung auf permeablen Filtern bilden die OKZ eine geschlossene, einreihig polarisierte Epithelschicht mit *Tight Junctions* aus. Um die korrekte Ausbildung von *Tight Junctions* und die Integrität des Zellverbandes zu untersuchen, wurde zunächst der transepitheliale Widerstand (TER) gemessen. Dieser sollte bei vollständiger Zellkonfluenz konstant hoch bleiben. Während des stetigen Zellwachstums bis zur endgültigen Zellkonfluenz erhöhte sich der TER ständig, zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente betrug der TER schließlich konstant 160-180 Ohm/cm²

(Abb. 9A). Zusätzlich wurde der parazelluläre Fluss als Maß für eine mögliche Undichtigkeit des Zellrasens gemessen. Dazu wurde niedermolekulares FITC-Dextran (Molekulargewicht 4 kDa) in die obere Kammer gegeben und anschließend dessen Umverteilung in die untere Kammer gemessen. Die transepitheliale Passage von niedermolekularem FITC-Dextran stellt eine weithin anerkannte Methode zur Abschätzung des parazellulären Flusses und der Integrität des Zellverbandes dar, die Vergleichbar mit der Methode unter Verwendung von [³H]-Mannitol (10) ist. Dabei spielt die nach 60 Minuten durchgeführte photo-fluorometrische Messung der von apikal nach basal gerichteten Diffusion von FITC-Dextran die entscheidende Rolle. Nur $0,167 \pm 0,02\%$ des gesamten FITC-Dextrans, welches zuvor in die obere Kammer gegeben wurde, konnte in der unteren Kammer detektiert werden ($p < 0,001$). Dies entsprach einem außerordentlich geringen parazellulären Fluss (Abb. 9B) und bestätigte die vollständige Konfluenz der Zellschicht.

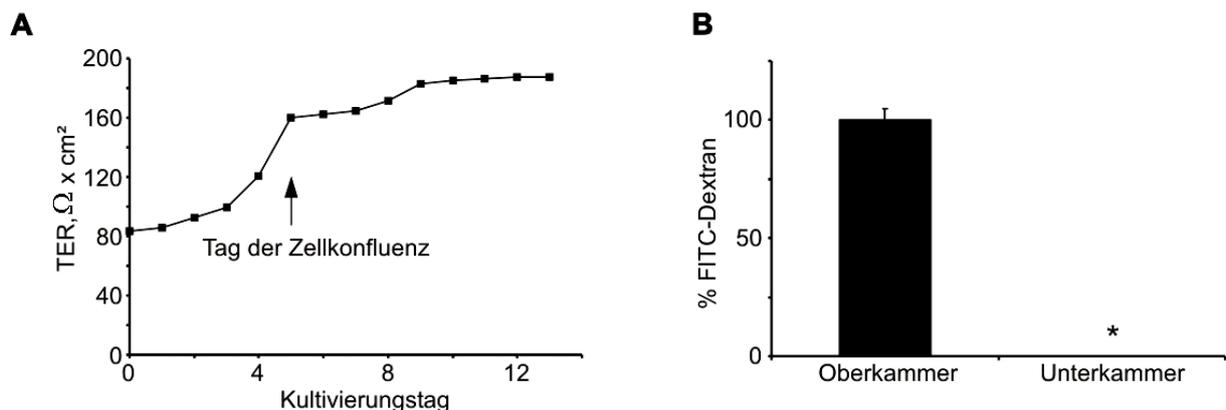


Abb. 9: Charakterisierung der Opossum Kidney-Zelllinie (OKZ). (A) Kultivierung von OKZ auf PET-Filtern. Der transepitheliale Widerstand (TER) steigt im Zeitverlauf stetig an bis zu einem konstanten Level von 160-180 $\Omega \times \text{cm}^2$ ab dem Zeitpunkt der vollständigen Zellkonfluenz. (B) Nachweis der Integrität des Epithelverbandes mit Messung des parazellulären Transports von FITC-Dextran (4 kDa). Nur $0,167 \pm 0,02\%$ des oberhalb des Filters applizierten FITC-Dextrans ist nach 60 Minuten in der Unterkammer detektierbar. * $p < 0,001$.

Die potenzielle Transzytose von Angiotensinogen und von Ang II wurde entweder allein oder unter Zugabe des Megalin-Inhibitors RAP bzw. des Zytostatikums Colchizin untersucht. Im Fall von Ang II, für welches eine Endozytose über den AT_1 -Rezeptor bereits vorbeschrieben ist (55), wurden die Experimente zusätzlich mit dem spezifischen AT_1 -Rezeptor Blocker Valsartan durchgeführt.

Das Zellkulturmedium der oberen Kammer wurde jeweils mit 10 µg/ml Angiotensinogen oder mit 10 µg/ml Ang II inkubiert. Nach 60 Minuten konnte unter Kontrollbedingungen durch die Western blot Analyse der Flüssigkeit der unteren Kammer im Mittel $548 \pm 30,4$ ng/ml Angiotensinogen detektiert werden, entsprechend einer Transzytoserate von ca. 5% (Abb. 8A, links). Die apikale Zugabe von RAP reduzierte auf signifikante Weise die Menge des transzytierten Angiotensinogens ($-62,5 \pm 13,6\%$; $p < 0,05$; Abb. 10A, mittig) und Colchizin zeigte einen noch stärkeren Effekt ($-83,3 \pm 4,3\%$; $p < 0,05$; Abb. 10A, rechts). Für Ang II konnte in der unteren Kammer nach einer Stunde der Nachweis einer Konzentration von $5,4 \pm 1,04$ ng/ml (Transzytoserate = 0,05%) erbracht werden (Abb. 10B, erste Säule). Die Messung von Ang II erfolgte mittels eines kompetitiven Enzym-Immunoassays. Die Menge des transzytierten Ang II konnte jeweils signifikant durch die Zugabe von RAP, Valsartan oder Colchizin gesenkt werden ($-59,9 \pm 2,8\%$, $-45,2 \pm 5,8\%$, und $-56,0 \pm 1,2\%$; $p < 0,05$; Abb. 10B, Säule 2, 3 und 5); RAP und Valsartan in Kombination zeigten im Vergleich zur Einzelapplikation keinen signifikant additiven Effekt ($-48,7 \pm 5,0\%$; $p < 0,05$; Abb. 10B, Säule 4). Zusammengefasst sprechen diese Resultate für eine von Megalin vermittelte Transzytose der beiden RAS - Komponenten, Angiotensinogen und Ang II, im proximalen Tubulusepithel.

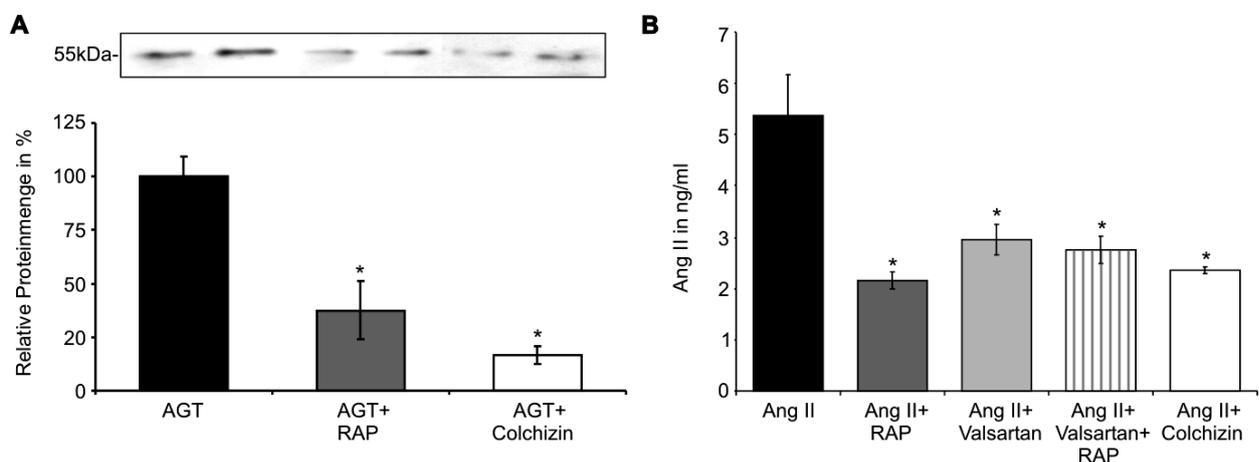


Abb. 10: Proximal tubuläre Transzytose von Angiotensinogen (AGT) und Ang II. Opossum Kidney - Zellen wurden auf PET-Filtern in Zweikammer-Systemen kultiviert und für 1 Stunde von apikaler Seite mit 10 µg/ml AGT bzw. 10 µg/ml Ang II inkubiert. Anschließend wurden die Proben aus den Unterkammern auf den AGT- bzw. Ang II- Gehalt untersucht. (A) Western blot Analyse von AGT. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Transzytose von AGT unter RAP bzw. Colchizin signifikant vermindert. (B) Ang II-Enzym-Immunoassay. Die Transzytose von Ang II ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert unter der Gabe von RAP, Valsartan bzw. Colchizin. Die Effekte von RAP und Valsartan sind in Kombination nicht additiv. Werte als Mittelwerte \pm SD; $n = 6$. * $p < 0,05$.

4.2.7 Lokalisation und Expression von Renin im proximalen Tubulus

Eine Endozytose-vermittelte Aufnahme von Renin im proximalen Tubulus wurde bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (11, 12). Immunreaktives Renin war hier in Gewebeschnitten von Mäusenieren erwartungsgemäß im endosomalen bzw. lysosomalen Kompartiment der frühproximalen Tubuluszellen in Kolokalisation mit Angiotensinogen exprimiert (Abb. 11A). In den Megalin-defizienten Zellen des proximalen Tubulus von Cre(+) Mäusen war immunreaktives Renin, analog dem Expressionsmuster von Angiotensinogen, nicht detektierbar, wohingegen immunreaktives Renin in Gegenwart von Megalin reichlich nachweisbar war (Abb. 11B).

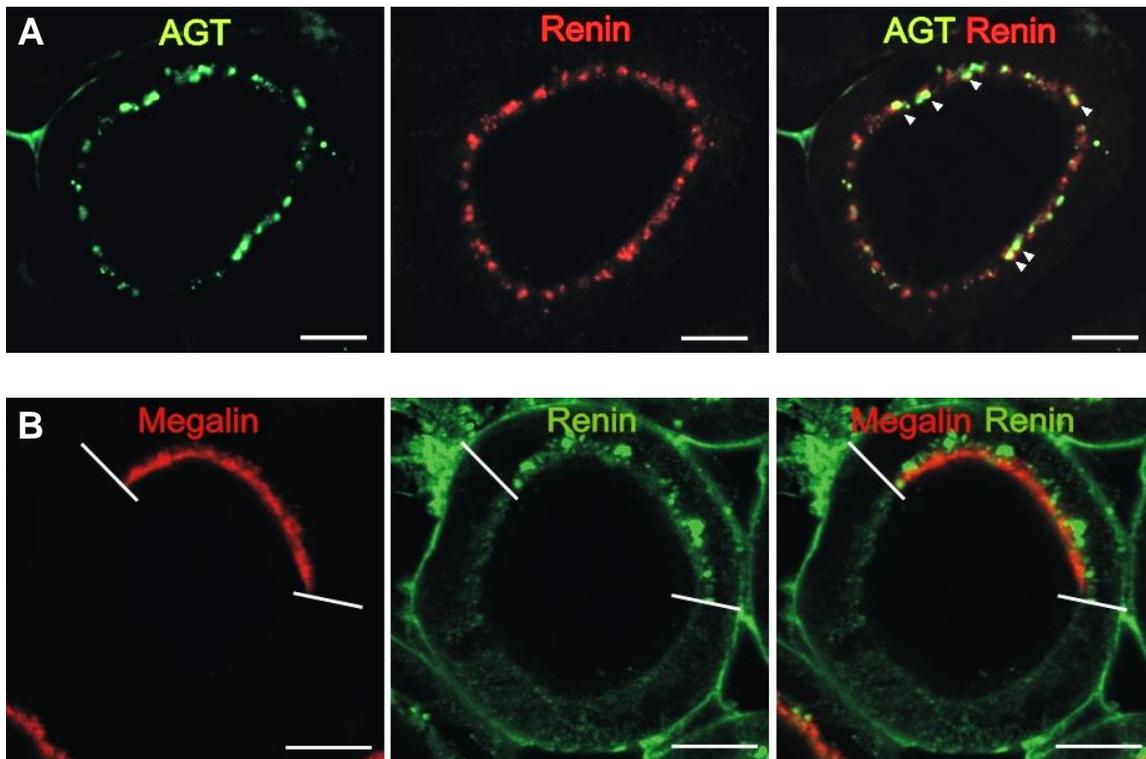


Abb. 11: Proximal tubuläre Reninexpression in Kontroll- und Megalin-defizienten Mäusenieren. (A) Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von Angiotensinogen (AGT, grün) und Renin (rot) auf einem Kryo-Gewebeschnitt einer Cre(-) Niere zeigt eine einheitliche Kolokalisation beider Proteine in intrazellulären Vesikeln (Pfeilköpfe). (B) Die Doppelmarkierung von Megalin (rot) und Renin (grün) in Cre(+) Nieren zeigt, dass Megalin-defiziente Zellen frei von Renin sind. Skala = 10 µm.

Die Western blot Analyse von BBM-Fractionen (Abb. 12A) und Plasma (Abb. 12B) zeigte zwischen den beiden Tierstämmen Cre(-) und Cre(+) keine signifikanten Unterschiede in der Reninexpression [BBM: $100,0 \pm 5,0\%$ in Cre(-) im Vergleich zu $88,2$

$\pm 15,2\%$ in Cre(+); Plasma: $100,0 \pm 24,9\%$ in Cre(-) im Vergleich zu $120,1 \pm 29,8\%$ in Cre(+)]. Die Urinausscheidung von Renin war jedoch in den Cre(+) Mäusen hoch signifikant größer als in den Kontrolltieren, bei denen so gut wie kein Renin im Urin nachgewiesen werden konnte (Abb. 12 C). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die proximal-tubuläre Aufnahme von Renin aus dem Ultrafiltrat vermutlich in Abhängigkeit zur Megalinexpression, analog zu Angiotensinogen, steht.

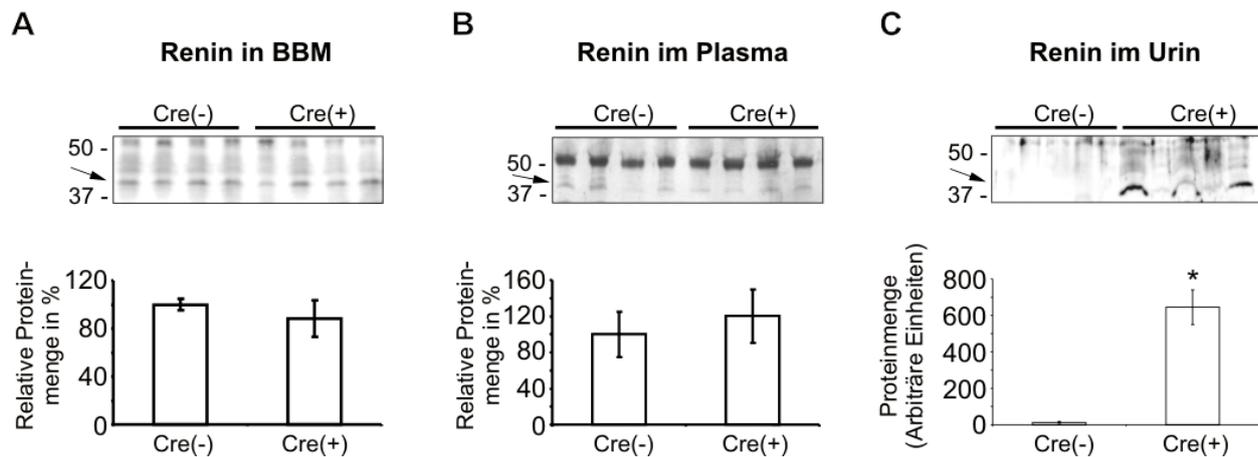


Abb. 12: Reninexpression in Megalin-transgenen Mäusen. Western blots von Renin von Cre(-) und Cre(+) Mäusen in BBM-Fractionen (A), Plasma (B) und Urin (C). Die Pfeile deuten auf die spezifische Bande für Renin hin (untere Bande bei ca. 43 kDa). Die obere Bande entspricht Prorenin mit einer Größe von 53-55 kDa. Die Megalindefizienz der Cre(+) Tiere führt zur signifikanten Ausscheidung von Renin. Werte als Mittelwerte \pm SD; n = 5. * $p < 0,01$.

4.2.8 Lokalisation und Expression von ACE und ACE2 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus

Zur Untersuchung der proximal tubulären Expression vom ACE und ACE2 in Abhängigkeit von einer Megalin-Defizienz wurden immunhistochemische- und Western blot Analysen an Nieren von Cre(-) und Cre(+) Mäusen vorgenommen.

Mittels der Immunhistochemie an Kryoschnitten von Cre(-) Mäusenierengewebe konnte zunächst nachgewiesen werden, dass ACE hauptsächlich in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus, mit deutlich ansteigender Intensität vom S1- bis hin zum S3-Segment, exprimiert wird (Abb. 13A). Die ACE-Expression war in Megalin-defizienten Zellen von Cre(+) Nieren stark vermindert (Abb. 13B). Die Western blot Analyse von BBM-Fractionen zeigte analog eine signifikante Reduktion der ACE-Expression in den

Megalin-defizienten Cre(+) Nieren im Vergleich zu Cre(-) Nieren ($-21,4 \pm 2,2\%$; $p < 0,05$; Abb. 13C, densitometrische Auswertung nicht abgebildet).

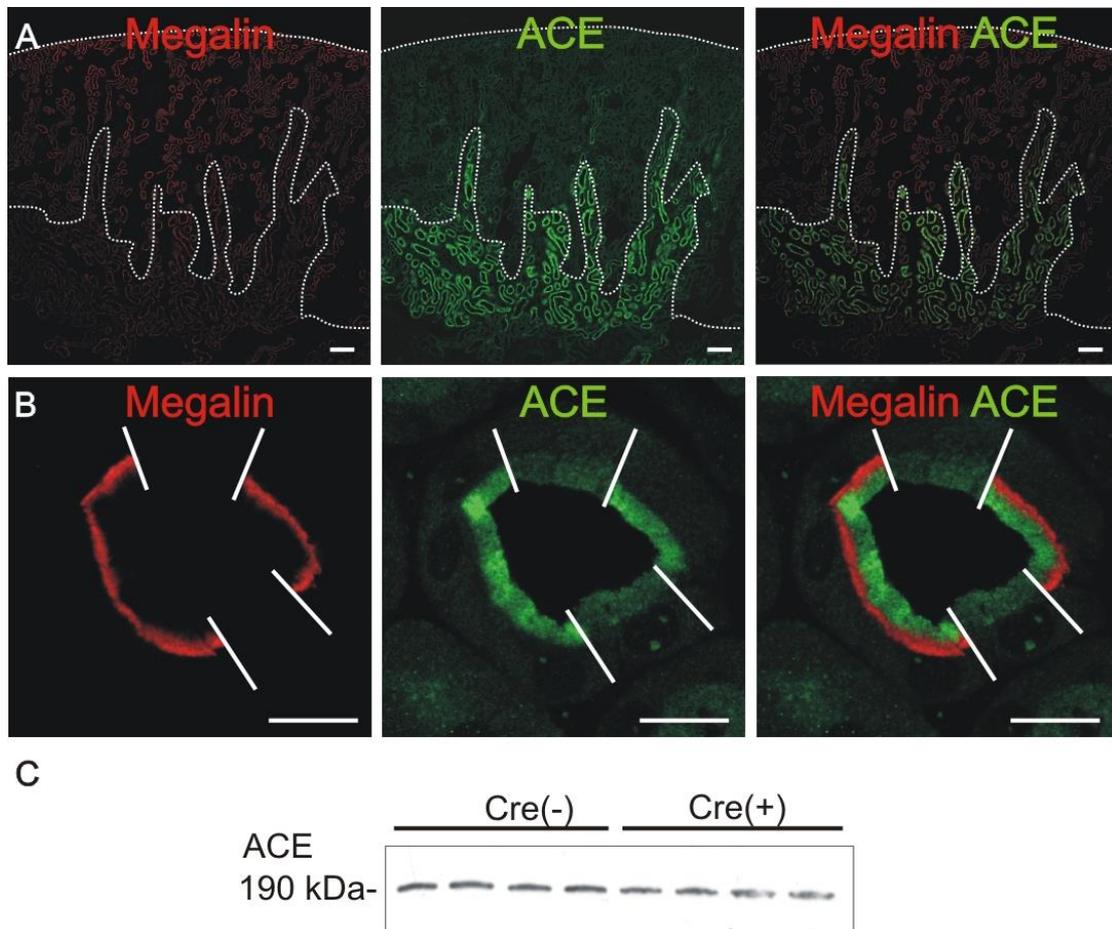


Abb. 13: ACE-Expression in Megalin-defizienten Mäusenieren. (A) Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von ACE (grün) und Megalin (rot) auf einem Kryo-Gewebeschnitt einer Cre(-) Niere. Die untere gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen kortikalem Labyrinth und Markzone / Außenstreifen, in dessen Bereich die Expression von ACE ausgeprägter ist. Die obere gestrichelte Linie markiert die Nierenkapsel. (B) In Cre(+) Nieren zeigen Megalin-defiziente Zellen im Vergleich mit Megalin-positiven Zellen ein stark vermindertes ACE Signal. (C) Die Western blot Analyse der BBM Fraktionen zeigt eine geringfügige Reduktion der ACE Expression in Cre(+) im Vergleich zu Cre(-) Nieren. Skala = 10 μ m.

Im Gegensatz zum ACE zeigte die Expression vom ACE2 in der BBM von Cre(-) Nieren entlang des proximalen Tubulus keine segmentalen Unterschiede. Dessen Expression korrelierte in Cre(+) Nieren interessanter Weise invers zur Megalinexpression. Nicht nur mittels Immunhistochemie fand sich in den Megalin-defizienten Zellen im Vergleich zu den Megalin-positiven Zellen ein erhöhtes ACE2-Vorkommen (Abb. 14A und B). Auch

die Western blot Analyse von BBM-Fractionen zeigte eine signifikante Steigerung der ACE2-Expression in den Nieren der Cre(+) Mäuse im Vergleich zu denen der Cre(-) Mäuse (+ 186,0 ± 33,9%; $p < 0,05$; Abb. 12C, densitometrische Auswertung nicht abgebildet).

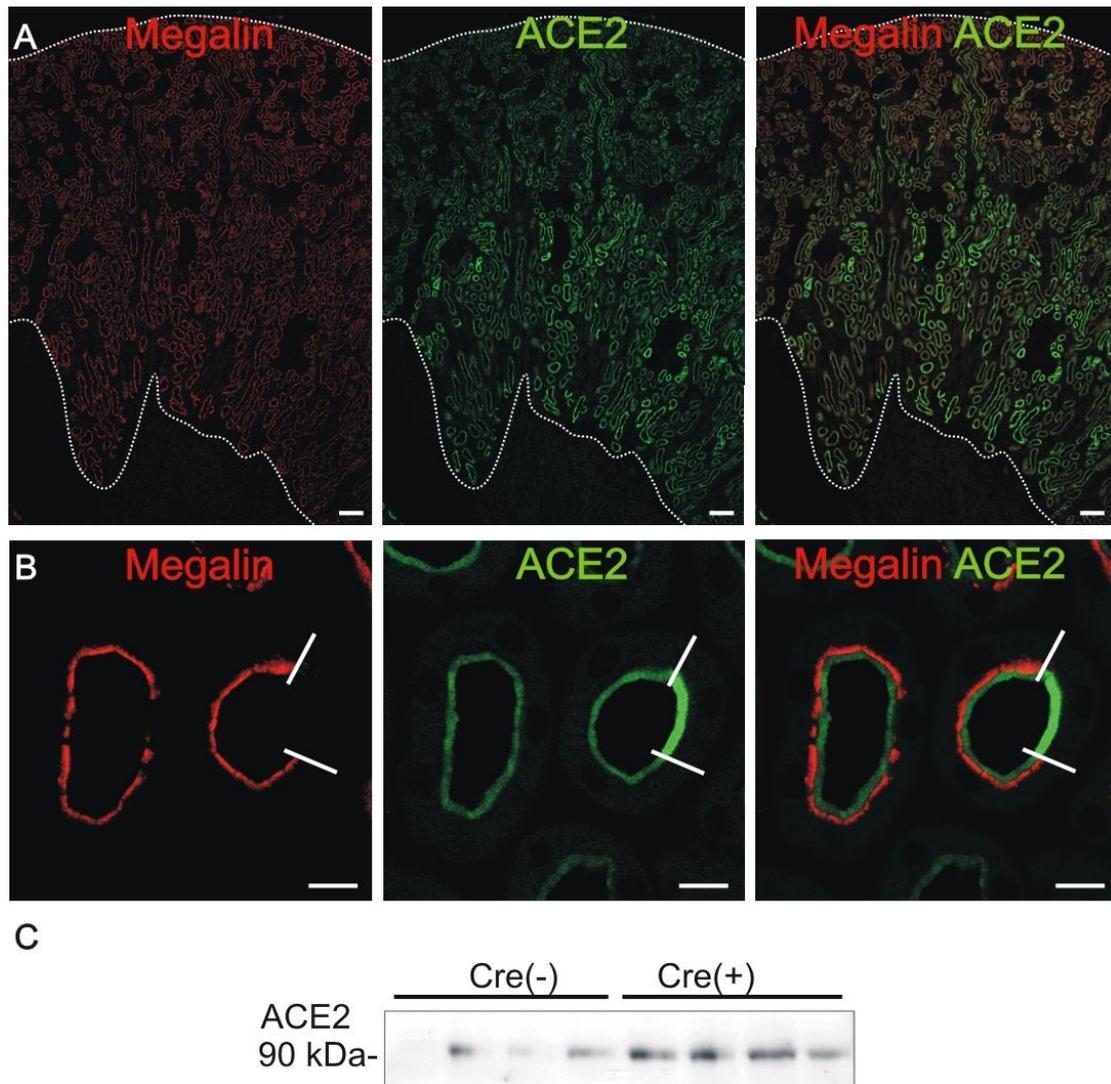


Abb. 14: ACE2-Expression in Megalin-defizienten Mäusenieren. (A) Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von ACE2 (grün) und Megalin (rot) auf einem Kryo-Gewebeschnitt einer Cre(-) Niere. Die untere gestrichelte Linie deutet den Übergang vom Außen- zum Innenstreifen des äußeren Marks an. Die obere gestrichelte Linie markiert die Nierenkapsel. (B) In Cre(+) Nieren zeigen Megalin-defiziente Zellen im Vergleich mit Megalin-positiven Zellen ein stark erhöhtes Signal für ACE2 in der Bürstensaummembran. (C) Die Western blot Analyse von BBM-Fractionen zeigt eine höhere Expressionsrate von ACE2 in Cre(+) im Vergleich zu Cre(-) Tieren. Skala = 10 µm.

4.3 Wassertransport durch AQP1 im proximalen Tubulus

4.3.1 Expression von AQP1 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus

Im Rahmen der eingeschränkten Endozytosefähigkeit durch Megalindefizienz bei Cre(+) Mäusen kommt es zur verminderten Aufnahme von Proteinen und Peptiden aus dem Ultrafiltrat in die Epithelzellen des proximalen Tubulus (7, 72). Unabhängig von dieser bekannten Funktionseinschränkung sollte hier untersucht werden, ob der gestörte Endozytoseapparat im Megalin-defizienten Epithel einen Einfluss auf die Wasserresorptionsfähigkeit der Zellen hat. Dafür wurde die Expression bzw. das Verteilungsmuster von AQP1, dem für die Wasserresorption im proximalen Tubulus bedeutungsvollsten Wasserkanals (30), an den Nieren von Megalin-defizienten Mäusen untersucht.

Die immunhistochemische Analyse der Nierengewebeschnitte von Cre(+) Tieren mit mosaikartiger Megalin-Gendeletion zeigte eine deutliche Steigerung des immunreaktiven AQP1-Signals in der BBM der Megalin-defizienten Zellen im Vergleich zu den Megalin-positiven Zellen, wohingegen das basolaterale Verteilungsmuster der AQP1-Expression nicht verändert war (Abb. 13A, B und C).

Des Weiteren wurde zur detailgenaueren Auflösung der zellulären AQP1-Lokalisation die Technik der Immunelektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten von Cre(+) Nieren angewendet. In den Megalin-positiven Zellen (Abb. 13D) konnte AQP1 in der BBM, dem subapikalen Kompartiment und in den basolateralen Regionen nachgewiesen werden. In den Megalin-defizienten Zellen (Abb. 13E) zeigte sich eine signifikante Steigerung der AQP1-Signalintensität im Bereich der BBM. Dagegen wiesen die subapikalen Kompartimente eine signifikant geringere AQP1-Expression im Vergleich zu Megalin-positiven Zellen auf. Die statistische Auswertung erfolgte durch die Quantifizierung der AQP1-positiven Goldpartikel (Abb. 13F).

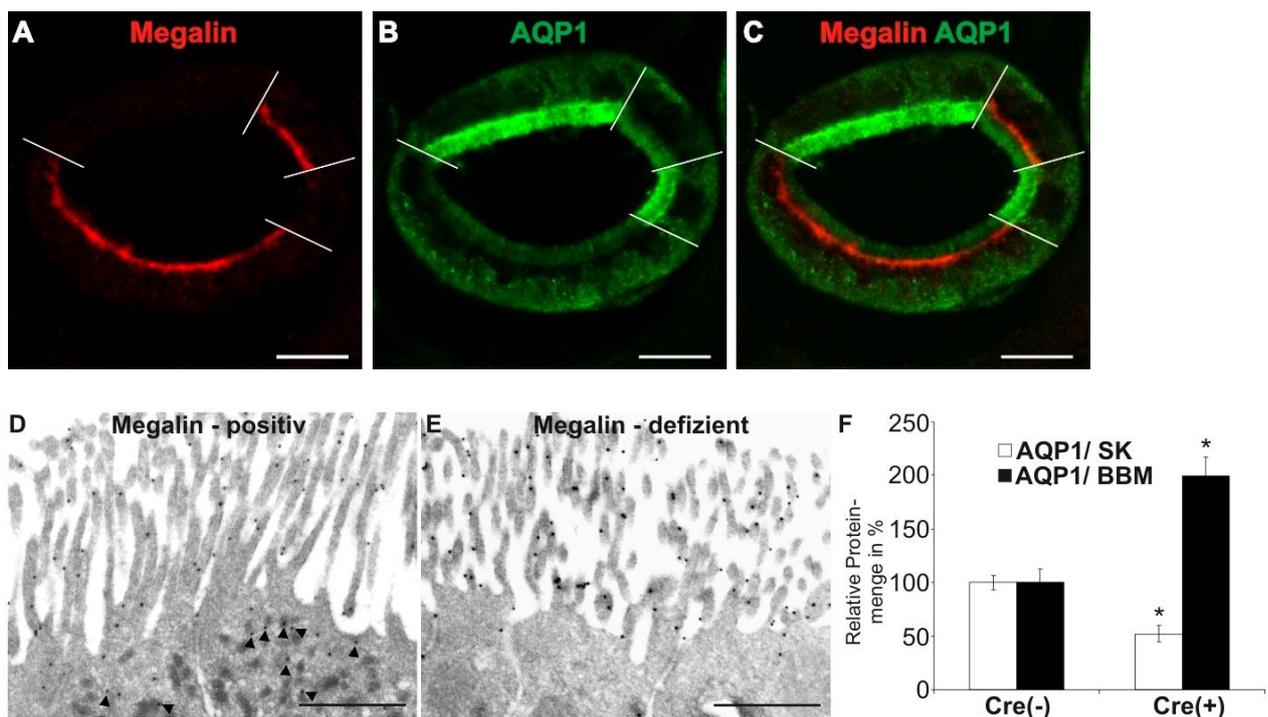


Abb. 15: AQP1-Expression in Megalin-defizienten Mäusenieren. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung auf einem Kryo-Gewebeschnitt einer Cre(+) Niere. Megalin- (A, rot) und AQP1-Markierung (B, grün) sowie Overlay (C). Die Grenzen der Zellen mit Megalinexpression sind mit weißen Linien markiert. Skala = 10 μ m. D-F, Immunogoldfärbung und Darstellung der differierenden Lokalisation von AQP1 in einer Megalin-positiven (D) und in einer Megalin-defizienten (E) Zelle; AQP1 wurde teils mit Pfeilköpfen markiert. (F) Quantifizierung der AQP1-Expression in der Bürstensaummembran (BBM) und im subapikalem Kompartiment (SK) im Vergleich zwischen Megalin-positiven [Cre(-)] und Megalin-defizienten [Cre(+)] Epithelzellen. Mittelwerte \pm SD; n = 5. * $p < 0,05$. Skala = 1 μ m.

Um die immunohistochemischen Ergebnisse zu stützen, wurden Western blot Analysen der BBM-Fractionen von Cre(-) und Cre(+) Nieren durchgeführt. Verglichen mit Cre(-) zeigten die BBM-Fractionen der Cre(+) Nieren eine signifikant höhere Gesamtexpression von AQP1 [100,0 \pm 7,7% in Cre(-) verglichen zu 192,1 \pm 13,7% in Cre(+), Abb. 14A und 14B]. Die AQP1-Expressionsunterschiede zwischen Cre(-)- und Cre(+)-Nieren gingen nicht mit einer Veränderung der AQP1-mRNA einher. Eine vergleichende Analyse der AQP1-mRNA mittels RT-PCR zeigte zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 2).

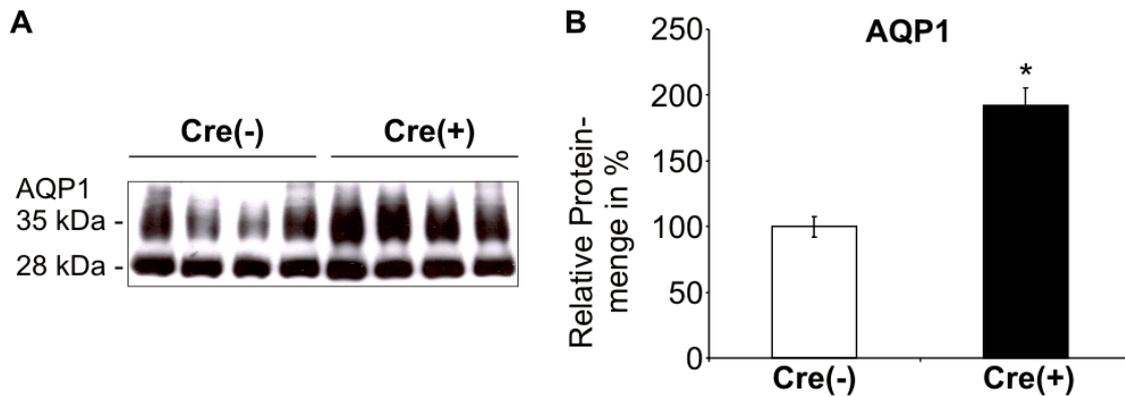


Abb. 16: AQP1 Expression in Megalin-defizienten Mäusenieren. (A) Western blot Analyse von BBM-Fraktionen. Expression von AQP1 in Cre(-) und Cre(+) Nieren. (B) Die densitometrische Auswertung der Western blots zeigt eine AQP1 Expressionssteigerung in Megalin-defizienten Nieren [Cre(+) 192,1 ± 13,7% vs. Kontrolle Cre(-)100,0 ± 7,7%]. Mittelwerte ± SD; n = 5. * p < 0,05.

Tab. 2. AQP1 mRNA – Expression in Nieren von Cre(-) und Cre(+) Mäusen (RT-PCR).

Der Kontrollwert der mRNA Menge von AQP1 in Cre(-) Nieren wird als Standard = 0 gesetzt. Werte als Mittelwerte ± SD; n = 6.

	Berechnung der AQP1 mRNA $\Delta\Delta CT \pm SD$
Cre(-) vs. Cre(+)	0 ± 0,52% vs. -0,02 ± 0,35% (nicht signifikant)

4.3.2 Lokalisation und Trafficking von AQP1 in Opossum Kidney-Zellen (OKZ)

4.3.2.1 Charakterisierung von AQP1-OKZ

Neben den Analysen der konstitutiven AQP1-Expression im Megalin-defizienten Tiermodell sollte ein potenzielles intrazelluläres Trafficking, d.h. die intrazelluläre Umverteilung von AQP1, untersucht werden. Hierfür wurden zunächst OKZ mit Ratten-AQP1-cDNA stabil transfiziert (AQP1-OKZ). Die AQP1-OKZ entsprachen in ihren grundlegenden Eigenschaften dem Epithel des proximalen Tubulus und bildeten eine sowohl differenzierte als auch polarisierte Epithelschicht aus. Die Expression von Zilien und Mikrovilli an der BBM der AQP1-OKZ konnte immunhistochemisch über die Markierung von Mikrotubuli (anti-Tubulin Antikörper) und Aktinfilamenten (anti-Phalloidin Antikörper) nachgewiesen werden (Abb. 17A). Die Western blot-Analyse von AQP1-OKZ - Homogenaten zeigte eine suffiziente AQP1-Expression. AQP1 konnte in einer unglykosylierten Proteinfraction (ca. 28 kDa) und in einer glykosylierten Proteinfraction (ca. 35 - 45 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 17B, linke Bande). Die zur Kontrolle

untersuchte AQP1-Expression in der BBM-Fraktion einer Mausniere (Abb. 17B, rechte Bande) stellte sich als gleichartig dar. Die ursprünglichen OKZ, welche nicht mit AQP1-cDNA stabil transfiziert wurden, zeigten indes keine signifikante Expression von AQP1 (Abb. 17B, mittlere Bande).

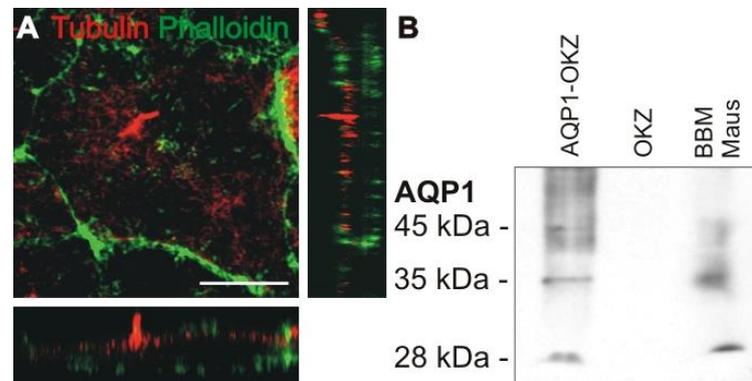


Abb. 17: Charakterisierung der AQP1-Opossum Kidney Zellen (AQP1-OKZ). (A) Starke Vergrößerung einer AQP1-OKZ mit immunhistochemischer Markierung von Tubulin (rot) und Phalloidin (grün). Darstellung der Z-Achse in 2 Ebenen; Primärzilium (rot), basolaterale Zellgrenze (grün). (B) Western blot Analyse mit Darstellung der typischen AQP1 Banden bei 28 kDa und 35-45 kDa in mit AQP1-cDNA stabil transfizierten AQP1-OKZ (links). Die ursprünglichen OKZ (Mitte) zeigen dagegen keine AQP1 Expression. Zur Kontrolle wird die BBM-Fraktion einer Cre(-) Maus mit endogener AQP1-Expression dargestellt (rechts). Skala = 10 µm.

4.3.2.2 Trafficking von AQP1 in AQP1-OKZ

Das Trafficking von AQP1 in AQP1-OKZ wurde für eine Stunde unter den Konditionen (i) eines Scherstresses an der apikalen Zellmembran (FSS, engl. *fluid shear stress*) sowie (ii) unter cGMP-Gabe und (iii) unter cAMP-Gabe analysiert, da bekannt ist, dass Scherstress die intrazelluläre Konzentration der Botenstoffe cGMP und cAMP kurzzeitig erhöhen kann (59). Der Stimulus des FSS wurde dabei in Form einer laminaren Strömung entlang der Oberfläche des Tubulusepithels erzeugt, welche zur Auslenkung der Zilien und Mikrovilli führt (54, 74). Der Scherstress wurde unter Anwendung eines Orbitalshakers mit einer konstanten Frequenz von 1Hz simuliert. In früheren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen Scherstress und dem Anstieg des intrazellulären Kalziums hergestellt werden (58). Der Stimulus des FSS führte auch in den AQP1-OKZ zum signifikanten Kurzzeitanstieg des intrazellulären Kalziums (+54 ± 5,1% FSS vs. Kontrolle, $p < 0,05$. Abb. 18A und B). Der Einfluss der unterschiedlichen Konditionen auf das zelluläre AQP1-Verteilungsmuster wurde mittels Zelloberflächenbiotinylierung, Western blots und immunhistochemischer Aufarbeitung

an fixierten AQP1-OKZ analysiert. Nach 60-minütiger Behandlung der AQP1-OKZ unter FSS und cGMP- bzw. cAMP-Gabe zeigten die Western blot Analysen eine signifikante Anreicherung von AQP1 in der BBM ($100 \pm 5,5\%$ in der Kontrolle vs. $140 \pm 13,8\%$ unter FSS, $132 \pm 8,5\%$ mit cGMP, $147 \pm 12,5\%$ mit cAMP; $p < 0,05$; Abb. 18C, a - biotinylierte Oberflächenproteine; statistische Auswertung: Abb. 18D). Die intrazelluläre Expression von AQP1 (Zellhomogenat) blieb nahezu unverändert (Abb. 18C, b). Die konfokalmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch aufgearbeiteten AQP1-OKZ bestätigte diese Befunde. Nach 60-minütiger Behandlung der Zellen mit FSS und unter cGMP- bzw. cAMP-Gabe zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine stark vermehrte Expression von AQP1 in den Mikrovilli, jedoch nicht intrazellulär (Abb. 18E).

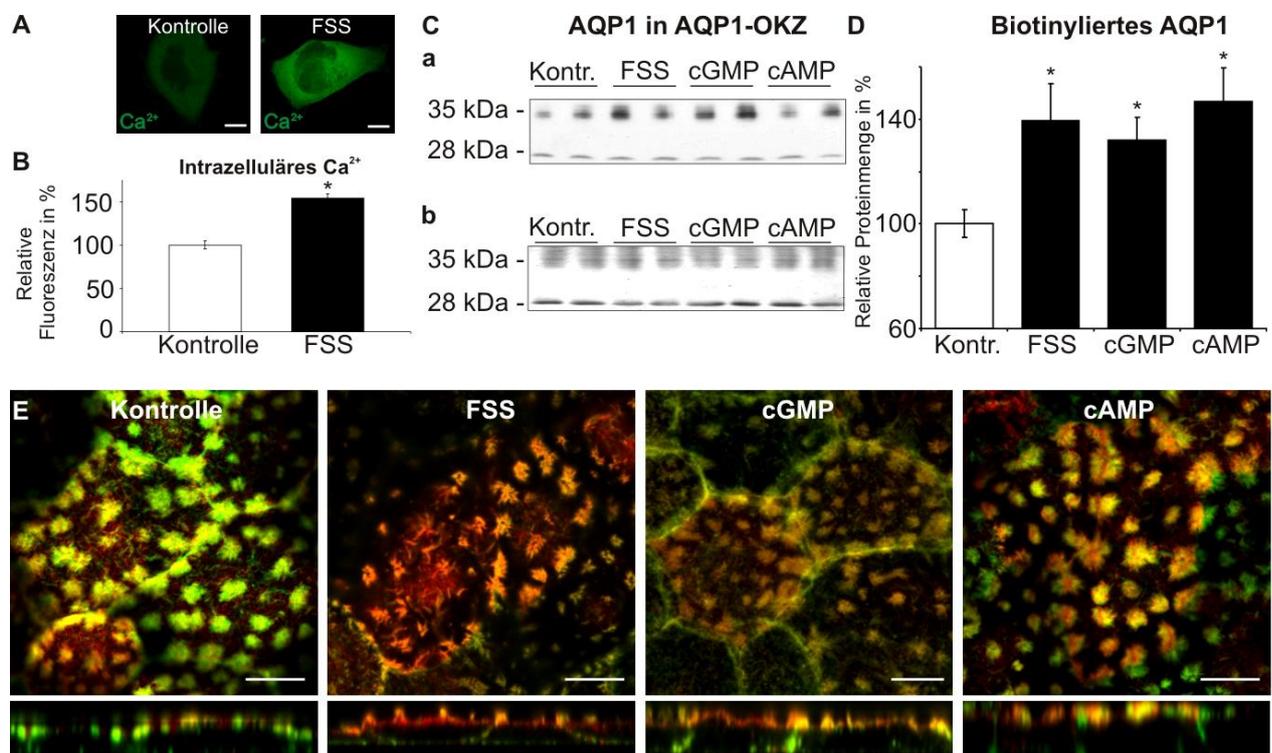


Abb. 18: Intrazelluläres Kalzium und Trafficking von AQP1 in AQP1-OKZ. (A) Grüne Fluoreszenz als Maß des intrazellulären Kalziums in AQP1-OKZ, die transient mit CASE 12 (Kalziomsensitives Fluoreszenz-gekoppeltes Protein) transfiziert wurden. FSS erhöht die intrazelluläre Kalziumaktivität. (B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle. (C) Expression von AQP1 unter den Konditionen FSS, cGMP und cAMP vs. Kontrolle (Kontr.). Western blot Analyse der biotinylierten (a) und nicht-biotinylierten (b) AQP1-Fraktion, statistische Auswertung (D). Unter FSS, cGMP und cAMP findet sich an der Zelloberfläche eine signifikant gesteigerte AQP1-Expression, wohingegen die intrazelluläre Expression nahezu unverändert bleibt. (E) Immunhistochemische Auswertung der AQP1-OKZ. AQP1 in rot und Mikrovilli (Aktinfasern) in grün. Im Vergleich zur Kontrolle ist unter FSS, cGMP und cAMP eine erhöhte AQP1-Expression im Bürstensaumbereich zu sehen; die Z-Achse ist horizontal dargestellt. Mittelwerte \pm SD; n = 6. * $p < 0,05$; Skala = 10 μ m.

4.3.3 Veränderter Wassertransport in AQP1-OKZ unter Kurzzeitstimulation

Anhand der These, dass eine vermehrte Expression von AQP1 in der BBM auch funktionell von Bedeutung sein könnte, sollte die Fähigkeit der AQP1-OKZ zur Wasseraufnahme unter dem Einfluss von Scherstress und cGMP- bzw. cAMP-Gabe untersucht werden. Hierzu wurden Experimente durchgeführt, die die zelluläre Aufnahme von radioaktiv markiertem Wasser (Tritium-Wasser, [³H]-Wasser) quantifizieren sollten. Die AQP1-OKZ wurden zunächst jeweils eine Stunde unter Kontrollbedingungen sowie dem Einfluss von FSS und cGMP- bzw. cAMP-Gaben behandelt. Anschließend wurden die Zellen jeweils für weitere 30 Sekunden mit [³H]-Wasser inkubiert. Die 60-minütige Behandlung mit FSS sowie die cGMP- und cAMP-Gaben führten im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant erhöhten zellulären [³H]-Wasser-Aufnahme, entsprechend einer gesteigerten Membranpermeabilität für Wasser (100 ± 9,9% in der Kontrolle vs. 179,1 ± 15,1% unter FSS, 144,2 ± 11,4% mit cGMP, 172,8 ± 18,6% mit cAMP; $p < 0,05$).

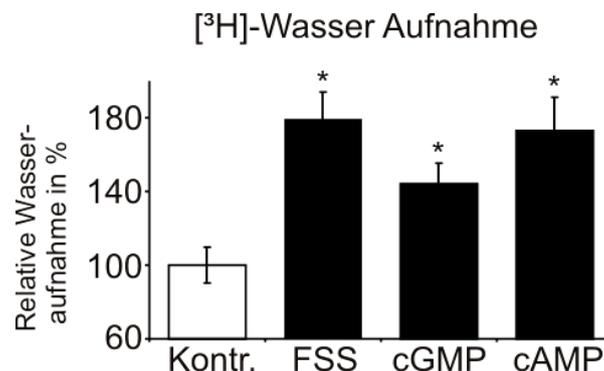


Abb. 19. Messung der zellulären Wasseraufnahme unter Kurzzeitstimulation von AQP1. Die zelluläre [³H]-Wasser-Aufnahme der AQP1-OKZ ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht unter Einfluss von FSS (Scherstress) sowie unter cGMP- und cAMP-Gabe. Mittelwerte ± SD; n = 8. * $p < 0,05$.

4.3.4 Kurzzeit-Trafficking von AQP1 im isolierten proximalen Tubulus

Die Zellkulturexperimente an AQP1-OKZ zeigten eine Beeinflussung der AQP1-Expression und -Funktion unter der Wirkung von Scherstress entlang der Oberfläche der apikalen Zellmembranen. Ergänzend hierzu wurde die Expression von AQP1 in isoliert perfundierten proximalen Tubuli (IPT) von C57-BL/6 Mäusen unter dem Einfluss variabler intratubulärer Flussraten untersucht. Die Integrität der für jeweils 60 Minuten perfundierten Tubuli war, mitsamt der allzeitig nachweisbaren AQP1-Expression, bei allen Experimenten stets gewährleistet (Abb. 20A). Hohe bzw. niedrige Flussraten

wurden durch eine Anpassung des Perfusionsdrucks bewerkstelligt. Die Veränderungen des Perfusionsdrucks konnten anhand der Variation des Innendurchmessers der Tubuli nachvollzogen werden (Hoher Fluss $18,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$; niedriger Fluss $12,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Publierte Daten zeigen, dass in einem vergleichbaren Ansatz hohe Flussraten von ca. 18 nl/min bzw. niedrige Flussraten von ca. 8 nl/min erreicht wurden (27). Im Anschluss an die jeweils 60-minütige Stimulation mit den unterschiedlichen Flussraten wurden die IPT für die elektronenmikroskopische Auswertung aufbereitet (Abb. 20C, D). Die immunzytochemische Quantifizierung des AQP1-Signals in Form von Immunogold-Partikeln (Abb. 20B) ergab für hohe Flussraten im Vergleich zu niedrigen Flussraten eine signifikante Expressionssteigerung für AQP1 im subapikalen Kompartiment (SK) und in der BBM (SK: $335 \pm 29,9\%$ bei hohem vs. niedrigem Fluss; BBM: $207 \pm 20,6\%$ bei hohem vs. niedrigem Fluss; $p < 0,05$).

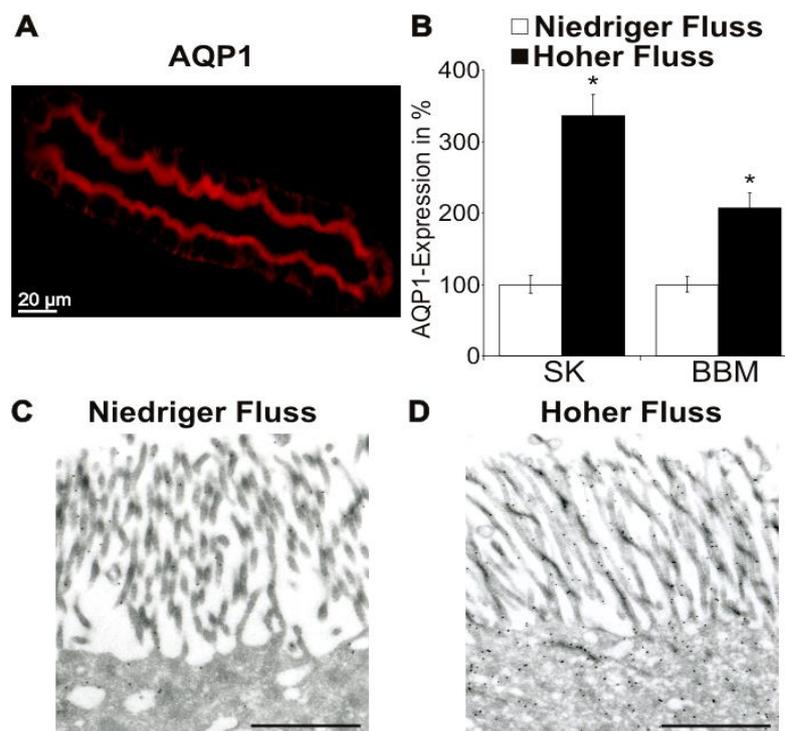


Abb. 20. Auswirkungen von hohen und niedrigen Flussraten auf die AQP1-Expression in isolierten proximalen Tubuli (IPT). (A) IPT immunhistochemisch für AQP1 markiert (rot), die endogene Expression von AQP1 demonstrierend. (B-D) Elektronenmikroskopische Darstellung und Quantifizierung der AQP1-positiven Goldpartikel in der Bürstensaummembran (BBM) und im subapikalen Kompartiment (SK) von mit niedrigen (C) und hohen (D) Flussraten perfundierten IPT. Eine hohe Flussrate entlang der apikalen Membran des IPT bewirkt eine signifikant erhöhte AQP1-Expression im SK und in der BBM (B, D). Mittelwerte \pm SD; $n = 6$ Tubuli. * $p < 0,05$. Skala (A) = $20 \mu\text{m}$. Skala (C, D) = $1 \mu\text{m}$.

5 Diskussion

5.1 Koexpression von Komponenten des RAS im proximalen Tubulus

In dieser Arbeit wurde zunächst die Regulation von Komponenten des RAS im proximalen Tubulus der Niere untersucht.

5.1.1 Angiotensinogen im proximalen Tubulus der Niere

Ein wesentlicher Fokus der vorliegenden Arbeit war das Ausgangssubstrat des RAS, Angiotensinogen, welches über die enzymatische Spaltung durch Renin das Dekapeptid Angiotensin I liefert. Die Rolle einer intrinsisch-renalen bzw. speziell die der proximal tubulären Synthese von Angiotensinogen wurde in Hinblick auf ein lokales RAS der Niere bereits früher diskutiert (32, 33, 34, 71). Ungelöst blieb bisher jedoch die Frage, inwieweit segmentale Unterschiede der lokalen Angiotensinogensynthese sowie die Endozytose von Angiotensinogen aus dem Ultrafiltrat im proximalen Tubulus zur Homöostase des renalen Angiotensinogen-Gehaltes beitragen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten zunächst eine effektive zelluläre Aufnahme von exogen zugeführtem, radioaktiv-markiertem Angiotensinogen im frühen Abschnitt des proximalen Tubulus (S1- und S2-Segmente). Dies bestätigte im Gegensatz zu zuvor publizierten Daten, dass Angiotensinogen den glomerulären Filter trotz seiner hohen Molekularmasse von ca. 66 kDa passieren kann (61). Das autoradiographische Signal im frühen Abschnitt des proximalen Tubulus gab außerdem einen konkreten Hinweis darauf, dass glomerulär filtrierte Angiotensinogen womöglich über einen endosomalen bzw. lysosomalen Pfad endozytiert wird, wie es zuvor für Albumin demonstriert wurde (61).

Gestützt wurde dieser Befund durch Experimente am Mausmodell mit partieller Megalindeizienz im proximalen Tubulusepithel. Der Endozytoserezeptor Megalin wird normalerweise in hoher Konzentration in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus exprimiert (2). Megalin sorgt zusammen mit dem Rezeptor Cubilin, dessen Expression eng mit Megalin assoziiert ist, für die Wiederaufnahme von glomerulär filtrierten Proteinen sowie Protein-gebundenen Vitaminen aus dem Ultrafiltrat und verhindert somit deren Verlust über den Urin (53, 72). Weiterhin ist bekannt, dass Megalin das lokale RAS der Niere beeinflusst, da es für die Rezeptor-vermittelte

Endozytose von Ang II zuständig ist und somit die lokale Wirkung von Ang II im proximalen Tubulus moduliert (43, 49, 55). Im hier untersuchten Tiermodell wurde die Megalinexpression über eine Cre-Rekombinase nierenspezifisch partiell deletiert; das Tiermodell entstammt dem Labor von T. Willnow, MDC Berlin (2). Frühere Tiermodelle mit komplettem Megalindefekt waren für morphologische bzw. experimentelle Studien ungeeignet, da die betroffenen Mäuse unmittelbar nach der Geburt, meist in Folge eines angeborenen Hirndefektes, verstarben (2). Tiere mit partieller Nieren-spezifischer Megalindefizienz zeigen hingegen ein normales Wachstumsverhalten bis hin zur Geschlechtsreife (2). Charakteristischer Weise tritt bei diesen Tieren eine ausgeprägte Proteinurie sowie ein Vitamin-D-Mangel auf; letzterer, da Vitamin-D bzw. das Vitamin-D-bindende Protein aufgrund der Minderexpression von Megalin signifikant weniger aus dem glomerulären Primärfiltrat endozytiert werden kann (2, 53, 72). Bei den Versuchstieren der vorliegenden Untersuchungen konnte eine Reduktion der renalen Gesamtexpression von Megalin auf ca. 30% des Wildtypniveaus nachgewiesen werden. Die Megalindefizienz zeigte sich in den immunhistochemischen Auswertungen an Semidünnschnitten von Nierenkortexgewebe als eine mosaikartige Gendeletion, die in proximalen Tubulusepithelien die vergleichende Betrachtung von intakten, d.h. Megalin-positiven, wie auch Megalin-defizienten Zellen erlaubt.

Bereits in früheren Publikationen konnte nachgewiesen werden, dass das Fehlen von Megalin zur Störung des endosomalen Apparates beiträgt (45). Neben einer Einschränkung der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Proteinen führt eine Megalindefizienz auch zur Beeinträchtigung des Trafficking von zellmembranständigen Transportern, wie von NaPi-2a (1, 3, 45). Im Rahmen der Analyse der Angiotensinogenexpression im proximalen Tubulus konnte hier erstmals dargestellt werden, dass lediglich die Megalin-exprimierenden Zellen, d.h. die zur Endozytose von im Primärfiltrat gelöstem Angiotensinogen fähigen Zellen, eine intrazelluläre Anreicherung von Angiotensinogen vorweisen. Megalin-defiziente Zellen zeigten hingegen als Ausdruck eines gestörten Endozytoseapparates kein Signal für Angiotensinogen. Die These, dass die zelluläre Akkumulation von Angiotensinogen über Endozytose aus dem Ultrafiltrat mit Hilfe von Megalin in analoger Weise zu Albumin (61) stattfinden muss, wurde durch diesen Befund bestätigt.

In früheren Studien wurde vermutet, dass lediglich die zweite der vier extrazellulären Megalin-Ligandenbindungsdomänen für eine Rezeptor-Liganden-Interaktion in Frage käme, da nur für diesen Teil eine Bindungsaffinität für potenzielle Liganden postuliert

wurde (45, 55). Mittels *Pull down*-Experimenten und Ko-Immünpräzipitationsansätzen konnte hier jedoch erstmals verdeutlicht werden, dass alle 4 extrazellulären Megalin-Ligandenbindungsdomänen als Bindungsstellen für Angiotensinogen in Frage kommen. Als bestätigender Nebenbefund für die Methodik der Liganden-Interaktionsstudie zeigte sich, dass das *Receptor associated protein* (Rezeptor-assoziiertes Protein, RAP), welches intrazellulär als Chaperon für Megalin agiert (9), ebenfalls an alle 4 Megalin-Ligandenbindungsdomänen bindet. Anhand dieser Ergebnisse ist von einer spezifischen, Rezeptor-vermittelten Endozytose von Angiotensinogen aus dem Ultrafiltrat auszugehen, wobei Megalin als Rezeptor fungiert.

Der Befund der proximal tubulären Angiotensinogenanreicherung über Endozytose wird durch frühere Untersuchungen unterstützt. Diese zeigten, dass die Menge von in Nieren befindlichem Angiotensinogen unter einer Inhibition der Endozytose durch das Zytostatikum Colchizin in kurzer Zeit signifikant vermindert werden konnte (62). Ergänzend sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass es bisher keine hinreichend aussagekräftigen Hinweise gibt, die eine von basolateral nach intrazellulär gerichtete, d. h. vom Interstitium bzw. Blutstrom stammende, Aufnahme von Angiotensinogen in die proximalen Tubuluszellen beschreiben.

Als ein weiteres wichtiges Resultat wurde immunreaktives Angiotensinogen in den hier durchgeführten Untersuchungen ausschließlich im proximalen Konvolut, also in den frühen Anteilen des proximalen Tubulus, nachgewiesen. Die Erkenntnisse mikroskopischer Untersuchungen an Semidünnschnitten sowohl von Angiotensinogen-überexprimierenden Rattennieren, als auch der Nachweis von exogen zugeführtem [¹²⁵I]-markiertem Angiotensinogen im proximalen Konvolut von SD-Ratten sowie der Angiotensinogennachweis in Megalin-positiven Zellen von Megalin-transgenen Mäusenieren stehen diesbezüglich in Einklang mit vorherigen Berichten, die eine selektive Lokalisation von Angiotensinogen im proximalen Konvolut beschrieben (32, 34, 65). Im Gegensatz zur Angiotensinogen-Proteinexpression war in den hier durchgeführten Untersuchungen Angiotensinogen-mRNA vornehmlich in den späten Anteilen des proximalen Tubulus (S3-Segment) nachweisbar. Dies konnte sowohl mittels *In situ*-Hybridisierung als auch durch Quantifizierung von Angiotensinogen-mRNA über RT-PCR Analysen von segmental isolierten Tubuluspräparaten differenziert dargestellt werden. Im Detail zeigte die Quantifizierung der RT-PCR, dass in den S1- und S2-Abschnitten im Gegenteil zum S3-Segment fast keine Angiotensinogen-mRNA nachweisbar war.

Diese Daten stehen in Kontrast zu früheren PCR-Untersuchungen an Rattennieren, welche eine gleichmäßige Verteilung der Angiotensinogen-mRNA entlang der Segmente S1-S3 postulierten (5). Die Ursache dieser Diskrepanz ist unklar, allerdings könnten die unterschiedlichen Ergebnisse methodisch bedingt sein, da die konventionellen PCR-Techniken der früheren Arbeiten im Gegensatz zu den heutigen RT-PCR-Techniken weniger sensitiv oder weniger reproduzierbar waren und somit die segmentalen Unterschiede der Angiotensinogen-mRNA-Expression womöglich nicht klar darstellen konnten.

Der Nachweis von Angiotensinogen-RNA im S3-Segment zeigt eine dort stattfindende Angiotensinogen-Proteinbiosynthese an. Allerdings ist aufgrund des hier nachgewiesenen relativen Mangels von Angiotensinogen-Protein im S3-Segment im Vergleich zu den S1- und S2-Segmenten davon auszugehen, dass das in der Niere translatierte Angiotensinogen nicht intrazellulär gespeichert wird. In ähnlicher Weise geschieht dies in der Leber. Dort wird intrazellulär generiertes Angiotensinogen ebenfalls nicht gespeichert, sondern nach der Synthese in den Blutkreislauf sezerniert (6, 62). Im Gegensatz zur Leber besteht im proximalen Tubulus der Niere jedoch die Möglichkeit, dass lokal synthetisiertes Angiotensinogen nach luminal in den Primärurin freigesetzt wird und im Urin nachgewiesen werden kann (38, 40). Das sezernierte Angiotensinogen des S3-Segmentes kann sich potenziell auf der luminalen Seite mit primär glomerulär filtriertem Angiotensinogen vermischen und ist dann in späteren Nephronsegmenten sowie im ausgeschiedenen Urin vorzufinden. Die Menge des im Urin nachweisbaren Angiotensinogens scheint dabei von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein. Rohwasser *et. al.* demonstrierten, dass die ausgeschiedene Angiotensinogen-Menge im Urin invers zur nutritiven Salzaufnahme eines Individuums steht (38). In den hier durchgeführten Untersuchungen waren in den Urinen der Megalin-defizienten Mäuse im Vergleich zu denen der Kontrolltiere ebenfalls signifikant erhöhte Mengen von Angiotensinogen nachweisbar. Dies war jedoch nicht Ausdruck einer vermehrten oder verminderten Salzaufnahme der Versuchstiere, sondern am ehesten die Folge der gestörten proximal-tubulären Endozytose von glomerulär filtriertem Angiotensinogen im Falle einer signifikanten Megalindefizienz.

Potenzielle Veränderungen des Angiotensinogengehaltes bzw. der lokal-renalen Angiotensinogensynthese im proximalen Tubulus wurden bereits zuvor unter dem Einfluss von diätetischen und hormonellen Stimuli oder chirurgischen Ansätzen, wie der einseitigen Nephrektomie, untersucht (38, 40, 71), wobei eine segmentspezifische

Unterscheidung des Angiotensinogengehaltes nicht erfolgte: Im Mausmodell mit Androgen-reguliertem Promoter für Ratten-Angiotensinogen-cDNA (64) führt die isolierte proximal-tubuläre Überexpression von Ratten-Angiotensinogen auf bisher nicht im Detail geklärte Weise zu systemischen Effekten wie arterieller Hypertonie und Albuminurie, welche wiederum zur morphologischen Schädigung der Epithelien des gesamten proximalen Tubulus beitragen können (64). Mit Kenntnis der hier erhobenen Daten ist jedoch nun anzunehmen, dass diese Effekte aus einer segment-spezifischen lokalen Überexpression von Angiotensinogen in der pars recta (S3-Segment) mit vermutlicher Aktivierung des lokalen RAS resultieren. Im Gegensatz dazu scheinen die Ursachen der hypertensiven und proteinurischen Effekte, wie sie im Rattenmodell mit systemischer Überexpression des humanen Angiotensinogens auftreten (63, 87), in einer Aktivierung des systemischen und des renalen RAS zu liegen, die sich auf nieren-spezifischer Ebene in der gesteigerten de novo-Synthese von Angiotensinogen in der pars recta und dem vermehrten Gehalt von Angiotensinogen im proximalen Konvolut, welches potenziell über Endozytose aus dem Ultrafiltrat angereichert wird, widerspiegelt.

5.1.2 Lokalisation und Expression von Renin

Renin, welches auf enzymatischem Weg Angiotensinogen zu Angiotensin I umwandelt, wurde bereits in früheren Untersuchungen im proximalen Tubulus lokalisiert (32, 80). Die Aktivität bzw. die Ausprägung der Expression von Renin wurde dabei auch in Abhängigkeit zur Salzaufnahme über die Nahrung gestellt. Demnach führt eine salzarme Diät innerhalb von 96 Stunden zur ca. 2-fachen Steigerung der proximal tubulären Renin-mRNA (42) und es wurde postuliert, dass das lokale RAS zur funktionellen Anpassung der Niere an langzeitige Veränderung des Salzhaushaltes beitragen würde. Des Weiteren wurde kontrovers diskutiert, ob proximal tubulär nachweisbares Renin lokalen Ursprungs oder eher Ausdruck einer glomerulären Filtration und tubulären Endozytose-vermittelten Aufnahme sei (32, 38). Der Nachweis von Renin-mRNA gelang sowohl unter Normalbedingungen als auch unter experimentellen Konditionen nur mit Hilfe hoch sensitiver PCR-Techniken (42, 64, 80), so dass von einer nur sehr geringen Syntheserate von Renin innerhalb des Epithels des proximalen Tubulus auszugehen ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigten zunächst als Bestätigung früherer

Publikationen, dass Renin im proximalen Tubulus tatsächlich nachweisbar ist. Die Reninexpression stellte sich hierbei in Kollokalisierung mit Angiotensinogen im endosomalen bzw. lysosomalen Kompartiment der frühproximalen Tubuluszellen dar. Dass Renin, ähnlich wie Angiotensinogen, ein Bindungspartner von Megalin ist und somit potenziell über die Rezeptor-vermittelte Endozytose aus dem Ultrafiltrat in den proximalen Tubulus aufgenommen werden kann, konnte hier anhand der Analysen am Mausmodell mit mosaikartiger Megalindefizienz dargestellt werden. Lediglich die intakten proximalen Tubulusepithelien, welche Megalin exprimierten und deren Endozytoseapparat somit nicht gestört war, wiesen, analog zu Angiotensinogen, eine intrazelluläre Akkumulation von Renin auf. Ob diese Befunde auch für das Vorläuferprotein Prorenin gelten, ist jedoch nicht bekannt, da eine detaillierte Differenzierung der Prorenin- und Reninexpression im proximalen Tubulus bisher nicht beschrieben wurde. Unabhängig davon wurde Prorenin als Ligand des Renin / Prorenin-Rezeptors im proximalen Tubulus definiert (34). Die Bindung von Prorenin an seinen Rezeptor ermöglicht dort auf lokaler Ebene die Interaktion von Prorenin mit kollokaliserten Komponenten des RAS (34, 64). Die Megalindefizienz führte in den hier untersuchten Tieren, neben den Expressionsveränderungen im proximalen Tubulus, im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikant gesteigerten Ausscheidung von Renin über den Urin. Dies spricht, analog zu den Ergebnissen für Angiotensinogen, für eine wesentliche Rolle von Megalin für die proximal tubuläre Aufnahme von Renin aus dem Ultrafiltrat. Die Endozytose-vermittelte Aufnahme von Renin durch Megalin trägt jedoch höchstwahrscheinlich nur auf lokaler bzw. intratubulärer Ebene zur Modulation des RAS bei. In den hier durchgeführten Experimenten konnte zumindest keine signifikante Auswirkung der Megalindefizienz auf den Plasma-Reningehalt bzw. die Expression von Renin in der Bürstensaummembran von Cre(+)-Nieren festgestellt werden. Dies könnte auch darin begründet sein, dass die Reninexpression quantitativ im juxtaglomerulären Apparat deutlich höher als im proximalen Tubulus und somit quantitativ bestimmend für die Konzentration von Renin im Plasma- bzw. Nierengewebe ist (22, 39, 82).

5.1.3 Lokalisation und Expression von ACE und ACE2

Die Expression von ACE im proximalen Tubulus konnte lediglich mit Einschränkung auf die pars recta nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde ACE2 in allen Segmenten des proximalen Tubulus lokalisiert. Diese Befunde stehen in Einklang mit

früheren Publikationen, die zeigten, dass im proximalen Tubulus die Expressionsverteilung beider Enzyme verschieden geartet ist (20, 32, 44). Des Weiteren war in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli der Megalin-defizienten Mäuse ein weiterer Unterschied in der Expression zwischen ACE und ACE2 auffällig. Die Megalin-defizienten Zellen wiesen im Vergleich zu Megalin-positiven Zellen zwar eine signifikant verringerte ACE-, jedoch gleichzeitig eine erhöhte ACE2-Expression auf.

Die Divergenz im Expressionsmuster reflektiert aus physiologischer Sicht offenbar die konkurrierenden Funktionen beider Enzyme. ACE wandelt Ang I in Ang II um, wohingegen ACE2 Ang II funktionell degradieren kann, indem es aus dem Oktapeptid Ang II das Heptapeptid Ang-(1-7) generiert (20). Die Expression von Megalin und ein intakter endosomaler Apparat scheinen für die Oberflächenexpression von ACE offenbar notwendig zu sein. Im Gegensatz dazu ist vermutlich für ACE2 ein im Rahmen der Megalindefizienz auftretendes, verändertes Shuttling in die Zellmembran von Bedeutung, so, wie es zuvor für NaPi-2a am Modell der Megalin-defizienten Maus postuliert wurde (45). Die abweichende Regulation und die gegensätzlichen Funktionen von ACE und ACE2 wurden in früheren Arbeiten bereits beschrieben (19, 20, 65). Die Ausprägung der Oberflächenexpression beider Proteine wurde jedoch als ähnlich geartet angesehen, da für beide Enzyme das Potenzial einer spontanen Internalisierung aus der Zellmembran heraus in das Zytoplasma, im Vergleich zu anderen membranständigen Proteinen, als relativ gering eingeschätzt wurde (78). Die Ursachen der hier dargestellten segmental unterschiedlichen Expression zwischen ACE und ACE2 im proximalen Tubulus sowie der gleichzeitig gegensätzlichen Oberflächenexpression im Rahmen der Megalindefizienz, welche einen Defekt des Endozytosapparates sowie eine Störung des Membranshuttlings verursacht, sind noch nicht bekannt. Vermutlich stehen diese Befunde im Zusammenhang spezifischer Interaktionen von ACE und ACE2 mit zytosolischen Signalproteinen, die ihrerseits in unterschiedlicher Weise von der Megalindefizienz betroffen sind. Die Megalindefizienz führt auf Zellebene zur Störung der durch Megalin vermittelten Signalwege sowie zur Beeinträchtigung der Recyclingschritte und Endozytose von anderen Proteinen (7). Möglicherweise betreffen die für NHE3 bereits beschriebenen Interaktionen mit Megalin (7) sowie dessen Einfluss auf die NHE3-Genregulation (48) auch die Expression von ACE und ACE2.

5.1.4 Intrazelluläre Wege der proximal tubulären RAS-Komponenten

In den frühen Abschnitten des proximalen Tubulus basiert das Vorkommen intrazellulären Angiotensinogens auf der Rezeptor-vermittelten Endozytose des Proteins aus dem Ultrafiltrat. Aufgrund der nachweisbaren intrazellulären Anreicherung von Angiotensinogen in Abhängigkeit von der Expression von Megalin ist anzunehmen, dass ein Teil des resorbierten Proteins nach der Endozytose intrazellulär gespeichert wird. Die intrazelluläre Speicherung von Angiotensinogen ließ sich anhand der Doppelmarkierung von Angiotensinogen mit *anti-Clathrin*, dem Marker für Clathrin-Vesikel, und *anti-EEA1*, dem Marker für frühe Endosomen, gut nachvollziehen. Clathrin-Vesikel und frühe Endosomen gelten als essenzielle Bestandteile des intrazellulären Endozytoseweges (47). Deren Bedeutung für die Speicherung bzw. Rückgewinnung von Proteinen konnte zuvor bereits in Untersuchungen demonstriert werden, die die proximal tubuläre Verarbeitung von Albumin untersuchten (7, 47, 72). Die Endozytose von Angiotensinogen durch Megalin resultiert jedoch, neben der Speicherung, zu einem größeren Anteil in einer sich der Endozytose anschließenden lysosomalen Verarbeitung und Degradation des Proteins, da die intrazelluläre Akkumulation von Angiotensinogen vor allem in Vesikeln auftrat, welche in ihrer Größe und Lokalisation Lysosomen entsprachen (66, 67). Aufgrund der ebenfalls reichlich vorhandenen Kolo-kalisation von Angiotensinogen mit dem Marker *Rab11*, welcher Recyclingendosomen markiert, zeigte sich, dass parallel zu Degradationsvorgängen offenbar auch Recyclingprozesse ablaufen, die schließlich zur Anreicherung von Angiotensinogen im Bereich der luminalen Zelloberfläche führen. Bereits für NHE3 konnte gezeigt werden, dass die Kolo-kalisation mit Recyclingendosomen Ausdruck einer der lysosomalen Degradation entgegenstehenden intrazellulären Proteinverwertung ist (68). An Tubuluszellen des proximalen Konvoluts von Kaninchen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Angiotensinogen auch dann in das tubuläre Lumen sezerniert werden kann, wenn Angiotensinogen mRNA-Transkript nicht vorzufinden und eine lokale Synthese nicht nachweisbar ist (69). Demnach ist zu postulieren, dass Angiotensinogen, welches infolge einer primären Endozytose intrazellulär gespeichert wurde, möglicherweise über ein intrazelluläres Trafficking sekundär wieder in das proximale Tubuluslumen sezerniert werden kann.

Zusätzlich wurde hier die Hypothese geprüft, ob für Angiotensinogen ein potenzieller Transzytose-Mechanismus existiert, der im Sinne eines Transportes aus dem tubulären

Ultrafiltrat in das renale Interstitium zur Wiederverwertung des Proteins beiträgt. Mit Hilfe von Zellkulturexperimenten an Opossum Kidney-Zellen, die proximal tubuläre Eigenschaften besitzen, konnte die Transzytose von intaktem Angiotensinogen durch das Epithel demonstriert werden. Innerhalb von einer Stunde wurden ca. 5% des apikal zugeführten Proteins nach basolateral transportiert. Dieser Vorgang stand in Abhängigkeit von der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Megalin, da dessen Inaktivierung durch den Inhibitor RAP zur signifikanten Verringerung der Transzytose von Angiotensinogen führte. Dass an dieser Stelle auch ein Transzytose-mindernder Effekt durch das Zytostatikum Colchizin nachgewiesen werden konnte, deutet auf die Notwendigkeit der Integrität des Zytoskeletts (28) beim Vorgang der Transzytose hin. Eine Megalin-abhängige proximal-tubuläre Transzytose wurde zuvor bereits für das Retinol bindende-Protein (RBP) gezeigt (70). Dieser Mechanismus wurde als möglicher Weg zur Vermeidung des Verlustes von RBP über den Urin beschrieben, und in gleicher Weise könnte dies auch für Angiotensinogen erwogen werden. Die zusätzlich nachgewiesene Transzytose von Ang II, welches ebenfalls ein Megalin-Ligand ist (55), diente als Positivkontrolle für den hiesigen Versuchsaufbau zur Transzytose. Die Transzytose von Ang II war zum einen, wie bei Angiotensinogen, Megalin-abhängig, da RAP die Transzytose maßgeblich reduzierte. Zusätzlich konnte jedoch auch ein die Transzytose von Ang II reduzierender Effekt durch einen Angiotensinrezeptor Typ 1 - Blocker beobachtet werden. Ein additiver inhibitorischer Effekt durch RAP und den Angiotensinrezeptor Typ 1 - Blocker konnte hingegen nicht festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den spezifischen Verarbeitungswegen von Ang II, die für Megalin und den Angiotensinrezeptor Typ 1 postuliert wurden (55). Die im Vergleich zu Angiotensinogen deutlich geringere Transzytose-Rate von Ang II (5% vs. 0,05%) könnte dem Umstand geschuldet gewesen sein, dass Bürstensaumproteasen, zu denen auch ACE2 rechnet, einen Teil des angebotenen Ang II degradiert haben.

5.2 AQP1 im proximalen Tubulus der Niere

Die Funktion des proximalen Tubulus ist durch eine differenzierte Elektrolyt- und Wasserresorptionsfähigkeit gekennzeichnet. Als wichtigster Wasserkanal im proximalen Tubulus gilt dabei AQP1, der hier für die Resorption von etwa 80% des filtrierten Wassers verantwortlich ist (30, 50, 51). Die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde zu

diesem Wasserkanal wurden erhoben, um seine Lokalisation und Funktion im proximalen Tubulus zu charakterisieren.

5.2.1 Lokalisation von AQP1 im Megalin-defizienten proximalen Tubulus

Die hier präsentierte Studie hatte zur Fragestellung, wie die AQP1-Expression und das AQP1-Trafficking im proximalen Tubulus beeinflusst werden. Hierzu erfolgte initial die Untersuchung des Expressionsprofils von AQP1 im Mausmodell mit partieller Megalindefizienz, welches bereits zuvor den Analysen der RAS-Komponenten im ersten Teil der Arbeit diente. Immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch war ersichtlich, dass der Defekt des Endozytoseapparates in Megalin-defizienten Zellen zu einer vor allem luminal nachweisbar gesteigerten Expression von AQP1 führte. Intaktes Epithel ohne Megalindefizienz zeigte im Vergleich dazu eine signifikant verminderte luminaire Anreicherung von AQP1. Auf transkriptioneller Ebene konnten mittels *real time* - PCR keine signifikanten Unterschiede der AQP1-Expression zwischen den Kontrollen und den Megalin-defizienten Tieren festgestellt werden. Somit dürften die AQP1-Mengenunterschiede, die in Abhängigkeit von der Megalinexpression auftraten, auf Änderungen in der Proteinebene beruht haben. Erwähnenswert ist hierbei, dass Megalin nicht nur für die Endozytose einer großen Anzahl essenzieller Proteine sondern auch für die Funktion und das Trafficking diverser Rezeptoren und Transporter notwendig ist (46, 53, 70, 72). In den hier durchgeführten elektronenmikroskopischen Dokumentationen konnte gezeigt werden, dass Megalin-defiziente Zellen einen Mangel an Recyclingendosomen vorweisen. Dies kann als Zeichen einer funktionellen Einschränkung der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Megalin und damit eines beschädigten Endozytoseapparates gedeutet werden (72). Die gesteigerte luminaire APQ1-Menge bei Megalindefizienz war daher möglicherweise einer stark eingeschränkten endozytotischen Rücknahme des Wasserkanals in intrazelluläre Kompartimente geschuldet. Dies spricht dafür, dass adäquates Trafficking und luminaire Insertion von AQP1 von der Megalinexpression und einem intakten Endozytoseapparat abhängig sind. Zuvor wurden ähnliche Befunde für den Natrium-Phosphat-Kotransporter der Isoform 2a (NaPi-IIa) bei partieller Megalindefizienz beschrieben (45, 46). Es zeigte sich, dass die Megalindefizienz das Recycling von NaPi-IIa über endosomale Kompartimente verminderte und dies zur signifikanten Steigerung der

apikalen Expression von NaPi-IIa sowie zum geringeren Ansprechen des Transporters auf Parathormon führte (45).

5.2.2 Kurzzeit-Trafficking von AQP1 im isolierten proximalen Tubulus

Die am Megalin-defizienten Mausmodell zu beobachtende Umverteilung von AQP1 führte zur Frage, ob neben dieser dauerhaften Veränderung der AQP1-Lokalisation in Folge einer Störung des Endozytoseapparates auch funktionelle Mechanismen existieren, die das Trafficking von AQP1 modulieren können.

T. Wang *et al.* demonstrierten, dass Scherstress, der im Rahmen einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate bzw. einer erhöhten intratubulären Flussrate an der Oberfläche von Tubulusepithelien zu tragen kommt, die proximal tubuläre Natrium-, Chlorid-, Bikarbonat- und Wasserresorption steigert (27, 54). Die vermehrte Natrium- und Bikarbonatresorption basiert auf einer Expressionssteigerung von NHE3 und der apikalen H-ATPase (27), und es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Scherstresses und der Resorptionsleistung im proximalen Tubulus vorgeschlagen (27). Als ein möglicher auslösender Mechanismus in der Modulation der Resorptionsleistung wurde insbesondere die Auslenkung der epithelialen Mikrovilli, in Abhängigkeit von der Stärke des Scherstresses, diskutiert (73). Ferner war evident, dass die Auslenkung der Mikrovilli sich auf das Aktinzytoskelett überträgt (74) und zur Aktivierung intrazellulärer Kaskaden führt, die das Trafficking von Transportern beeinflussen (26, 54). In welcher Form die gesteigerte Wasserresorption im Fall eines erhöhten Scherstresses ausgelöst wird, wurde im Gegensatz zu den Natrium- und Bikarbonattransportprozessen bisher nicht untersucht.

Als etabliertes Modell zur Analyse proximal tubulärer Funktionen bot sich die Untersuchung von isoliert perfundierten proximalen Tubuli an, da diese die anschließende morphologische Beurteilung mittels Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie ermöglichen (90). Ziel der Untersuchungen war es, in den isolierten proximalen Tubuli kurzzeitige, intratubuläre Flussveränderungen vorzunehmen und zu prüfen, ob gesteigerte intratubuläre Flussraten im Sinne eines erhöhten Scherstresses zur vermehrten Aktivierung von AQP1 führen, so, wie es zuvor für NHE3 postuliert wurde. Dazu war es notwendig, dass die angewandten Methoden die Integrität der Tubuli nicht verletzen und gleichzeitig physiologische intratubuläre Flussraten erzielt wurden. Es wurden hohe (18 nl/min.) und niedrige (8 nl/min.)

intratubuläre Flussraten appliziert, die jeweils hohen bzw. niedrigen Scherstress auf die Mikrovilli der Epithelien ausüben sollten. In zuvor durchgeführten Untersuchungen mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau war nachgewiesen worden, dass bei Flussraten von 5 bis 20 nl/min. ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Flussrate, dem inneren Durchmesser des Tubulus sowie dem auf die Epithelien wirkenden Scherstress existiert (27).

Die elektronenmikroskopische Auswertung der isolierten proximalen Tubuli nach jeweils 60-minütiger Perfusion mit hohen bzw. niedrigen Flussraten zeigte, dass hohe intratubuläre Flussraten zur signifikanten Expressionssteigerung von AQP1 im subapikalen Bereich und in der Bürstensaummembran der Epithelien führten. Dies lässt vermuten, dass, analog zu den Beobachtungen für NHE3, eine erhöhte intratubuläre Flussrate, vermutlich über Scherstress, eine vermehrte AQP1-Expression bewirken kann (27, 54). In früheren Versuchen war nachgewiesen worden, dass eine verminderte tubuläre Flussrate die Expression von AQP1 ebenso beeinflusst. So wurde für Tiermodelle mit experimentellem nephrotischem Syndrom und Reduktion der glomerulären Filtrationsrate eine reduzierte AQP1-Expression beschrieben (76, 77). Die Reduktion der AQP1-Expression wurde allerdings als mögliches Zeichen für Veränderungen der Harnkonzentrationsmechanismen im Sinne von Störungen des osmotischen Gradienten bzw. des Gegenstromprinzips in der Henle'schen Schleife interpretiert und die Relevanz von intratubulären Flussveränderungen wurde nicht unmittelbar untersucht (76, 77).

5.2.3 Trafficking von AQP1 und Aktivierung des Wassertransportes in Zellkultur

Um die Eigenschaften des Expressionsverhaltens von AQP1 in Zellkultur zu untersuchen, wurden OKZ mit einem AQP1-Konstrukt stabil transfiziert (AQP1-OKZ). In den AQP1-OKZ konnte immunzytochemisch eine hohe endogene Expression des Wasserkanals nachgewiesen werden. Die aus den Experimenten mit isolierten proximalen Tubuli zuvor erzielten Ergebnisse sprachen für eine luminale Expressionsvermehrung von AQP1 unter dem Kurzeiteinfluss von Scherstress. Mit Hilfe der AQP1-OKZ sollte diesbezüglich geprüft werden, ob neben einer Expressionsvermehrung von AQP1 auch eine funktionelle Aktivierung des Wassertransportes durch Scherstress bewirkt wird. In früheren Studien wurde postuliert, dass Scherstress auch zum kurzfristigen Anstieg des intrazellulären Gehaltes von

Kalzium und den Botenstoffen cGMP und cAMP führt und dadurch das Expressionsverhalten von Transportern beeinflusst (25, 26, 58, 75). Durch die hier durchgeführten Zellkulturexperimente konnte nun dargestellt werden, dass sowohl Scherstress allein als auch die externe Applikation der Botenstoffe cGMP und cAMP die luminale Expression von AQP1 kurzfristig steigern können. Dies war konfokalmikroskopisch anhand der intrazellulären Umverteilung von AQP1 nachvollziehbar. Insbesondere führte die Anwendung von Scherstress dazu, dass die AQP1-Expression in der Bürstensaummembran signifikant anstieg. Zusätzlich bewiesen weiterführende Versuche mit Tritium-markiertem Wasser, dass Scherstress und die Botenstoffe cGMP und cAMP nicht nur die luminale Expression von AQP1, sondern auch die zelluläre Aufnahme von Wasser kurzfristig signifikant steigerten. Hierbei ist jedoch einschränkend zu erwähnen, dass methodisch bedingt nicht nur die Tritium-Wasseraufnahme, sondern womöglich auch die zelluläre Aufnahme von radioaktiven Tritium-Spaltprodukten, wie z.B. Protonen, gemessen wurde. Die Aktivierung des Wassertransportes scheint dennoch eng mit der luminalen Expressionssteigerung von AQP1 verbunden zu sein. Entsprechend ist Scherstress, wie er bei erhöhten Flussraten im proximalen Tubulus Epithel auftritt (27, 73), aus physiologischer Sicht als möglicher Modulator für eine vermehrte tubuläre Wasserresorption zu diskutieren.

Die durch Scherstress verursachten Veränderungen der tubulären Resorptionsleistung beruhen auf einer Reihe unterschiedlicher Mechanismen, deren Analyse Gegenstand aktueller Studien ist. Guo *et al.* beschrieben im Jahr 2000 erstmals ein Modell, nachdem die Mikrovilli in der Bürstensaummembran der Tubuluszellen als Mechanosensoren agieren (73) und die intratubulären Flussraten registrieren. Anhand eines mathematischen Modells wurde vorgeschlagen, dass die Spannung, die durch den Strömungswiderstand an der Bürstensaummembran erzeugt wird, in das Zentrum der Mikrovilli übertragen und in das Zytoskelett weitergeleitet wird (73). Diese sogenannten hydrodynamischen Effekte würden zur Umorganisation der intrazellulären Strukturen führen (73, 74). Im Detail äußere sich dies hauptsächlich in einer Dichtezunahme der Aktinfilamente im Bereich des subapikalen Zellkompartimentes sowie in einer verstärkten interzellulären Adhärenz durch die vermehrte Ausbildung von Tight Junctions (74). Im Zusammenhang dieser Beobachtungen wurde postuliert, dass die nach luminal ausgerichtete Umstrukturierung der Aktinfilamente im Rahmen von erhöhtem Scherstress als Mediator für das von basolateral nach apikal stattfindende Trafficking von Transportern dient (54, 74). Gleichzeitig führe eine Störung des

Zytoskeletts, wie sie unter dem Einfluss von Cytochalasin D auftritt, zur Inhibition der Umorganisation der Aktinbündel (54). Eine über diese Erkenntnisse hinausgehende spezifische Signaltransduktionskaskade ist bisher nicht bekannt. In früheren Versuchen mit Epithelzellen des Verbindungstubulus konnte jedoch zusätzlich festgestellt werden, dass Scherstress über die Auslenkung der Primärzilien zu kurzfristigen intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhungen führt und Elektrolyttransporter durch einen solchen Mechanismus aktiviert werden (37, 58, 75). Unabhängig von der Tatsache, dass vergleichbare Daten für den proximalen Tubulus fehlen, wurde in dieser Arbeit eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels unter dem Einfluss von hohem Scherstress belegt, wenngleich die Untersuchungen methodisch bedingt keine genaue Darstellung der Kinetik der Kalziumveränderungen erlaubten. Inwieweit die Primärzilien im proximalen Tubulus für diesen Effekt verantwortlich sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die früher postulierte Aktivierung von Transportern im Epithel des Verbindungstubulus (37, 75), die Zilien-abhängig durch kurzfristige Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ausgelöst wird, könnte jedoch in analoger Weise auf die Regulation von AQP1 im proximalen Tubulus übertragen werden (37, 54, 58).

5.2.4 Regulation von AQP1 im Kontext der glomerulotubulären Balance

Die in Abhängigkeit von kurzfristigen Steigerungen der glomerulären Filtrationsrate auftretende Feinregulation der Salz- und Wasserresorption im proximalen Tubulus wurde durch Schnermann *et. al.* bereits 1968 mit dem Begriff der glomerulotubulären Balance beschrieben (26). Basierend auf der These, dass das intratubuläre Volumen per se stets abhängig von der glomerulären Filtrationsrate bzw. der Perfusion des jeweiligen Tubulus ist (26), wurden Untersuchungen durchgeführt, die eine Relation zwischen erhöhten Flussraten bzw. Scherstress und der Aktivierung von tubulären Transportprozessen *in vitro* herstellten (54, 73). Die Rolle von AQP1 war diesbezüglich bisher nicht beleuchtet worden, während die luminale Expressionssteigerung des Natriumtransporters NHE3 als wichtigster Einflussfaktor der glomerulotubulären Balance diskutiert wurde (26, 27, 54). Die Funktion von NHE3 wird jedoch auch maßgeblich durch das RAS beeinflusst (13, 29, 49), insofern existieren für die Steuerung der Elektrolytresorption im proximalen Tubulus verschiedene Determinanten, die perspektivisch auch die Aktivierung der Wasserresorption betreffen. Bisher wurde postuliert, dass AQP1 im Rahmen der Expressionssteigerung bzw. Aktivierung von

Elektrolyttransportern nur indirekt in seiner Expression reguliert wird (30). Für die Regulation der Wassertransportprozesse wurde die Notwendigkeit der isoosmotischen Salz- und Wasserresorption als treibende Kraft definiert (26, 30, 50, 73). Die an dieser Stelle erhobenen Resultate zeigten, dass AQP1 in seiner Expressionsmenge, zellulären Lokalisation und Funktion durchaus selbständig reguliert wird. Der auslösende Mechanismus hierfür ist vermutlich die Wirkung von Scherstress am proximalen Tubulusepithel.

6 Zusammenfassung

Abstrakt

Die Niere bewältigt eine Vielzahl epithelialer Transportvorgänge, zu denen sowohl Endozytoseschritte als auch der kanalgesteuerte Transport von Wasser, Ionen, Peptiden und weiteren Verbindungen gehören. Fehlleistungen in deren Funktionen spielen im proximalen Tubulus der Niere eine herausragende Rolle und können mit der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen zusammenhängen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei wesentlichen regulatorischen Leistungen hierzu: (1) mit der Funktion der Endozytose am Beispiel des lokalen Renin-Angiotensin Systems (RAS), und (2) mit der Kanalfunktion am Beispiel des Wasserkanals Aquaporin 1 (AQP1) in den Abschnitten des proximalen Tubulus.

Die Komponenten des RAS haben renale und systemische Ursprünge. Die Funktion einer eigenständigen, renalen Kaskade der RAS-Komponenten wird diskutiert. Hohe renale Spiegel des Effektorpeptids Angiotensin II sind bekannt. Eine Hypothese der Arbeit war, dass die Analyse der lokalen Verteilung von RAS-Komponenten, ihrer Biosynthese und ihrer zellulären Wege Aufschluss über die Rolle des lokalen RAS in der Niere geben kann. Im Fokus stand insbesondere der Dualismus zwischen Biosynthese und endozytotischer Aufnahme der Komponenten. Renin und Angiotensinogen fanden sich in den frühproximalen Abschnitten endosomal und lysosomal gespeichert. Für Angiotensinogen wurde der Nachweis, dass es aus dem Filtrat aufgenommen und lokal gespeichert wird, über Radioaktivmarkierung geführt. Für Renin war dieser Vorgang bereits belegt. Angiotensinogen wurde weiterhin als Ligand des Endozytoserezeptors Megalin definiert, der für seine frühproximale Endozytose essenziell ist. Die Biosynthese von Angiotensinogen wurde jedoch ortsversetzt, im sich an das frühproximale Konvolut anschließenden geraden Teil des proximalen Tubulus, nachgewiesen, so dass seine lokale Speicherung und Synthese offenbar nicht direkt zusammenhängen. Zusätzliche Information lieferte ein transgenes Rattenmodell, das über den endogenen Promoter Human-Angiotensinogen überexprimiert; auch hier wurde die (verstärkte) Human-Angiotensinogen-mRNA Expression nur spätproximal detektiert. Die lokale Reninsynthese der proximalen Epithelien war hingegen nicht nachweisbar. Ein Ansatz, in dem die Transzytose von Angiotensinogen quantifiziert wurde, zeigte, dass 5% des luminal angebotenen Angiotensinogens nach einer Stunde auf der interstitiellen Seite nachweisbar war. Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE)

fand sich in der Bürstensaummembran spätproximaler Abschnitte, während ACE2 im gesamten proximalen Nephron exprimiert war. Beide Enzyme unterschieden sich auch in ihrer Oberflächenexpression abhängig von der Endozytoseaktivität. Zusammengenommen haben diese Daten neues Detail zur Funktion des RAS belegt. Wichtige Informationen für die experimentelle Funktionsanalyse eines möglicherweise in der Niere eigenständig arbeitenden RAS stehen damit zur Verfügung.

In einer zweiten Hypothese zur regulatorischen Rolle proximal-tubulärer Parameter wurde die Funktion von AQP1 untersucht. Hintergrund ist die Leistung des proximal-tubulären Epithels, zur glomerulo-tubulären Balance (GTB) beizutragen. Im Abgleich zwischen glomerulärer Filtration und tubulärer Resorption sind hier Anpassungsvorgänge bekannt. Konkret wurde die Hypothese untersucht, ob eine Regelung von AQP1 bei unterschiedlichen tubulären Flussgeschwindigkeiten im Sinn der GTB beobachtet werden kann. An sich war bisher angenommen gewesen, dass AQP1 in der Bürstensaummembran konstitutiv exprimiert ist. Zuerst wurde hier gezeigt, dass die Oberflächenexpression von AQP1 endozytoseabhängig geregelt wird, indem bei Fortfall dieser Funktion eine starke Akkumulation von AQP1 in der Bürstensaummembran beobachtet wurde. In isolierten proximalen Tubuli der Mausniere und in Zellkultur wurden dann die Einflüsse veränderter Flussgeschwindigkeiten des Ultrafiltrates auf die AQP1 Expression modellhaft untersucht. Bei erhöhter Flussgeschwindigkeit des Filtrates konnte eine erhöhte AQP1-Oberflächenexpression sowie auch eine verstärkte Wasserpermeabilität des Epithels beobachtet werden. cGMP- und cAMP-Gabe hatten gleichsinnige Effekte. Diese Resultate gelten - soweit definiert - für den gesamten proximalen Tubulus und weisen darauf hin, dass regulatorische Prozesse den transepithelialen Wassertransport durch AQP1 im proximalen Tubulus im Sinn der GTB steuern können.

Beide Teile der Arbeit zeigen, zusammengenommen, neue regulatorische Aspekte der epithelialen Transportleistung des proximalen Tubulus. Im ersten Teil wird die Möglichkeit einer Steuerung durch das RAS im Sinn einer nach Abschnitten des Tubulus gestuften Aufteilung der Kaskade beschrieben. Im zweiten Teil wird anhand des Wasserkanals AQP1 gezeigt, wie eine geregelte Translokation des Kanals unter veränderten Flussbedingungen zur GTB beitragen kann. Schnittstellen beider Projektteile sind die zellulären Wege, ihre Strukturkorrelate, und spezifische Expressionsmuster des proximalen Tubulus, die diese Leistungen ermöglichen.

Abstract

Kidney function includes pivotal epithelial transport mechanisms, including endocytosis of glomerular filtered proteins and the retrieval of water and peptides from the ultrafiltrate. Impairment of proximal tubule endocytosis and transport capacity leads to severe constrictions of body fluid and electrolyte homeostasis, which serves as a pathogenic model for the development of cardiovascular disease.

In this present study, two major regulatory mechanisms are elucidated: (1) the role of endocytosis linked to the local renin angiotensin system (RAS), and (2) function of the water channel aquaporin 1 (AQP1) in the proximal tubule.

RAS components are of renal and systemic origin. The existence of a local renin angiotensin system of the kidney has been established, and high concentrations of luminal angiotensin II have been found in the proximal tubule. A central thesis of this study was to get further understanding of local RAS function by analysing the distribution, endocytosis, transcytosis and biosynthesis of relevant RAS components in the proximal tubule, focussed on the dualism between local synthesis and endocytotic uptake of the renin substrate angiotensinogen (AGT).

Storage of immunoreactive renin and AGT could be found in endosomal and lysosomal compartments, restricted to early proximal tubule sections (i.e. proximal convoluted tubule). Cellular uptake and intracellular storage of AGT was demonstrated by autoradiography of radiolabeled AGT and depended on intact endocytosis. Proximal tubule handling of renin largely followed the patterns of AGT, whereas its local biosynthesis was not significant, as it has been shown earlier. AGT was identified as a ligand of the multiple ligand-binding repeats of megalin, which is essential for its retrieval from the ultrafiltrate. In contrast to this, local AGT biosynthesis was restricted selectively to the latter parts of the proximal tubule (i.e. proximal straight tubule), indicating that local expression of AGT protein is derived from circulation and is not necessarily linked to local biosynthesis. Analysis of transgenic rats, overexpressing human AGT under the control of an endogenous promoter, also clearly demonstrated restriction of local AGT biosynthesis to the straight proximal tubule. Transcytotic transport of AGT in a proximal tubule cell line revealed a 5% recovery rate after 1h. Angiotensin-converting enzyme (ACE) was mainly expressed in brush border membranes (BBM) of late proximal tubule sections, whereas angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) was present along the entire segment of the proximal tubule. Both enzymes likely differed in cell surface expression due to the function and capacity of

endocytosis, as revealed here by a transgenic mouse model with a deficiency in megalin expression. These data on the localization and cellular processing of RAS components provide new aspects of the functional concept of a “self-contained” renal RAS.

In a second part of this study, proximal tubule handling of AQP1 was analyzed. With respect to glomerular filtration and tubular reabsorption capacity, proximal tubule function occurs in a dynamic manner, which is explained by the model of glomerulo-tubular balance (GTB) by Schnermann *et al.* In detail, luminal expression of AQP1 was investigated by the influence of fluid shear stress at increased tubular flow rates in proximal tubules. As a major finding AQP1 was shown to redistribute through the endosomal compartment with a more pronounced expression in the BBM of proximal tubule cells that harbour a compromised membrane protein trafficking machinery, displayed by megalin deficiency in a transgenic mouse model. In isolated perfused proximal tubuli of mice kidney, high tubular perfusion rates significantly increased luminal AQP1 expression. In a proximal tubule cell line (Opossum kidney cells), stably transfected with AQP1, luminal shear stress and the second messengers cGMP and cAMP also increased cell surface expression of AQP1 and augmented cellular uptake of radiolabeled water. These findings suggest the existence of regulatory pathways for AQP1 expression and AQP1 mediated water reabsorption linked to the GTB.

Both parts of this study display new regulatory aspects of proximal tubule function. The first part elucidates differential expression patterns of local RAS components according to (i) proximal tubule segments and (ii) the integrity of epithelial endocytosis. The second part illustrates that luminal translocation of AQP1, depending on fluid shear stress at increased tubular flow rates, contributes to GTB.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Theilig F, Kriz W, Jerichow T, et. al. Abrogation of protein uptake through megalin-deficient proximal tubules does not safeguard against tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jun;18(6):1824-34. Epub 2007 Apr 25.
- (2) Leheste JR, Melsen F, Wellner M, et. al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J* 17: 247–249, 2003
- (3) Kastner C, Pohl M, Sendeski M, et. al. Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Apr;296(4):F902-11. Epub 2009 Feb 4.
- (4) Theilig F, Bostanjoglo M, Pavenstädt H, et. al. Cellular distribution and function of soluble guanylyl cyclase in rat kidney and liver. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov;12(11):2209-20.
- (5) Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int*. 1993 Jun;43(6):1251-9.
- (6) Ganten D, Wagner J, Zeh K, et. al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7806-10.
- (7) Saito A, Sato H, Lino N, Takeda T. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:403272. Epub. Review.
- (8) El Marjou F, Janssen KP, Chang BH, et. al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 2004 Jul;39(3):186-93.
- (9) Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, et. al. RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J*. 1996 Jun 3;15(11):2632-9.

- (10) Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(4):1031-49.
- (11) Taugner R, Hackenthal E, Rix E, Nobiling R, Poulsen K. Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system: renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II, and converting enzyme in the kidneys of mice, rats, and tree shrews. *Kidney Int Suppl.* 1982 Aug;12:S33-43.
- (12) Taugner R, Hackenthal E, Inagami T, Nobiling R, Poulsen K. Vascular and tubular renin in the kidneys of mice. *Histochemistry.* 1982;75(4):473-84.
- (13) McDonough AA. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 Apr;298(4):R851-61. Epub 2010 Jan 27. Review.
- (14) Liang CT, Sacktor B. Preparation of renal cortex basal-lateral and brush border membranes. Localization of adenylate cyclase and guanylate cyclase activities. *Biochim Biophys Acta* 1977; 466(3):474-87.
- (15) Levine BS, Ho K, Kraut JA, Coburn JW, Kurokawa K. Effect of metabolic acidosis on phosphate transport by the brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1983; 727:7-12.
- (16) Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004 Sep;5 Suppl 1:S7-10. Review.
- (17) Ran J, Hirano T, Fukui T, et al. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* 2006; 55: 478–88.
- (18) Takai S, Jin D, Muramatsu M, Miyazaki M. Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 518–22.

- (19) Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822–8.
- (20) Ingelfinger JR. Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009 Jan;18(1):79-84. Review.
- (21) Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008 Sep;264(3):224-36. Review.
- (22) Briggs JP, Schnermann J. Macula densa control of renin secretion and glomerular vascular tone: evidence for common cellular mechanisms. *Ren Physiol*. 1986;9(4):193-203. Review.
- (23) Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008 Jun;86(6):615-21. Epub 2008 Apr 15. Review
- (24) Vallon V, Verkman AS, Schnermann J. Luminal hypotonicity in proximal tubules of aquaporin-1-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jun;278(6):F1030-3.
- (25) Wang T. Flow-activated transport events along the nephron. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Sep;15(5):530-6. Review.
- (26) Schnermann J, Wahl M, Liebau G, Fischbach H. Balance between tubular flow rate and net fluid reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney: I – Dependency of reabsorptive net fluid flux upon proximal tubular surface area at spontaneous variations of filtration rate. *Pflugers Arch* 1968; 304:90–103.
- (27) Du Z, Yan Q, Duan Y, Weinbaum S, Weinstein AM, Wang T. Axial flow modulates proximal tubule NHE3 and H-ATPase activities by changing microvillus bending moments. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Feb;290(2):F289-96.
- (28) Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:89-111. Review.

- (29) Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 Sep;10(5):655-9. Review.
- (30) Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol*. 1993 Jan;120(2):371-83.
- (31) Knotek M, Rogachev B, Ohara M, Schrier RW. Mechanisms of renal retention of sodium and water in heart failure, cirrhosis and pregnancy. *Lijec Vjesn* 2000;122(1-2):20-6.
- (32) Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, Navar LG. Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol*. 2004;143:117-30. Review.
- (33) Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Jul;18(5):208-14. Epub 2007 May 16. Review
- (34) Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007 Sep;59(3):251-87. Review
- (35) Braam B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol*. 1993 May;264(5 Pt 2):F891-8.
- (36) Guyton AC. Blood pressure control - special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991 Jun 28;252(5014):1813-6. Review.
- (37) Weinbaum S, Duan Y, Satlin LM, Wang T, Weinstein AM. Mechanotransduction in the renal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Dec;299(6):F1220-36. Review.
- (38) Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, et. al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*. 1999 Dec;34(6):1265-74.
- (39) Hackenthal E, Metz R, Bührle CP, Taugner R. Intrarenal and intracellular distribution of renin and angiotensin. *Kidney Int Suppl*. 1987 May;20:S4-17. Review.

- (40) Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. *Kidney Int.* 2002 Feb;61(2):579-85.
- (41) Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y, et. al. Young Scholars Award Lecture: Intratubular angiotensinogen in hypertension and kidney diseases. *Am J Hypertens.* 2006 May;19(5):541-50.
- (42) Tank JE, Henrich WL, Moe OW. Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 2):F892-8.
- (43) Quan A, Baum M. Regulation of proximal tubule transport by endogenously produced angiotensin II. *Nephron.* 2000 Feb;84(2):103-10. Review.
- (44) Burns KD. The emerging role of angiotensin-converting enzyme-2 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Mar;16(2):116-21. Review.
- (45) Bachmann S, Schlichting U, Geist B, et. al. Kidney-specific inactivation of the megalin gene impairs trafficking of renal inorganic sodium phosphate cotransporter (NaPi-IIa). *J Am Soc Nephrol.* 2004 Apr;15(4):892-900.
- (46) Bacic D, Lahir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA. The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(3):495-503.
- (47) Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Dec;295(6):F1589-600.
- (48) Li Y, Cong R, Biemesderfer D. The COOH terminus of megalin regulates gene expression in opossum kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Aug;295(2):C529-37.
- (49) Riquier-Brison AD, Leong PK, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA. Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Jan;298(1):F177-86.

- (50) Agre P, Homer W, Smith award lecture. Aquaporin water channels in kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Apr;11(4):764-77. Review.
- (51) Schnermann J, Chou CL, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9660-4.
- (52) Leitch V, Agre P, King LS. Altered ubiquitination and stability of aquaporin-1 in hypertonic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2894-8.
- (53) Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Apr;3(4):256-66. Review.
- (54) Duan Y, Weinstein AM, Weinbaum S, Wang T. Shear stress-induced changes of membrane transporter localization and expression in mouse proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21860-5.
- (55) Gonzalez-Villalobos R, Klassen RB, Allen PL, Navar LG, Hammond TG. Megalin binds and internalizes angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Feb;288(2):F420-7. Epub 2004 Oct 5.
- (56) Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 1982; 647(2):169-76.
- (57) Kempson SA, Helmle C, Murer H. Endocytosis and phosphate transport in OK epithelial cells. *Ren Physiol Biochem*. 1989 Sep-Dec;12(5-6):359-64.
- (58) Jensen ME, Odgaard E, Christensen MH, Praetorius HA, Leipziger J. Flow-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase depends on nucleotide release and subsequent purinergic signaling in the intact nephron. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jul;18(7):2062-70.
- (59) Mehrotra M, Saegusa M, Wadhwa S, Voznesensky O, Peterson D, Pilbeam C. Fluid flow induces Rankl expression in primary murine calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1271-83.

- (60) Pohl M, Kaminski H, Castrop H, et. al. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41935-46.
- (61) Christensen EI, Birn H, Rippe B, Maunsbach AB. Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts! *Kidney Int*. 2007 Nov;72(10):1192-4.
- (62) Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J, et. al. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res*. 1983;233(2):439-51.
- (63) Bohlender J, Ménard J, Wagner J, Luft FC, Ganten D. Human renin-dependent hypertension in rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension*. 1996 Mar;27(3):535-40.
- (64) Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, et. al. RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int*. 2006 Mar;69(6):1016-23.
- (65) Park S, Bivona BJ, Kobori H, et. al. Major role for ACE-independent intrarenal ANG II formation in type II diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan;298(1):F37-48.
- (66) Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008 May;4(4):510-2.
- (67) Darby IA, Congiu M, Fernley RT, Sernia C, Coghlan JP. Cellular and ultrastructural location of angiotensinogen in rat and sheep kidney. *Kidney Int*. 1994 Dec;46(6):1557-60.
- (68) Akhter S, Kovbasnjuk O, Li X, et. al. Na(+)/H(+) exchanger 3 is in large complexes in the center of the apical surface of proximal tubule-derived OK cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Sep;283(3):C927-40.

- (69) Yanagawa N, Capparelli AW, Jo OD, Friedal A, Barrett JD, Eggena P. Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. *Kidney Int.* 1991 May;39(5):938-41.
- (70) Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, et. al. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Apr;10(4):685-95.
- (71) Gociman B, Rohrwasser A, Lantelme P, et. al. Expression of angiotensinogen in proximal tubule as a function of glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2004 Jun;65(6):2153-60.
- (72) Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch.* 2009 Oct;458(6):1039-48. Review.
- (73) Guo P, Weinstein AM, Weinbaum S. A hydrodynamic mechanosensory hypothesis for brush border microvilli. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Oct;279(4):F698-712.
- (74) Duan Y, Gotoh N, Yan Q, et. al. Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 12;105(32):11418-23
- (75) Liu W, Murcia NS, Duan Y, et. al. Mechanoregulation of intracellular Ca²⁺ concentration is attenuated in collecting duct of monocilium-impaired orpk mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Nov;289(5):F978-88.
- (76) Gadau J, Peters H, Kastner C, et. al. Mechanisms of tubular volume retention in immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2009 Apr;75(7):699-710
- (77) Fernández-Llama P, Andrews P, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper M. Concentrating defect in experimental nephrotic syndrome: altered expression of aquaporins and thick ascending limb Na⁺ transporters. *Kidney Int.* 1998 Jul;54(1):170-9
- (78) Warner FJ, Lew RA, Smith AI, Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39353-62.

- (79) Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1993;21:827–835.
- (80) Moe OW, Ujjie K, Star RA, et. al. Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest.* 1993 Mar;91(3):774-9.
- (81) Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 2002 Feb;39(2 Pt 2):316-22. Review.
- (82) Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):1067-116. Review.
- (83) Reid IA. The renin-angiotensin system and body function. *Arch Intern Med.* 1985 Aug;145(8):1475-9. Review.
- (84) Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension.* 1996 Mar;27(3 Pt 2):465-75. Review.
- (85) Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Ann Rev Physiol* 1978;40:377-410.
- (86) Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, Penninger JM. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Nov;61(21):2714-9. Review.
- (87) Ganten D, Wagner J, Zeh K, et. al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 15;89(16):7806-10.
- (88) D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 2003 Mar;63(3):809-25. Review.
- (89) Klinker R, et al. *Physiologie* (ISBN 9783137960065). 2010 Georg Thieme Verlag KG.

(90) Stoessel A, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan;298(1):F216-23.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Marcus Pohl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Regulation von Komponenten des Renin-Angiotensin Systems und des Wasserkanals Aquaporin 1 im proximalen Tubulus der Niere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Marcus Pohl hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Kastner C, Pohl M, Sendeski M, Stange G, Wagner CA, Jensen B, Patzak A, Bachmann S, Theilig F. Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Apr;296(4):F902-11. Epub 2009 Feb 4.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung von Tierexperimenten, wissenschaftliche Auswertung von Gewebetypisierungen, Erstellung und wissenschaftliche Bewertung von immun- und durchlichtmikroskopischem Bildmaterial, inhaltlicher Beitrag zur Erstellung des Manuskriptes.

Publikation 2: Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. J Biol Chem. 2010 Dec 31;285(53):41935-46.

Beitrag im Einzelnen:

Vollständige Herleitung der wissenschaftlichen Fragestellungen, Konzipierung der Versuchsaufbauten und Durchführung sowie Auswertung sämtlicher (mit Ausnahme der gesondert aufgeführten Leistungen von Kooperationspartnern) Experimente. Erstellung des Manuskriptes mit Hilfe von Prof. Dr. Bachmann und Prof. Dr. Theilig.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Curriculum vitae

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

Publikationen

2009

- 1) Kastner C, Pohl M, Sendeski M, Stange G, Wagner CA, Jensen B, Patzak A, Bachmann S, Theilig F: Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental glomerulonephritis. (Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Apr;296(4):F902-11. Epub 2009 Feb 4.)

2010

- 2) Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F.: Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. (J Biol Chem. 2010 Dec 31;285(53):41935-46. Epub 2010 Oct 21.)

Kongressbeiträge (Freie Vorträge)

2007

- 1) Pohl M, Harteneck C, Bachmann S, Theilig F: The role of TRPM3A in endocytosis. 1st Symposium of the DFG-Research Unit FOR 667 - Epithelial Mechanisms in Renal Volume Regulation, Egisdorf

2008

- 2) Pohl M, Bader M, Willnow T, Hoffmann S, Gretz N, Harrison-Bernard L, Bachmann S, Theilig F: Localization and processing of the components of the renin angiotensin system (RAS) in renal epithelia. 102. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Innsbruck, Österreich
- 3) Pohl M, Petsch T, Rickheit G, Jentsch T, Willnow T, Bachmann S, Theilig F: Trafficking von AQP1 im proximalen Tubulus. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen
- 4) Pohl M, Petsch T, Rickheit G, Jentsch T, Willnow T, Bachmann S, Theilig F: Trafficking of AQP1 in proximal tubule brush border membrane (BBM). Renal Week 2008, The American Society of Nephrology, Philadelphia, U.S.A.

Kongressbeiträge (Poster)

2008

- 1) Pohl M, Bader M, Willnow T, Hoffmann S, Gretz N, Harrison-Bernard L, Bachmann S, Theilig F: Lokalisation und Aufarbeitung von Komponenten des Renin Angiotensin Systems (RAS) in Nierenepithelien. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen

- 2) Pohl M, T. Willnow, S. Bachmann, F. Theilig: Localization and processing of the components of the renin angiotensin system (RAS) in renal epithelia. Renal Week 2008, The American Society of Nephrology, Philadelphia, U.S.A.

2009

- 3) Kaminski H J, Pohl M, Peters H, Bachmann S, Theilig F: Renale Aktivierung des Insulin- und IGF1 Rezeptorsignalweges bei proteinurischen Erkrankungen. 40. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Sebastian Bachmann und Prof. Dr. Franziska Theilig für die Unterstützung während meiner Forschungsarbeiten sowie für die freundliche Überlassung des Themas bedanken. Weiterhin danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe bei der Lösung zahlreicher Probleme (in alphabetischer Reihenfolge) Alexandra Böhlick, Frauke Grams, John Horn, Thomas Kahl, Henriette Kaminski, Christian Kastner, Jörg Mengwasser, Kerim Mutig, Alexander Paliege, Kerstin Riskowsky, Elisabeth Schreiner und Adelina Stößel.