

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PROF. DR. ARMIN KURTZ

**Die Koregulation von Renin und LIMP-2 in JG-Zellen:
Evidenz für den lysosomalen Charakter von Reninvesikeln.**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Theodor Carlo Schmid
Aus Bayreuth

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PROF. DR. ARMIN KURTZ

**Die Koregulation von Renin und LIMP-2 in JG-Zellen:
Evidenz für den lysosomalen Charakter von Reninvesikeln.**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Theodor Carlo Schmid
Aus Bayreuth

2013

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. dent. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Schweda

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dierk Endemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2014

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung.....	8
1.1 Renin.....	8
1.1.1 Die physiologische Bedeutung von Renin	8
1.1.2 Das Renin-Gen.....	8
1.1.3 Die Bildung und Freisetzung von Renin	9
1.1.4 Die Zellrekrutierung unter Reninstimulation	13
1.1.5 Die lokale und die systemische Kontrolle der Reninfreisetzung.....	14
1.1.6 Die Kontrolle der Reninfreisetzung: Intrazelluläre Signalvermittler.....	17
1.1.7 Der Renin- /Proreninrezeptor	19
1.2 LIMP-2.....	20
1.2.1 Das LIMP-2 Protein.....	20
1.2.2 Zusammenführung von Renin und LIMP-2	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Immunologische Experimente	26
2.2.1.1 Messung der Reninkonzentration in Plasma und Nierengewebe	26
2.2.1.2 Proreninaktivierung durch Trypsin	27
2.2.1.3 Fluoreszenzmikroskopischer LIMP-2 Nachweis in der Niere.....	27
2.2.2 Experimente an Mäusen	28
2.2.2.1 Blutplasmagewinnung zur Bestimmung der Plasmapreninkonzentration	28
2.2.2.2 Nierenentnahme	28
2.2.2.3 Aufbereitung des Nierengewebes zur Bestimmung der renalen Reninaktivität	28
2.2.2.4 Nichtinvasive Blutdruckmessung.....	29
2.2.2.5 Uringewinnung	29
2.2.3 RNA-Isolierung aus Nierengewebe	30
2.2.4 Bestimmung der mRNA Expression von LIMP-2 und Renin im Nierengewebe.....	30
2.2.5 Flammenphotometrische Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentration.....	31
2.2.6 Statistik	32

3. Ergebnisse	33
3.1 Immunhistochemische Experimente	33
3.1.1 Lokalisierung von LIMP-2 in JG-Zellen	34
3.1.2 Lokalisierung von LIMP-2 in Nephron und renalem Gefäßsystem	36
3.1.3 Stimulierung der Reninsynthese <i>in vivo</i> durch Niedrigsalzdiät und ACE-Hemmung sowie durch Nierenarterienstenose	42
3.1.4 Immunhistochemischer Vergleich der Stimulierbarkeit des Reninsystems bei LIMP-2 KO und LIMP-2 WT Mäusen	46
3.1.5 Zusammenfassung	48
3.2 <i>In Vivo</i> Experimente	49
3.2.1 Die Reninsynthese und -sekretion unter Kontrollbedingungen	49
3.2.2 Stimulierung der Reninsynthese und –sekretion durch Isoproterenol	51
3.2.3 Stimulierung der Reninsynthese und –sekretion durch Niedrigsalzdiät	53
3.2.4 Stimulierung der Reninsynthese und –sekretion durch Niedrigsalzdiät und ACE-Hemmung	55
3.2.5 Zusammenfassung	58
3.2.6 Bestimmung der Proreninkonzentration im Nierengewebe und im Plasma bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen	58
3.2.7 Nichtinvasive Blutdruckmessung bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen	60
3.2.8 Urinuntersuchung bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen	61
3.3. <i>In Vitro</i> Experimente	64
3.3.1 Bestimmung der Reninfreisetzung mittels ipN	64
3.4 Elektronenmikroskopischer Vergleich von JG-Zellen bei LIMP-2 WT und KO Mäusen	66
4. Diskussion	68
5. Kurzfassung der Arbeit	73
6. Literaturverzeichnis	75
7. Anhang	85
7.1 Abkürzungsverzeichnis	85
7.2 Immunhistochemische Abbildungen	87
7.3 Verwendete Materialien	91
7.4 Versuchsprotokolle	93
7.5 Danksagung	97
7.6 Lebenslauf	98
7.7 Erklärung	99

1. Einleitung

1.1 Renin

1.1.1 Die physiologische Bedeutung von Renin

Renin ist eine essenzielle Komponente der physiologischen Blutdruckregulation (siehe Abb. 1.1). Als Enzym setzt es die Kaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) in Gang, indem es das Dekapeptid Angiotensin I (AngI) von seinem Vorläufer Angiotensinogen abspaltet. Angiotensinogen selbst besteht aus 452 Aminosäuren und wird in der Leber gebildet. AngI wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) schließlich in das Oktapeptid Angiotensin II (AngII) umgewandelt. AngII ist der Haupteffektor des RAAS. Über seine Bindung an AT1-Rezeptoren bewirkt es eine starke Vasokonstriktion, fördert die renale Salzreabsorption, die Freisetzung von Katecholaminen und Aldosteron, und es löst gesteigerten Durst und Salzhunger aus. Somit reguliert das RAAS zum Einen den Blutdruck, zum Anderen den Salz- und Wasserhaushalt von Säugetieren (Schweda und Kurtz 2009).

1.1.2 Das Renin-Gen

Im Menschen existiert nur ein Reninogen (Ren-1) auf Chromosom 1 und es besteht eine starke Strukturhomologie zu diversen anderen Säugetier-Spezies. Einige Mauslinien besitzen neben Ren-1 ein zweites Reninogen (Ren-2) (Field und Gross 1985; Abel und Gross 1988), wobei beim Ren-1 Gen die größere Homologie zwischen Mensch und Maus besteht (Fukamizu, Nishi et al. 1988; Ekker, Tronik et al. 1989). Mäuse mit Ren-1 und Ren-2 haben weder Blutdruckunterschiede (Bing und Poulsen 1979; Meneton, Ichikawa et al. 2000), noch eine höhere Plasmareninkonzentration (PRC) (Hansen, Yang et al. 2004) im Vergleich zu Mäusen, die lediglich das Ren-1 besitzen. Die Funktion von Ren-2 ist bisher weitgehend ungeklärt, bekannt ist bislang nur, dass bei einigen Mauslinien *Ren-2* auch in submandibulären Speicheldrüsen

exprimiert wird und dort geringe Mengen Renin, bzw. Prorenin produziert werden (Dickinson, Gross et al. 1984; Field, McGowan et al. 1984; Abel und Gross 1988).

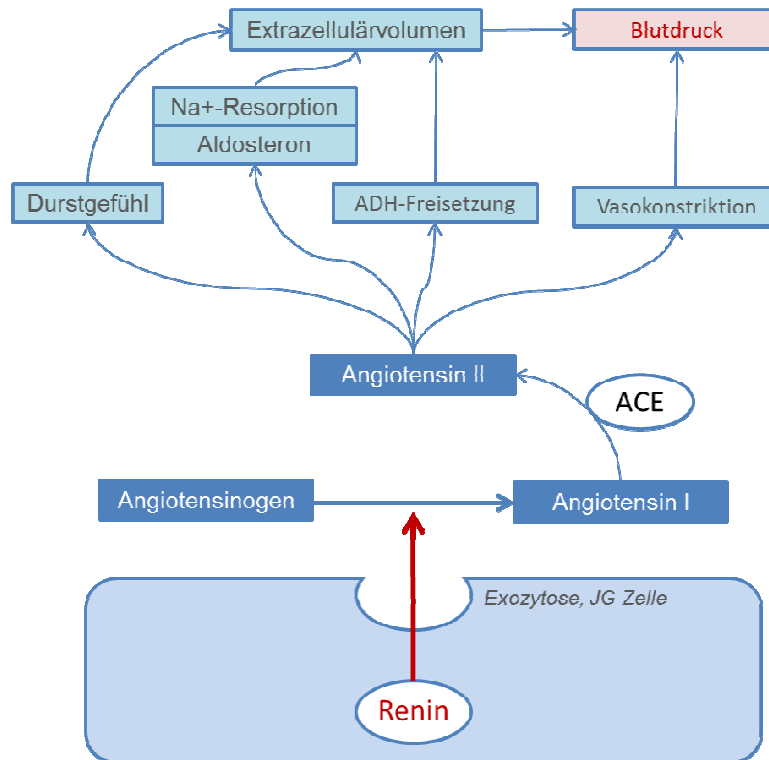


Abb. 1.1 Übersicht über das RAAS mit seinen Komponenten und seine Auswirkungen im Salz- und Wasserhaushalt.

1.1.3 Die Bildung und Freisetzung von Renin

Renin wird überwiegend in den juxtaglomerulären (JG) Zellen in den Nieren gebildet (siehe Abb. 1.2). Diese epitheloiden Zellen liegen in der Mediaschicht der glomerulären Aa. Afferentes. Die Reninfreisetzung durch die JG-Zellen wird von den Zellen der Macula Densa (MD) beeinflusst. Als MD wird ein Wandabschnitt des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife bezeichnet, der zusammen mit den JG-Zellen den juxtaglomerulären Apparat (JGA) bildet.

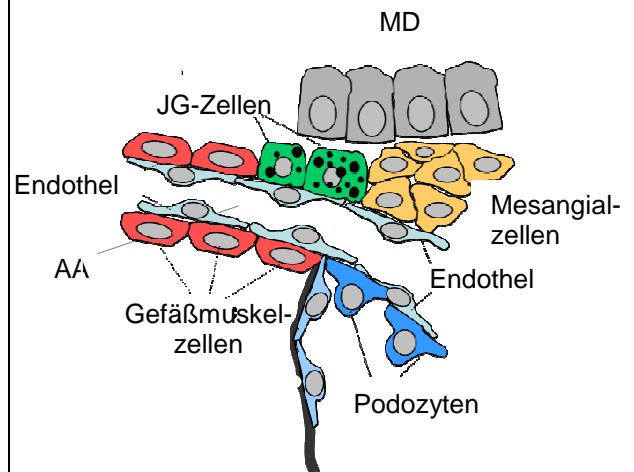
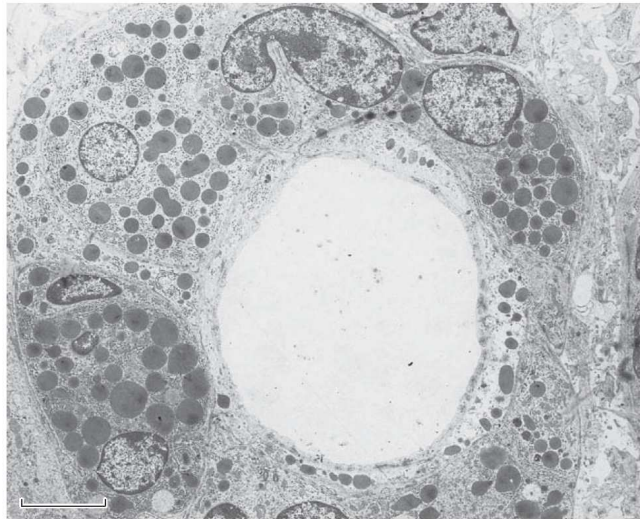


Abb. 1.2 (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine afferente Arteriole. Zu sehen sind dicht mit reninhaltigen sekretorischen Vesikeln (*dense-core* Vesikel) gefüllte JG-Zellen. Der gezeigte Maßstab ist 2,5 μm lang. Aus Schweda, Friis et al. 2007

(b) Schematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates. Am Gefäßpol ist die afferente Arteriole (AA) mit reninhaltigen Granulen in JG-Zellen dargestellt. Diese Epitheloidzellen sind Bestandteil der Gefäßwand und von sympathischen Nervenfasern innerviert. Als Teil der aufsteigenden Henle-Schleife liegt zwischen den zu- und abführenden Gefäßen zentral die Macula Densa (MD), welche zusammen mit den JG-Zellen den JGA bildet. Modifiziert nach Schweda.

Die MD fungiert als Chemosensor und misst die Salzkonzentration im Tubulussystem des Nephrons. NaCl wird über den NKCC2-Transporter in die MD-Zellen transportiert, wobei die Cl-Konzentration ausschlaggebend für die Renin-Regulation ist (Lorenz, Weihrecht et al. 1991).

Der MD-vermittelte Einfluss auf die Reninfreisetzung hat eine lokale und eine systemische Wirkungskomponente: Bei einer hohen Cl-Konzentration im Tubulussystem wird lokal die Blutzufuhr zum Glomerulus über die Aa. Afferentes vermindert und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) erniedrigt (tubulo-glomerulärer Feedback) (Thurau und Schnermann 1965; Schnermann und Levine 2003; Castrop 2007). Systemisch kommt es zu einer Verminderung der Reninfreisetzung aus den JG-Zellen in den Blutkreislauf (Kirchner, Kotchen et al. 1978; Gerber, Branch et al. 1979; Lorenz, Kotchen et al. 1990; Kim, Mizel et al. 2006). Umgekehrt setzen JG-Zellen bei einer

geringen Cl-Konzentration vermehrt Renin in die Blutbahn frei (Skott und Briggs 1987; Schweda und Kurtz 2009). Die JG-Zellen kommunizieren also direkt mit dem Tubulus- und dem Gefäßsystem, und beide beeinflussen über lokale Steuermechanismen die Reninfreisetzung (siehe unten).

Innerhalb der Niere wird Renin auch im proximalen Tubulus, im Verbindungstubulus und im Sammelrohr synthetisiert, wobei hier eher ein lokaler AngII-vermittelter Einfluss auf die Salzreabsorption und die Zellproliferation angenommen wird (Taugner, Poulsen et al. 1979; Taugner, Hackenthal et al. 1982; Kobori, Nangaku et al. 2007). Neben der Niere existieren im Körper noch weitere Stellen, an denen Renin in weit aus geringeren Konzentrationen gebildet und freigesetzt wird. Die Reninwirkung an diesen Orten hat vermutlich einen parakrinen Charakter und ist lokal auf das jeweilige Gewebe begrenzt (Hackenthal, Paul et al. 1990).

Renin wird aus seinem Vorläufer Präprorenin gebildet. Präprorenin ist ein sekretorisches Protein. Es wird mithilfe der entsprechenden mRNA an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) von JG-Zellen synthetisiert und in das Lumen des ER sezerniert. Die Prosequenz wird kotranslational durch die Signalpeptidase abgespalten und so Prorenin gebildet (siehe Abb. 1.3). Prorenin ist enzymatisch inaktiv und wird weiter in den Golgiapparat transportiert, den es über zwei alternative Sekretionswege verlassen kann. Beim Menschen werden 75 % des Prorenins direkt über den *kontinuierlichen* Weg freigesetzt, 25% hingegen in sog. *dense core* Vesikel verpackt und dann über den *regulierten* Weg freigesetzt (Pratt, Carleton et al. 1987). Während der Reifung dieser *dense core* Vesikel entsteht in ihnen aktives Renin, vermutlich durch Proteolyse mittels Cathepsin B, das neben Prorenin in diesen Vesikeln enthalten ist (Taugner und Hackenthal 1988; Matsuba, Watanabe et al. 1989; Mercure, Jutras et al. 1996; Neves, Duncan et al. 1996).

Der niedrige pH-Wert in den *dense core* Vesikeln erlaubt Cathepsin B eine optimale Aktivität. Damit steht am Ende des regulierten Sekretionsweges die Freisetzung von Renin.

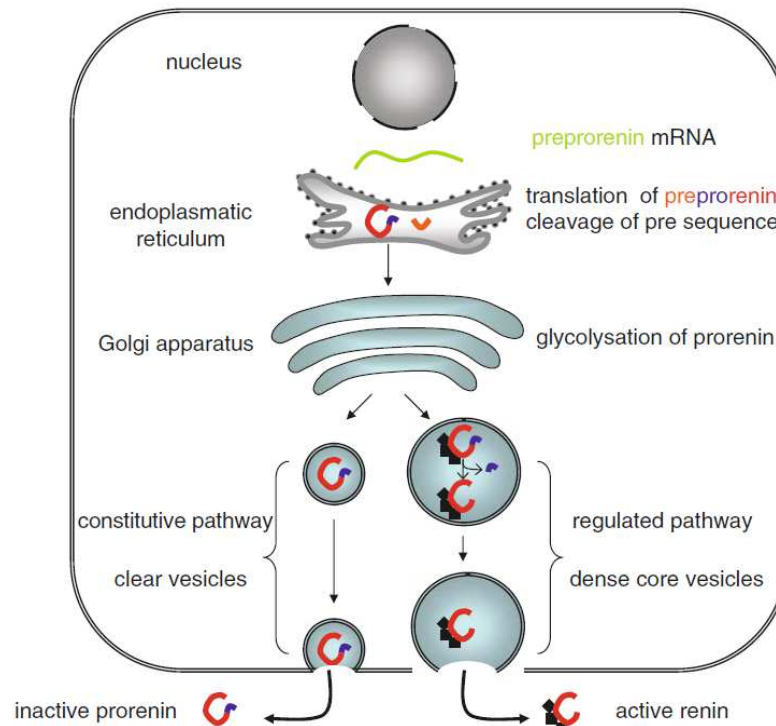


Abb. 1.3 Schema der Biosynthese, des Transports und der Reifung von Renin. Prorenin kann im Golgiapparat glykosyliert werden. Glykosyliertes Prorenin verlässt die JG-Zelle nun über den regulierten Sekretionsweg, wobei Prorenin innerhalb der Sekretionsvesikel (*dense-core* Vesikel) seine Prosequenz verliert und zu Renin wird. Nicht glykosyliertes Prorenin wird konstitutiv sezerniert und bleibt als Zymogen inaktiv, bis es seine Prosequenz verliert. Weitere Erläuterungen siehe Text. Aus Schweda und Kurtz 2009.

Welchen Sekretionsweg Prorenin einschlägt -konstitutiv oder reguliert- hängt entscheidend von seiner Glykosylierung mit Mannose-6-Phosphat-Resten im Golgiapparat ab. Das vom Gen Ren-1 kodierte Prorenin besitzt dafür drei geeignete Glykosylierungsstellen, während das von Ren-2 kodierte Prorenin keine Glykosylierungsstellen aufweist: Mäuse mit inaktiviertem Ren-1 Gen bilden daher keine *dense core* Vesikel aus (Clark, Sharp et al. 1997).

Die basale Plasmareninkonzentration beträgt beim Menschen ca. 1 pmol/l, wobei die Proreninkonzentration im Vergleich dazu etwa zehnfach höher ist (Campbell 2008) und etwa 80-90% des Gesamtrenins ausmacht (Stankovic, Fisher et al. 2006). Die kontinuierliche Freisetzung von Prorenin wird durch die Syntheserate der Renin mRNA bestimmt und unterliegt einer längerfristigen Regulation durch chronische Stimulation. Der regulierte Weg wird ebenso durch dauerhafte Stimulation mitbeein-

flusst, unterliegt jedoch auch dem Einfluss einer akuten Reninstimulation (Toffelmire, Slater et al. 1989).

Renin-bildende Zellen sind vollgepackt mit Sekretionsvesikeln. Von Peti-Peterdi et al. konnte mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie nach akuter Stimulation *in vitro* ein schlagartiges Verschwinden von Vesikeln beobachtet werden (Peti-Peterdi, Fintha et al. 2004). Kapazitätsmessungen an der Zellmembran von JG-Zellen lieferten Hinweise darauf, dass die Vesikel durch Exozytose freigesetzt worden waren (Friis, Jensen et al. 1999).

1.1.4 Die Zellrekrutierung unter Reninstimulation

Unter chronischer Stimulation bleiben die Anzahl und das Durchschnittsvolumen der *dense core* Vesikel konstant ($5\mu\text{m}^3$). Eine chronische Stimulation wie bei Salzangel oder bei renaler Minderdurchblutung führt nicht zu einer Erhöhung der Vesikelzahl in einer Renin bildenden JG-Zelle, sondern stattdessen zur Rekrutierung neuer Renin bildender Zellen (Skott 1986; Rasch, Jensen et al. 1998). Rekrutierung bedeutet in diesem Fall, dass Nicht-JG-Zellen kurzfristig in die Lage versetzt werden, Renin zu bilden und freizusetzen, obwohl sie dazu normalerweise nicht in der Lage sind. Dieser Vorgang ist reversibel. Diese rekrutierten Zellen sind Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und liegen außerhalb des JGA in der Gefäßwand der glomerulären Aa. Afferentes. Die zellulären Mechanismen, die ihnen die Fähigkeit zur Reninbildung und Reninfreisetzung verleihen, sind weitgehend ungeklärt. Cantin et al. beschreiben dies als eine „metaplastische Transformation“ (Cantin, Araujo-Nascimento et al. 1977). Es ist weiterhin bekannt, dass nicht alle Zellen des renalen Gefäßsystems zur Reninfreisetzung herangezogen werden können; vermutlich müssen sie dazu genetisch determiniert sein (Sequeira Lopez, Pentz et al. 2004).

Im metanephrischen Blastem embryonaler Nieren ist Renin bereits sehr früh, schon vor der Entstehung eines Gefäßsystems nachweisbar. Es ist daher naheliegend, dass Renin bildende Zellen auch renalen Ursprungs sind. Mit einsetzender Vaskularisierung der Niere (etwa am Tag 15) gruppieren sich Renin bildende Zellen

zunächst um die größeren Arterien. Mit fortschreitender Entwicklung wandern diese Zellen hin zu Arteriolen und schließlich zu ihrer typischen juxtaglomerulären Position (Castrop, Höcherl et al. 2010).

1.1.5 Die lokale und die systemische Kontrolle der Reninfreisetzung

Renin spielt innerhalb des RAAS die wichtigste Rolle für die Kontrolle des Blutdrucks und für die Salz- und Wasserhomöostase. Systemisch wird die Reninfreisetzung durch den Blutdruck und die Salzaufnahme über einen negativen *feed back* Mechanismus reguliert. Der Sympathikus sowie eine Reihe lokaler und systemischer Mediatoren beeinflussen die Reninfreisetzung zusätzlich. Grundsätzlich wird zwischen einer lokalen und einer systemischen Kontrolle der Reninfreisetzung unterschieden.

Lokale Mediatoren. Die JG-Zellen stehen einerseits lokal unter der Kontrolle des Tubulussystems und des MD-Mechanismus, andererseits werden sie von der vasculären Seite durch die Endothelzellen und durch Zellen der glatten Muskulatur beeinflusst.

Die zentralen Vermittler für beide Regulationsmechanismen sind NO, Prostaglandine (Stimulation der Reninfreisetzung) und Adenosin (Inhibition der Reninfreisetzung).

Alle drei Autakoide werden renal sowohl in der MD als auch in den Endothelzellen der Aa. Afferentes gebildet, wobei die JG-Zellen selbst dazu nicht befähigt sind.

NO wird sowohl im Gefäßsystem durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) als auch in der MD (nNOS) gebildet (Mundel, Bachmann et al. 1992; Wilcox, Welch et al. 1992) und wirkt stimulierend auf die Reninfreisetzung aus den benachbarten JG-Zellen.

Adenosin entsteht auf tubulärer Seite aus der Dephosphorylierung von ATP, das in den MD-Zellen als Reaktion auf eine erhöhte Salzkonzentration in der Henle-Schleife gebildet wird. Es bewirkt an den glatten Muskelzellen der Aa. Afferentes eine Vaso-
konstriktion und somit einen Abfall in der GFR (Brown, Ollerstam et al. 2001; Sun, Samuelson et al. 2001; Bell, Lapointe et al. 2003; Castrop, Huang et al. 2004;

Komlosi, Peti-Peterdi et al. 2004; Oppermann, Friedman et al. 2008). An den JG-Zellen hemmt es dosisabhängig die Reninfreisetzung (Churchill und Churchill 1985; Kurtz, Della Bruna et al. 1988).

Adenosin wird aber auch auf vaskulärer Seite in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Arteriolen gebildet (Bodin und Burnstock 2001) und spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Reninfreisetzung in Abhängigkeit des renalen Perfusionsdruckes (Schweda, Segerer et al. 2005). Gleichzeitig führt Adenosin zu einer druckabhängigen Vasokonstriktion und somit schafft sich die Niere eine vom aortalen Blutdruck weitgehend unabhängige konstante Durchblutung (Autoregulation von 80-180 mmHg) (Inscho, Cook et al. 1996; Majid, Inscho et al. 1999; Inscho 2001).

Das Prostaglandin E₂ (**PGE₂**) wird von den MD-Zellen gebildet und fördert die Reninfreisetzung (Campean, Theilig et al. 2003). Eine erniedrigte Salzkonzentration an der MD führt zur Freisetzung von PGE₂. Über diesen Mechanismus kann die Niere auch akute Schwankungen der Salzkonzentration durch vermehrte Reninfreisetzung kompensieren (Peti-Peterdi, Komlosi et al. 2003). In den renalen Gefäßen wird v.a. Prostazyklin gebildet, das bei Hypoperfusion (bspw. Nierenarterienstenose) zu einer Stimulation der Reninfreisetzung führen kann (Castrop, Höcherl et al. 2010).

Systemische Kontrollmechanismen. Gemäß dem Prinzip der negativen Rückkopplung reduziert ein **arterieller Blutdruckanstieg** die Reninfreisetzung und umgekehrt (Wagner und Kurtz 1998). Neben dem zuvor erwähnten Steuermechanismus der Reninfreisetzung durch die MD existiert *intrarenal* noch ein Barorezeptormechanismus zur Regulation der Reninfreisetzung, der abhängig vom renalen Perfusionsdruck ist (Castrop, Höcherl et al. 2010). Die Reninfreisetzung wird durch NO und Prostaglandin bei erniedrigtem Perfusionsdruck stimuliert und in Gegenwart von Adenosin bei erhöhtem Perfusionsdruck gehemmt. Die molekulare Basis des Barorezeptormechanismus ist unbekannt.

Bei der extrarenalen blutdruckabhängigen Kontrolle der Reninfreisetzung spielt der **Sympathikus** eine entscheidende Rolle. Renale JG-Zellen und Zellen der glatten

Gefäßmuskulatur sind ebenso wie das Tubulussystem der Niere stark sympathisch innerviert (Barajas, Liu et al. 1992). Erregt werden diese sympathischen Leitungsbahnen v.a. durch Druckrezeptoren im Karotissinus und im Aortenbogen. Ein Druckabfall an diesen Rezeptoren bewirkt dort eine verstärkte Rezeptorentladungsaktivität und führt in der Niere zu gesteigerter Reninfreisetzung und gleichzeitig zu verminderter renaler Durchblutung und GFR (DiBona 2000). JG-Zellen besitzen zahlreiche β -adrenerge Rezeptoren in ihrer Zellmembran (Churchill, Churchill et al. 1983; Boivin, Jahns et al. 2001). Eine erhöhte Sympathikusaktivität führt zu einer verstärkten Ausschüttung von Katecholaminen. Die physiologischerweise im Körper vorkommenden Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin bewirken über ihre Bindung an β 1-Rezeptoren auf JG-Zellen eine cAMP-vermittelte Steigerung der Reninfreisetzung und -synthese. Dies bewirkt eine Blutdruckerhöhung bei vermehrter sympathischer Aktivität, bspw. unter Stressbedingungen und macht den katecholaminvermittelten Sympathikuseinfluss zu einem potenten Faktor für die Reninfreisetzung.

Schließlich beeinflussen neben den Katecholaminen noch andere systemische Mediatoren die Reninfreisetzung. AngII selbst inhibiert die Reninbildung und -freisetzung direkt über eine negative Rückkopplungsschleife (Hackenthal, Paul et al. 1990). Es existieren zahlreiche weitere Mediatoren wie bspw. ANP, Oxytocin, ADH, Aldosteron, Glukokortikoide, das Schilddrüsenhormon T₃, Sexualhormone und Wachstumshormone (Castrop, Höcherl et al. 2010). Auf sie soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Die **Salzaufnahme** ist neben dem arteriellen Blutdruck und dem Sympathikus das wichtigste systemische Stellglied zur Kontrolle des RAAS. Eine hohe orale Salzaufnahme supprimiert das RAAS und umgekehrt (Wagner und Kurtz 1998). Dieser Effekt wird durch viele intra- und extrarenale Faktoren vermittelt, die einen Einfluss auf das RAAS ausüben. Für akute Veränderungen des Reninhaushaltes als Antwort auf orale Salzaufnahme scheint v.a. der MD-Mechanismus verantwortlich zu sein.

Längerfristige salzabhängige Effekte werden vermutlich durch die lokalen Mediatoren NO und Prostaglandine vermittelt (Castrop, Höcherl et al. 2010).

Man nimmt an, dass die Salzaufnahme einen Einfluss sowohl auf kurz- als auch auf langfristige Veränderungen in der Reninfreisetzung ausübt. Eine niedrige orale Salzaufnahme stimuliert die Reninfreisetzung, eine hohe Salzaufnahme inhibiert diese (Wagner und Kurtz 1998).

Eine hohe Salzaufnahme kann sich in einem erhöhten Blutdruck äußern, bzw. kann eine verminderte Salzaufnahme zu einem niedrigen Blutdruck führen (O'Shaughnessy und Karet 2004). Es ist daher möglich, dass in der Folge eine veränderte Reninfreisetzung nicht nur primär durch die veränderte Salzaufnahme, sondern auch sekundär durch den veränderten Blutdruck bedingt ist.

1.1.6 Die Kontrolle der Reninfreisetzung: Intrazelluläre Signalvermittler

Das vorangehende Kapitel verdeutlicht die immense Vielfalt an extrazellulären Einflüssen, denen die JG-Zellen ausgesetzt sind. In den Zellen existieren drei Signalvermittlungswege, die diese äußeren Signale weiterverarbeiten und somit die Reninbildung und -freisetzung innerhalb der Zelle regulieren:

Stimulation der Reninfreisetzung. Die Reninfreisetzung wird vor allem durch eine klassische Verstärkungskaskade über den **cAMP**-Weg vermittelt (Castrop, Höcherl et al. 2010). Extrazelluläre Aktivatoren wie Katecholamine und Prostaglandine binden und aktivieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Dadurch wird ein heterotrimeres G-Protein in die GTP-haltige Form überführt, die aktive Untereinheit G_{α} dissoziiert und regt die Adenylatzyklase zur Bildung von cAMP an. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die letztlich die verstärkte Freisetzung von Reninvesikeln initiiert. Der Abbau von cAMP durch die Phosphodiesterasen PDE-3 und PDE-4 beendet diesen Aktivierungsmechanismus (Friis, Jensen et al. 2002; Klar, Sandner et al. 2002).

Stimulation und Inhibition der Reninfreisetzung. **cGMP** inhibiert den Abbau von cAMP und verstärkt so indirekt die Reninfreisetzung (Beavo 1995). Es wurde gezeigt, dass auch NO über diesen Weg die Reninfreisetzung stark stimuliert (Kurtz und Wagner

1998). In scheinbarem Widerspruch dazu kann cGMP die Reninfreisetzung mithilfe der *cGMP-activated Kinase II* (cGKII) auch hemmen (Castrop, Höcherl et al. 2010). *Inhibition der Reninfreisetzung.* Anders als in fast allen anderen Zellen des menschlichen Körpers wirkt eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in JG-Zellen nicht stimulierend, sondern inhibierend, und dieses sog. „Kalziumparadoxon“ vermindert dementsprechend die Exozytose von Reninvesikeln aus JG-Zellen. Vasokonstriktoren, die über intrazelluläres Ca^{2+} in Endothelzellen den Blutdruck erhöhen, unterdrücken in JG-Zellen ebenso mittels Ca^{2+} die Freisetzung von Renin. Ca^{2+} inhibiert in JG-Zellen die Adenylatcyclasen 5 und 6 und somit die Bildung von cAMP (Grünberger, Obermayer et al. 2006). Das Ca^{2+} Signal aktiviert zudem intrazellulär Myosin-Leichtkettenkinasen, öffnet Ionenkanäle an den Reninvesikeln und der Plasmamembran und aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Kurtz 1989; Hackenthal, Paul et al. 1990; Schweda und Kurtz 2004).

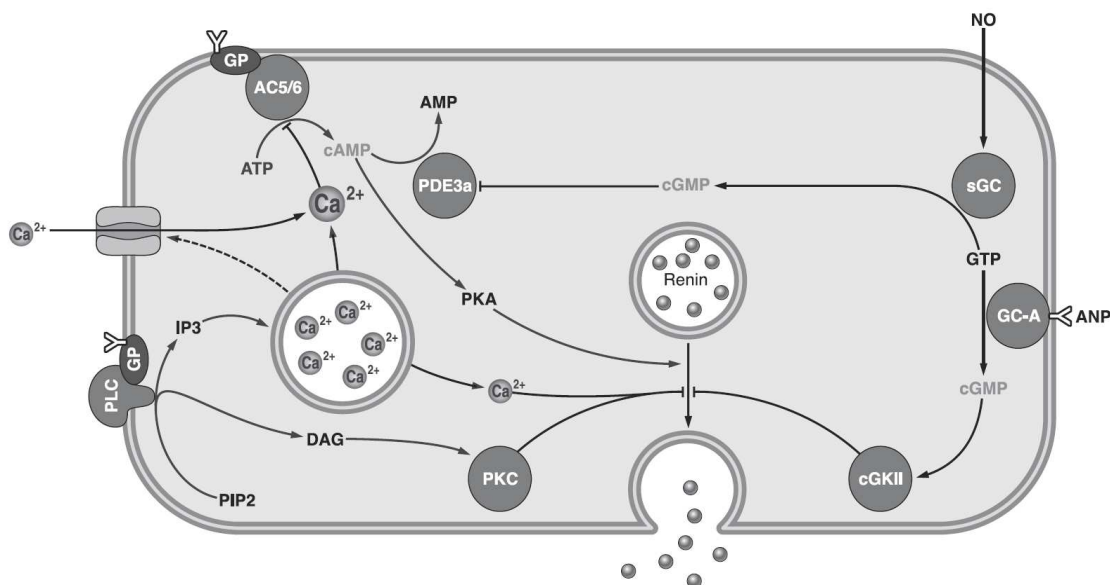


Abb. 1.4 Darstellung intrazellulärer Signalwege zur Kontrolle der Reninfreisetzung. ANP, Atriales natriuretisches Peptid; AC5/6, Adenylatcyclasen 5 bzw. 6; DAG, Diacylglycerol, GC-A, Guanylatzyklase A; sGC, lösliche Guanylatzyklase; NO, Stickstoffmonoxid; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; GP, GTP-bindendes Protein; IP3, Inositol-1,4,5-triphosphat; PIP2, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC, Phospholipase C. Aus Castrop et al. 2010.

1.1.7 Der Renin- /Proreninrezeptor

Die enzymatische Funktion von Renin ist, obwohl das RAAS immer noch einige Rätsel aufgibt, mittlerweile sehr gut erforscht. Neuere Erkenntnisse lassen zudem vermuten, dass Renin, bzw. Prorenin neben seiner Funktion als Protease noch andere Aufgaben erfüllt. So wurde bei schweren Diabetesverläufen mit Nephropathie, Retinopathie und Mikroalbuminurie in menschlichem Plasma eine bemerkenswert hohe Konzentration an Prorenin gemessen (Luetscher, Kraemer et al. 1985). Hierbei wird eine verstärkte profibrotische Proteinsynthese vermutet, die durch einen übermäßig stimulierten Proreninrezeptor induziert sein könnte. Die profibrotische Wirkung von hoher Blutglucosekonzentration, Infektion und Entzündung, sowie freigesetzten Zytokinen beim Diabetes könnte durch den hohen Proreninspiegel noch verstärkt werden (Nguyen und Muller 2010). Außerdem wurde die Bindung von Renin an kultivierten mesangialen Zellen nachgewiesen, was zum Einen zu einer Aktivierung des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 führt (Nguyen, Delarue et al. 1996) und zum Anderen die Expression von TGF- β 1 sowie von extrazellulären Matrixproteinen fördert (Huang, Wongamorntham et al. 2006). Renin bzw. Prorenin binden an den Prorenin-/Reninrezeptor (PRR), der ein integrales Transmembranprotein von 45 kDa darstellt. Die Blockierung des aktiven Zentrums von Renin und Prorenin durch den Inhibitor Aliskiren beeinflusst die Bindung an den Rezeptor nicht (Feldt, Batenburg et al. 2008), was andeutet, dass das katalytische Zentrum von Renin bzw. Prorenin nicht an der Rezeptorbindung beteiligt ist. Tatsächlich erhöht die Bindung an den Rezeptor die katalytische Aktivität von Renin und Prorenin um ein Vielfaches. Zusätzlich wird der intrazelluläre ERK1/ERK2 Signalweg aktiviert und zwar in einer Art und Weise, die von enzymatischen Funktion von Renin unabhängig ist (Nguyen, Delarue et al. 2002). Die Rezeptorbindung steigert also einerseits die katalytische Aktivität von Renin und andererseits aktiviert sie intrazelluläre Signalwege. Die enzymatische Funktion ist vor allem bei der lokalen Reninaktivierung von Bedeutung, um eine begrenzte gewebsspezifische Wirkung zu erzielen. Die Aktivierung von Signalwegen spielt möglicherweise unter pathologischen Bedingung eine Rolle: Die

Blockade des Renin-/Proreninrezeptors bei Mäusen mit einer durch Endotoxine ausgelösten und durch AngII induzierten Uveitis führte zu einer deutlichen Abnahme der Entzündungsparameter (Satofuka, Ichihara et al. 2006).

Es wurden verschiedene Experimenten mit transgenen Ratten durchgeführt, die den humanen Proreninrezeptor überexprimierten. Ein Versuch führte zu einem renalen Phänotyp mit Proteinurie und schleichender Nephropathie (Kaneshiro, Ichihara et al. 2007), ein anderer Versuch mit spezifisch in glatten Muskelzellen überexprimiertem PRR ließ einen kardiovaskulären Phänotyp mit erhöhtem systolischem Blutdruck und erhöhter Herzfrequenz erkennen (Burckle, Jan Danser et al. 2006). Advani et al. zeigten in der Niere eine Kolo-kalisation des PRR mit der V-ATPase, die für die pH-Kontrolle innerhalb der Zelle und in Vesikeln verantwortlich ist (Advani, Kelly et al. 2009). Huang et al. konnten nachweisen, dass Salzarmut in der Niere die Expression des PRR über den cGMP-Signalweg erhöht (Huang und Siragy 2012).

Renin und Prorenin üben offenbar neben ihrer klassischen enzymatischen Funktion mittels ihres Prorenin-/Reninrezeptors auch eine eigenständige Signalfunktion aus, deren Bedeutung jedoch bislang unklar ist.

1.2 LIMP-2

1.2.1 Das LIMP-2 Protein

LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein type 2*; Synonyme: LGP85, CD36L2) ist ein integrales lysosomales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 74-85 kDa (Eskelinen, Tanaka et al. 2003). Es gehört zur CD36-Familie der *scavenger* Rezeptorproteine. Der zentrale Hauptteil von LIMP-2 (etwa 400 der insgesamt 478 Aminosäuren) befindet sich im Inneren des Lysosoms. Dieser Teil wird von zwei Transmembranbereichen flankiert, und die C- und N-terminalen Abschnitte von jeweils etwa 20 Aminosäuren ragen in das Zytoplasma (siehe Abb. 1.5) (Febbraio, Hajjar et al. 2001; Krieger 2001).

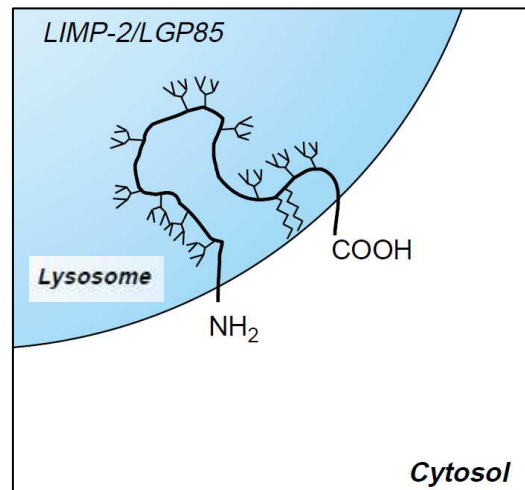


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Struktur von LIMP-2. Aus Eskelinen, Tanaka et al. 2003, Abbildung modifiziert.

Vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) aus gelangt LIMP-2 über den vesikulären Transport zu Lysosomen und Endosomen (Honing und Hunziker 1995). LIMP-2 wird in den Membranen von Lysosomen und späten Endosomen (Fukuda 1991) und vereinzelt auch in frühen Endosomen und in der Zellmembran gefunden (Griffiths, Back et al. 1989).

Lysosomen sind membranumschlossene Zellorganellen mit variabler Größe und Form und besitzen ein saures Milieu mit sauren Hydrolasen (acid hydrolases) zum Abbau von fremdem und zelleigenem Material (de Duve 1983). LIMP-2 gehört neben LIMP-1 und den LAMPs (Lysosomal Associated Membrane Proteins) zu den sog. „*major lysosomal proteins*“. Diese lysosomalen Membranproteine sind alle stark glykosyliert und schützen dadurch die lysosomale Membran (Eskelinen, Tanaka et al. 2003).

LIMP-2 scheint zudem eine Funktion bei der Biogenese und dem Erhalt von Endosomen und Lysosomen auszuüben. Überexpression von LIMP-2 führt intrazellulär zu einem gehäuftem Auftreten von LIMP-2 assoziierten stark geschwollenen Vakuolen mit Eigenschaften von Lysosomen aber auch von frühen und späten Endosomen. Der Transport untereinander von frühen zu späten endosomalen Vakuolen war beeinträchtigt, ebenso die Rückführung der Vakuolenmembran in die Plasmamembran

(Kuronita, Eskelinen et al. 2002). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss von LIMP-2 auf die Fusion von frühen Endosomen und deren Fusion mit Lysosomen hin. Normalerweise wird der Transport lysosomaler Enzyme vom TGN in die Lysosomen durch den Mannose-6-Phosphatrezeptor (M6PR) vermittelt. Reczek et al. beschrieben jedoch einen M6PR-unabhängigen Weg, bei dem LIMP-2 an das lysosomale Enzym β -Glukocerebrosidase bindet und so in die Lysosomen gelangt (Reczek, Schwake et al. 2007). Mutationen in β -Glukocerebrosidase führen zur häufigsten lysosomalen Stoffwechselerkrankung, dem Morbus Gaucher.

LIMP-2 kommt auch extralysosomal vor, nämlich in den Glanzstreifen der Herzmuskelzellen. Bei kardialer Hypertrophie und kardialer Dekompensation sowohl bei Ratten als auch beim Menschen wurden erhöhte LIMP-2-Konzentrationen gemessen. LIMP-2 *knock out* Mäuse waren nicht in der Lage, einen erhöhten Blutdruck durch kardiale Hypertrophie zu kompensieren, stattdessen entwickelten sie unter vermehrter kardialer Belastung eine Kardiomyopathie (Schroen, Leenders et al. 2007).

LIMP-2 *knock out*-Mäuse sind lebensfähig, entwickeln aber neben den o.g. kardialen Störungen eine Obstruktion des Harnleites im uretero-pelvinen Übergang mit einer begleitenden Hydronephrose. Hierbei wurde eine gestörte apikale Expression von Uroplakin in den Epithelzellen des Harnleiters beobachtet, der Grund hierfür könnte ein gestörter Transport zur Zellmembran sein. LIMP-2 *knock out*-Mäuse zeigen zudem eine auf das periphere Nervensystem beschränkte demyelinisierende Neuropathie. Auch hier wird aufgrund des Myelinverlusts und der zugleich erhöhten Aktivität lysosomaler Proteine eine lysosomale Rolle bei der Entstehung dieser Störung vermutet. Aufgrund eines Rückgangs der Spiralganglien der Cochlea, dem Verlust der äußeren Haarzellen und einer Degeneration der Stria Vascularis entwickelten diese Mäuse innerhalb weniger Monate nach der Geburt zusätzlich eine Innenohrtaubheit (Gamp, Tanaka et al. 2003). 2008 identifizierten Berkovic et al. Mutationen im LIMP-2 Gen als Auslöser des sog. *action-myoclonus renal failure syndrome* (AMRF) (Berkovic, Dibbens et al. 2008). Dieses autosomal-rezessive Syndrom tritt

beim Menschen um das 20. Lebensjahr auf. Es verursacht eine Kombination aus neurologischen und renalen Symptomen. Bei Mäusen fehlt diese neurologische Symptomatik, es wurden aber bei betroffenen Patienten wie bei Mäusen abnorme intrazelluläre Ablagerungen in Groß- und Kleinhirn sowie in den Basalganglien gefunden. Die renale Symptomatik beginnt beim Menschen mit einer Proteinurie und kann zum Bild der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) bis hin zum glomerulären Kollaps führen. Eine Kombination aus renalen und neurologischen Symptomen ist nicht obligat (Berkovic, Dibbens et al. 2008).

Die renale Symptomatik ist bei Menschen und Mäusen unterschiedlich. Auch Mäuse zeigen zunächst eine Proteinurie, welche man ursprünglich auf die oben beschriebene Hydronephrose aufgrund der Harnleiterobstruktion zurückführte (Gamp, Tanaka et al. 2003). Allerdings zeigen Nieren von LIMP-2 *knock out* Mäusen ohne Hydronephrose lichtmikroskopisch glomeruläre Läsionen und mesangiale Proliferation, elektronenmikroskopisch einen Verlust der Podozyten-Fußfortsätze. Anders als beim Menschen fehlt bei Mäusen das Bild der Glomerulosklerose und des glomerulären Kollapses. Möglicherweise entsteht die Proteinurie bei LIMP-2 Defekt, weil der lysosomale Abbau von Proteinen, die die Struktur von Podozyten und glomerulärer Schlitzmembran beeinflussen, gestört ist (Berkovic, Dibbens et al. 2008).

Desmond et al. vermuteten, dass LIMP-2 beim Transport und der Metabolisierung von Proteinen im proximalen Tubulus beteiligt ist, und dass deshalb der LIMP-2 *knock out* zur beobachteten Proteinurie führt (Desmond, Lee et al. 2010). Bei LIMP-2 *knock out* Mäusen ist der Proteinrücktransport in die Zellen des proximalen Tubulus über Megalin- und Cubilin-Rezeptor vermittelte Endozytose unverändert. Die daraus entstandenen Endosomen waren jedoch nicht in der Lage, mit den Lysosomen zu verschmelzen und die reabsorbierten Proteine mittels lysosomalem Cathepsin B abzubauen. Die Rolle von LIMP-2 bei Transportprozessen in die Zelle scheint also auch in der Niere eine wichtige Rolle zu spielen.

1.2.2 Zusammenführung von Renin und LIMP-2

Die oben aufgeführten Erkenntnisse deuten an, dass LIMP-2 wichtig für die Biogenese und für den Erhalt von Endosomen und Lysosomen und somit generell für den Vesikelhaushalt einer Zelle ist. LIMP-2, bzw. ein LIMP-2-Defekt scheint dadurch auch die Pathogenese einiger Organ- und Stoffwechselstörungen grundlegend zu beeinflussen.

Die Ergebnisse von Reczek und Desmond zeigen, dass LIMP-2 offenbar einen recht spezifischen Einfluss auf den vesikulären Proteintransport von intra- nach extrazellulär und andersherum ausübt: So wird das Enzym β -Glukocerebrosidase spezifisch von LIMP-2 gebunden und in die Lysosomen transportiert (Reczek, Schwake et al. 2007). In den Zellen des proximalen Tubulus ist LIMP-2 essenziell an der Fusion von Endosomen mit Lysosomen und somit an der Proteinreabsorption beteiligt. Ist LIMP-2 defekt oder fehlt es ganz, kommt es zur Proteinurie im Rahmen des *AMRF*-Syndroms (Desmond, Lee et al. 2010).

Das Enzym Renin ist wie die β -Glukocerebrosidase eine Protease und wird ebenfalls auf reguliertem Weg über Vesikel freigesetzt. Mehrere Experimente weisen auf eine starke Ähnlichkeit zwischen Reninvesikeln und Lysosomen hin (Taugner und Hackenthal 1988): In Reninvesikeln konnten mikro- und makroautophagische Vorgänge beobachtet werden. Diese Reninvesikel enthalten Membranfragmente (sog. *myelin figures*, Lee et al. 1966). An der Membranoberfläche von Reninvesikeln wurden Plaques nachgewiesen, die normalerweise typisch für Endosomen sind und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu sog. *coated vesicles* für eine endozytotische Aktivität sprechen (Taugner und Hackenthal 1988). Reninvesikel nehmen neben lysosomenspezifischen *Tracern* wie *cationized ferritin* (CF) und *horseradish peroxidase* (HRP) auch die lysosomotropen Substanzen Chloroquin und Chlorphentermin auf. Chloroquin und Chlorphentermin beeinflussen in Lysosomen den Lipidkatabolismus. Dabei entstehen polare Lipide, die sich innerhalb von Lysosomen lamellenartig anordnen und diese lamellären Einschlusskörper wurden auch in Reninvesikeln beobachtet (Taugner und Metz 1986). Reninvesikel haben wie

Lysosomen ein saures Milieu und besitzen neben der Protease Renin die typisch lysosomalen Enzyme saure Phosphatase, Cathepsin B und Cathepsin D. Nicht zuletzt besitzt Renin strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit lysosomalen Proteasen wie etwa Cathepsin D (Taugner, Whalley et al. 1985).

Obwohl trotz der oben genannten Gemeinsamkeiten noch unklar ist, ob es sich bei Reninvesikeln um Lysosomen handelt, kann man zumindest von einer großen Ähnlichkeit der beiden Zellbestandteile ausgehen. Es ist deshalb interessant zu klären, ob LIMP-2 als lysosomales Membranprotein auch in Reninvesikeln vorkommt und ob es die Synthese und die Freisetzung von Renin beeinflusst. Die Mechanismen der Reninfreisetzung sind noch nicht vollständig geklärt. Eine potenzielle Rolle von LIMP-2 als spezifisches Adapter- und Transportprotein für Renin oder als am Vesikelhaushalt beteiligtes Membranprotein wäre aber denkbar.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Frage geklärt, ob LIMP-2 in JG-Zellen exprimiert wird. Es wurde außerdem untersucht, ob LIMP-2 die kurzfristige und langfristige Reninfreisetzung beeinflusst. LIMP-2 wurde deshalb zunächst mittels Immunhistochemie in der Niere lokalisiert. Im weiteren Verlauf wurde das Verhalten der Reninparameter PRC, Renin mRNA Expression und renalem Reningehalt in Ruhe und nach verschiedenen stimulierenden Maßnahmen zur Reninfreisetzung bei LIMP-2 *knock out* Mäusen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurde der systolische Blutdruck von LIMP-2 *knock out* und Wildtypmäusen miteinander verglichen, um einen möglichen Effekt von LIMP-2 über Renin auf den Kreislauf zu erfassen. Es wurde weiterhin untersucht, ob LIMP-2 einen Einfluss auf die Proreninkonzentration ausübt. Zusätzlich wurden Stoffwechselfparameter bei LIMP-2 *knock out* Mäusen aus dem Urin analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Dezember 2012 veröffentlicht (Schmid, Oelbe et al. 2013).

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten LIMP-2 KO und WT Mäuse stammen aus heterozygoten Zuchtpaaren. Sie wurden von Prof. Dr. Paul Saftig und PD Dr. Michael Schwake (Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse, die für die Untersuchung der LIMP-2 und Renin Koregulation (Kap. 3.1.4 und 3.1.5) verwendet wurden, sind *C57BL/6* Wildtypmäuse und stammen aus dem eigenen Zuchtbestand des Instituts für Physiologie der Universität Regensburg.

Die verwendeten Oligonukleotide, Puffer, sowie Antikörper sind im Anhang unter 7.3 (S. 91) aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunologische Experimente

2.2.1.1 Messung der Reninkonzentration in Plasma und Nierengewebe

Die Konzentration von Renin kann mithilfe seiner enzymatischen Aktivität ermittelt werden, da es Angiotensinogen in aktives Angiotensin I (AngI) umwandelt. Die Menge an gebildetem AngI gibt damit Aufschluss über die zugrunde liegende Reninkonzentration. Dazu wird einer Probe mit unbekannter Reninaktivität Angiotensinogen im Überschuss zugesetzt und das gebildete AngI mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

In mit Anti-AngI beschichteten Röhrchen konkurriert das gebildete AngI mit zugegebenem radioaktiv markiertem AngI um die Bindungsstellen der Anti-AngI Antikörper. Nach Inkubation über Nacht und dem Entfernen der Lösung aus den Probenröhrchen

hat sich an der Probenwand dasselbe Verhältnis zwischen nativem und radioaktiv markiertem AngII eingestellt wie in der Lösung. Das gebundene radioaktiv markierte AngII verhält sich reziprok zur Reninaktivität der Probe, seine Radioaktivität wird mittels eines Gamma-Zählers gemessen. Mithilfe einer Eichkurve bekannter Proben kann die Reninaktivität bestimmt werden. Das Versuchsprotokoll ist im Anhang unter 7.4 (S. 93) angegeben.

2.2.1.2 Proreninaktivierung durch Trypsin

Nach Umwandlung von Prorenin zu Renin durch Abspaltung der Prosequenz kann die erhöhte Reninkonzentration mittels RIA (siehe Kap. 2.2.1.1) gemessen werden. Zieht man von dieser Reninkonzentration die Reninkonzentration der Probe vor Proreninaktivierung ab, so kann man auf den Proreningehalt der Probe schließen.

Zur Abspaltung der Prosequenz von Prorenin wurde Trypsin verwendet. Trypsin spaltet nicht nur Prorenin, sondern auch Renin und andere Proteine in der Probe. Durch einen Vorversuch wurde deshalb zuerst diejenige Inkubationszeit für Trypsin ermittelt, bei der möglichst nur Prorenin gespalten wurde und damit ein Maximum an Renin in der Probe messbar war. Das Versuchsprotokoll ist im Anhang unter 7.4 (S. 93) angegeben.

2.2.1.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von LIMP-2 in der Niere

Mithilfe der Immunhistochemie können Zielantigene auf Gewebeschnitten durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Bei der Indirekten Immunfluoreszenz wird zunächst ein spezifischer Primärantikörper gegen die Zielstruktur auf den Gewebeschnitt aufgetragen. In einem zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper hinzugefügt, der an den Primärantikörper bindet. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der im Sichtbaren emittiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird die Zielstruktur mithilfe dieses Antikörperkomplexes sichtbar. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurde ein spezifischer LIMP-2 Primärantikörper aus dem

Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel (Prof. Dr. Paul Saftig, PD Dr. Michael Schwake) verwendet. Das Versuchsprotokoll ist im Anhang unter 7.4 (S. 93) angegeben.

2.2.2 Experimente an Mäusen

2.2.2.1 Blutplasmagewinnung zur Bestimmung der Plasmaprotein-Konzentration

Die Blutproben wurden bei wachen Tieren durch Punktion des submandibulären Venenplexus (ca. 20 µl) gewonnen und dabei in Glaskapillaren überführt. Diese wurden 5 min lang bei RT und 8000 rpm in einer Kapillarzentrifuge zentrifugiert (Biofuge Hämo, Heraeus, Hanau). Danach wurden die Kapillaren an der Grenze zwischen Plasma und korpuskulären Blutbestandteilen gebrochen und das Plasma mit einer Eppendorfpipette in ein Eppendorfgefäß geblasen. Das so gewonnene Plasma wurde anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.2 Nierenentnahme

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Nieren beidseits freigelegt. Die Nieren wurden vom Gefäßstumpf getrennt und von der Nierenkapsel befreit. Unmittelbar danach wurden sie gewogen und in flüssigen Stickstoff überführt. Bei einigen Organen fiel bei Entnahme eine Hydronephrose auf, ebenso wiesen einige Mäuse eine stark erhöhte Diurese im Stoffwechselkäfig auf, so dass Sie aus der Auswertung genommen werden mussten.

2.2.2.3 Aufbereitung des Nierengewebes zur Bestimmung der renalen Reninaktivität

Die nach Organentnahme zunächst bei -80°C eingefrorenen Nieren wurden mit einer Homogenisierungslösung (5 Vol.% Glycerin, 10 mM EDTA [pH 8,0], 0,1 mM PMSF, 0,1 mM AEBSF) gemischt, wobei 1 ml der Homogenisierungslösung pro 100 mg Nierengewebe verwendet wurden. Die Nieren wurden etwa 30 s homogenisiert (Ultra Turrax) und anschließend bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand

wurde im Anschluss mittels RIA (siehe Kap. 2.2.1.1) die Reninaktivität im Nierengewebe bestimmt. Da die Reninaktivität im Nierengewebe bei Mäusen höher ist als im Plasma, wurde die Probe stärker mit Maleatpuffer verdünnt (200- bis 500-fach).

2.2.2.4 Nichtinvasive Blutdruckmessung

Durch die nichtinvasive „Tail-Cuff-Methode“ wurden bei Mäusen der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen. Hierzu wurden die Mäuse unter maximal möglicher Reizabschirmung nacheinander auf eine auf 35°C vorgeheizte Wärmeplatte unter eine Metallbox gesetzt, und es wurde ihnen eine Blutdruckmanschette um den Schwanz gelegt. Direkt hinter der Manschette wurde mittels Infrarotmessung die Pulsamplitude in der Schwanzarterie abgeleitet, auf dem Bildschirm dargestellt und die Herzfrequenz aus der Pulsamplitude abgeleitet (BE, Germany).

Die Manschette wurde nun bis zu dem Druck aufgepumpt, der zu einem Absinken der arteriellen Druckkurve auf das Nullniveau führte. Dieser Druck entspricht dem arteriellen systolischen Druck in der Schwanzarterie. Pro Sitzung erfolgten je nach Compliance der Mäuse pro Maus etwa fünf Einzelmessungen, welche zu einem Tageswert gemittelt wurden.

2.2.2.5 Uringewinnung

Zum Sammeln von Urin wurden sowohl Männchen (N=9, davon 4 KO) als auch Weibchen (N=8, davon 4 KO) für drei Tage in Stoffwechsel-Einzelkäfige gesetzt. Jeden Tag wurde aus dem Urinauffang der Stoffwechselkäfige der Urin entnommen, sodass sich 3 Einzelmessungen pro Parameter und Maus ergeben. Der entnommene Urin wurde für 5min bei RT und 10000 rpm zentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und gewogen. Der Urin wurde gewogen, die Elektrolytkonzentrationen mittels Flammenphotometrie (siehe Kap.2.2.5) bestimmt. Zur Bestimmung der Osmolarität wurden die Proben 1:2 mit *aqua bidest.* verdünnt (25µl Probe + 25µl *aqua bidest.*).

2.2.3. RNA-Isolierung aus Nierengewebe

Zur RNA-Isolierung aus Nierengewebe wurde TRIzol (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. TRIzol enthält chaotrope Salze, welche die Proteine in der Probe denaturieren. Es schafft außerdem eine Phenolphase, in der sich die denaturierten Proteine und die DNA lösen und eine wässrige Phase, in der sich die RNA löst. Nach der Trennung der Phasen durch Zentrifugation kann die wässrige RNA-Phase leicht abgenommen werden. Die Phasentrennung wird durch die Zugabe von Chloroform erleichtert, da sich Phenol hier wesentlich besser löst als in Wasser.

Das Versuchsprotokoll ist im Anhang unter 7.4 (S.93) angegeben.

2.2.4 Bestimmung der mRNA Expression von LIMP-2 und Renin im Nierengewebe

Für die reverse Transkription wurden pro Probe 2 µg RNA mit 1 µl poly(I) (0,5µg/µl) und DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10µl gebracht, 5 min lang bei 65 °C inkubiert, und dann im Eisbad abgekühlt. Den Proben wurde im Anschluss 12 µl einer Mischung aus 1 µl reverser Transkriptase (RT), 4 µl dNTPS (2,5mM), 4 µl Puffer und 3 µl DEPC-H₂O hinzugefügt und dann zur Synthese der cDNA mittels reverser Transkription 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Synthese wurde die reverse Transkriptase durch zweiminütiges Erhitzen auf 94°C im Thermocycler inaktiviert. Die Proben wurden bis zur Verwendung in der *real time*-PCR auf Eis gestellt.

Die Expression der mRNAs für Renin und LIMP-2 wurde (jeweils bezogen auf die mRNA Expression von Aktin) mittels *real time* PCR im *light cycler* 480 (*Roche*) mit dem *Light Cycler DNA Master SYBR Green I Kit* (*Roche Molecular Biochemicals*) verfolgt. Von jeder cDNA Probe wurde auf einer 96-*well*-Mikrotiterplatte zum Einen ein Ansatz für die Renin, bzw. die LIMP-2 mRNA Expression, zum Anderen ein Ansatz für die Aktin mRNA Expression erstellt. Jeder Ansatz wurde in zweifacher Ausführung (entsprechend 2 *wells*) vorgelegt. Pro *well* wurden 9 µl einer Mischung aus 5 µl SYBR Green, 1 µl *sense* und *antisense* Primer (*Biomers.net*) und 3 µl nukleasefreiem H₂O (in *SYBR Green Kit* enthalten zugegeben. Dieser Mischung

wurde jeweils 1 µl der cDNA-Probe hinzugefügt, so dass jedes *well* ein Gesamtvolumen von 10 µl enthielt.

Gleichzeitig wurde aus einer gemeinsamen DNA-Lösung, bestehend aus je 1,5 µl der cDNA Proben, ein Standard angefertigt und mit Verdünnungen von 1:1, 1:3, 1:6 oder 1:10 (Gesamtvolumen je 10 µl, Verdünnung mit nukleasefreiem H₂O) jeweils in zweifacher Ausführung vorgelegt. Als Negativproben wurden zweimal 10 µl nukleasefreies H₂O verwendet.

Das Temperaturprogramm im *light cycler* setzte sich zusammen aus einer ersten 15 s Inkubation bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus je 15 s Denaturierung bei 95°C, 5 s *annealing* bei 60°C und 15 s Elongation bei 72°C. Das Ergebnis wurde mithilfe der Schmelzkurve verifiziert. Die mRNA Expressionen von Renin und LIMP-2 wurden jeweils in Relation zur Expression von β-Aktin mRNA gesetzt, um Schwankungen in der cDNA-Syntheserate zwischen verschiedenen Proben auszugleichen.

2.2.5 Flammenphotometrische Bestimmung der Natrium- und Kaliumkonzentration

Die Flammenphotometrie ist eine emissionsspektroskopische Untersuchungsmethode und wird zur quantitativen Bestimmung von Elektrolytkonzentrationen verwendet. Eine verdünnte Probe wird dazu vom Gerät angesaugt, versprüht und in eine Flamme geleitet. Ionen werden dabei in einen elektronisch angeregten Zustand gebracht. Bei der Rückkehr in den Grundzustand emittieren diese Ionen Licht einer definierten Wellenlänge, das von einem Detektor gemessen wird. Die Lichtintensität gibt Aufschluss über die Konzentration der zu bestimmenden Ionen. Na⁺ emittiert Licht bei 589 und 589,5 nm, K⁺ bei 766,5 und 769,9 nm.

Es wurde die Na⁺- und die K⁺-Konzentration im Urin von LIMP-2 WT und KO Mäusen bestimmt. Die Urinproben zur Messung von [Na⁺] wurden dazu vorher 1:10000 (9,99 ml H₂O + 1 µl Urin) verdünnt, die Proben für [K⁺] 1:5000 (9,98 ml H₂O + 2 µl Urin). Zunächst wurde das Flammenphotometer (*Jenway*) auf das zu bestimmende Ion eingestellt und anschließend geeicht. Bei der [K⁺]-Bestimmung wurde hierzu eine 7

mmol (521,92 mg/l), eine 10 mmol (745,6 mg/l) und eine 50 mmol (3,73 g/l) KCl-Lösung verwendet, bei der [Na⁺]-Bestimmung eine 10 mmol (584,4 mg/l) und eine 50 mmol (3,73 g/l) NaCl-Lösung. Zusätzlich wurde jeweils mit H₂O *bidest.* auf Null geeicht. Alle Proben wurden zweimal gemessen, bei einer Wertedifferenz >3 erfolgte eine dritte Messung. Nach jeweils vier Messungen erfolgte eine neue Eichung des Geräts mit der 50 mmol NaCl bzw. KCl-Lösung und mit H₂O *bidest.*

2.2.6 Statistik

Jedem Experiment lagen 8-12 Einzelversuche zugrunde. Jeder Messpunkt ist als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus den Einzelmessungen der verglichenen Gruppen (Genotyp, Geschlecht, Stimulation vs. Kontrolle) dargestellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert. Zur Versuchsauswertung und zur graphischen Darstellung wurden *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism* verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Experimente

Die Verteilung von LIMP-2 auf die einzelnen Kompartimente der Niere ist weitgehend unbekannt. Im Rahmen des *AMRF* Syndroms haben sowohl Menschen als auch Mäuse eine renale Symptomatik, die sich anfangs in Form einer Proteinurie darstellt und sich beim Menschen bis zum Bild der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) weiterentwickeln kann.

Berkovic et al. beschrieben in den Nieren von LIMP-2 *knock out* Mäusen lichtmikroskopisch auffällige glomeruläre Läsionen und mesangiale Proliferation; elektronenmikroskopisch war eine Auslöschung der Podozyten-Fußfortsätze zu sehen (Berkovic, Dibbens et al. 2008).

Um diese Befunde besser verstehen zu können und um eine präzisere Aussage über das Vorkommen und die intrarenale Verteilung von LIMP-2 treffen zu können, wurde LIMP-2 im Folgenden mittels Immunhistochemie in der Niere lokalisiert. Entscheidend war dabei zunächst die Lokalisierung von LIMP-2 in JG-Zellen, um den potentiellen Einfluss von LIMP-2 auf die Reninfreisetzung zu klären. Im weiteren Verlauf wurde das gesamte Nephron (Glomerulus und Tubulussystem) und schließlich das renale Gefäßsystem auf das Vorhandensein von LIMP-2 überprüft.

3.1.1 Lokalisierung von LIMP-2 in JG-Zellen

Zunächst wurden Paraffinschnitte von Mausnieren mit Antikörpern gegen LIMP-2 und Renin doppelgefärbt. Für Renin war vor allem am glomerulären Gefäßpol an klassischer Position eine deutliche Färbung erkennbar (siehe Abb. 3.1). Nach Stimulation der Reninproduktion konnte zusätzlich ein Reninsignal in den glomerulären Aa. afferentes beobachtet werden, was durch die Rekrutierung von Renin bildenden Zellen in diesen Gefäßen erklärbar ist (siehe Kap. 3.1.4, Abb 3.4).

Am glomerulären Gefäßpol zeigte sich nicht nur für Renin sondern auch für LIMP-2 ein äußerst starkes Farbsignal. Das ist besonders eindrucksvoll in Abb.3.2 zu erkennen, hier wurde Synaptopodin als glomerulärer Marker verwendet. Bei stärkerer Vergrößerung (630-fach) waren in JG-Zellen einzelne granulenhörmige LIMP-2 Färbungen abgrenzbar. Diese Granulen enthielten teilweise nur randständig LIMP-2, teilweise füllte LIMP-2 die Granulen auch komplett aus.

Kleine punktförmige grüne LIMP-2 Signale waren auch an anderen Orten im Nierengewebe erkennbar (siehe Abb. 3.2), aber die deutlichste LIMP-2 Expression war zweifellos in Renin bildenden JG-Zellen zu beobachten. Im Mischbild (Abb. 3.1) resultierte eine kräftige orangefarbene Farbüberlagerung. Dies verdeutlicht die Kolo-kalisation von LIMP-2 und Renin in JG-Zellen. Das starke LIMP-2 Signal spricht zudem für eine hohe Expression von LIMP-2 in diesen Zellen.

LIMP-2 kolokalisierte mit Renin auch in den rekrutierten Renin bildenden Zellen der glomerulären Aa. Afferentes (siehe Kap. 3.1.4, Abb.3.4), was zeigt, dass die Expression von LIMP-2 und Renin in Renin bildenden Zellen gekoppelt ist.

Unklar war, ob LIMP-2 und Renin nicht nur in der gleichen Zelle, sondern auch im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind. Diese Frage konnte mithilfe der Konfokalmikroskopie geklärt werden. Beide Enzyme konnten in der gleichen Ebene, d.h. im gleichen Zellkompartiment lokalisiert werden (Bilder hier nicht gezeigt).

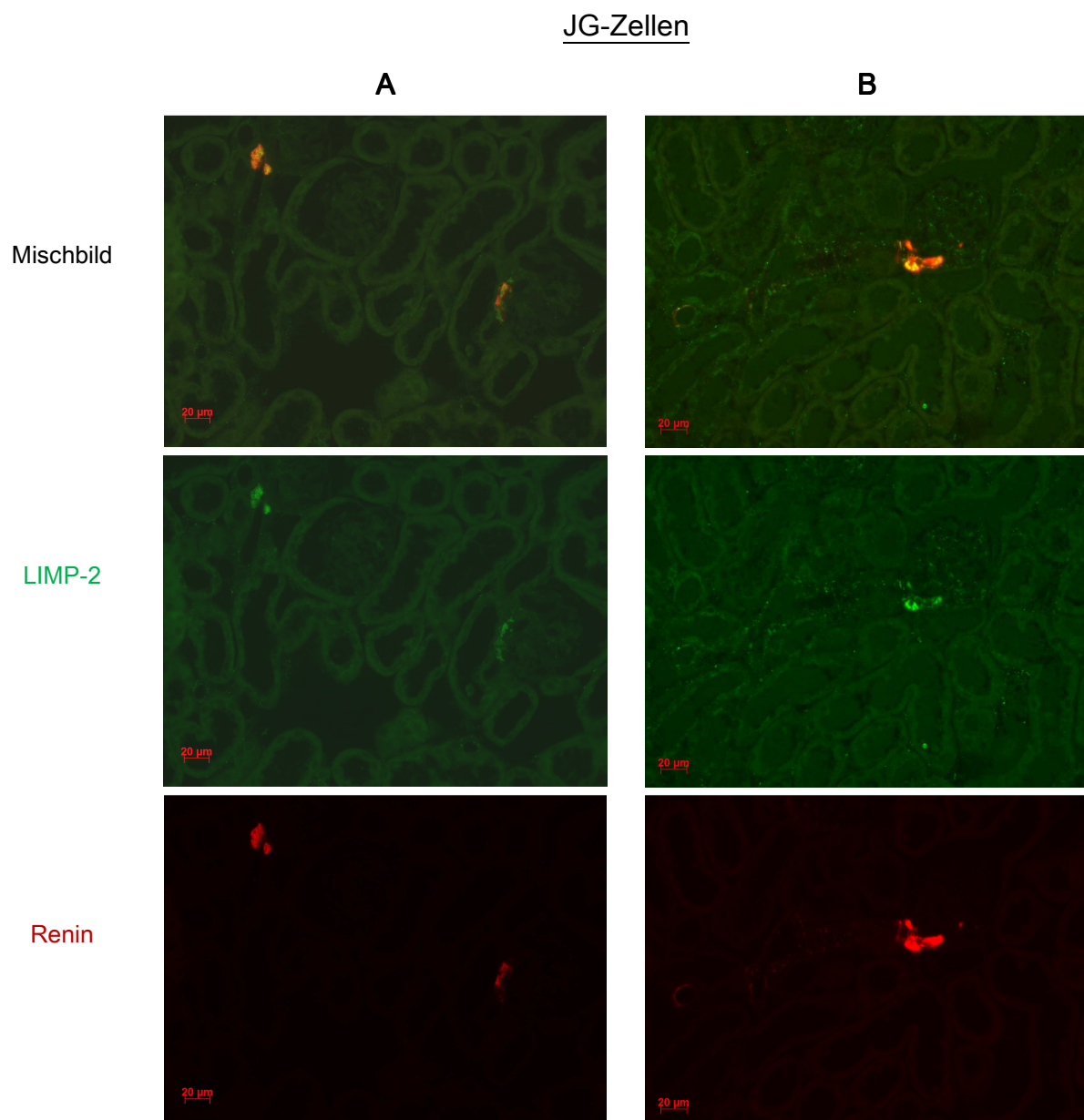


Abb. 3.1 Kofärbung LIMP-2, Renin in JG-Zellen (**A**, **B**). Das grüne LIMP-2 Farbsignal ist sehr ausgeprägt in Renin bildenden JG-Zellen zu beobachten. LIMP-2 und Renin sind hier deutlich überlagert.

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Ren1 [Renin], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Ren1, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung.

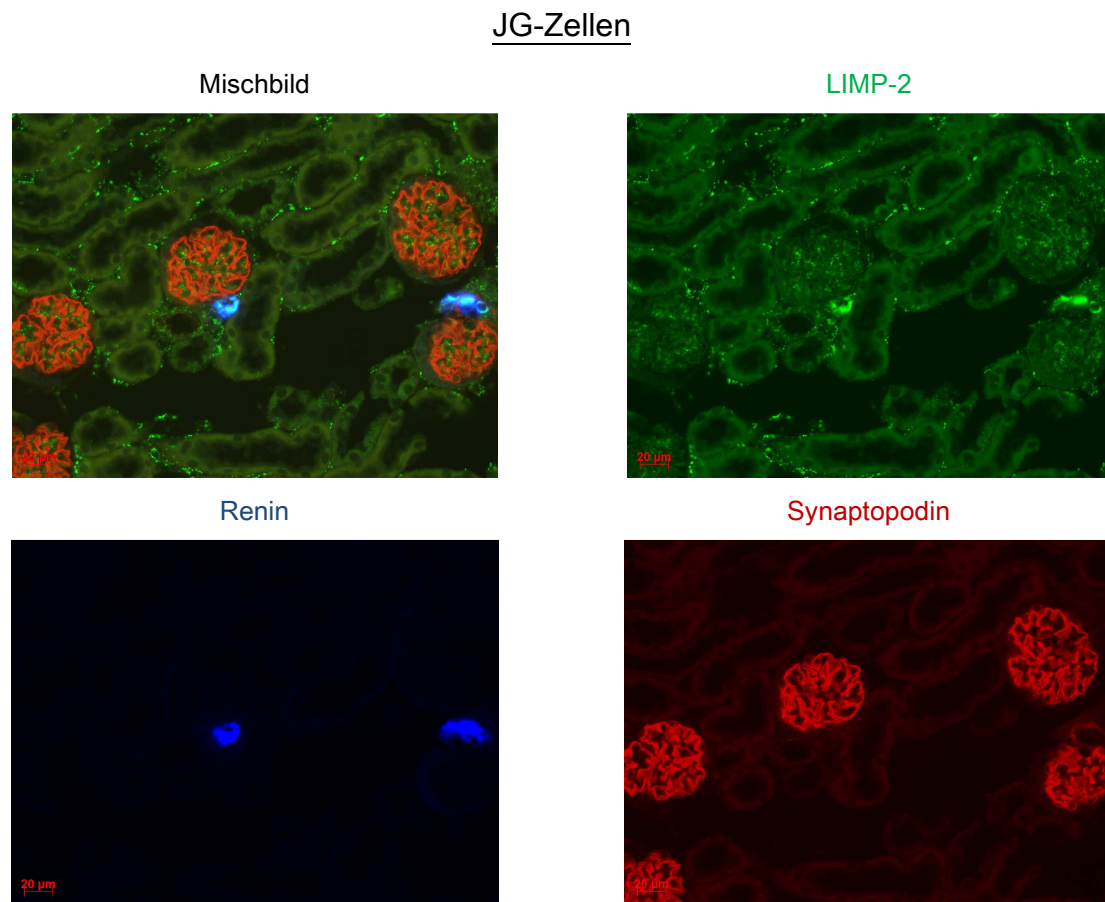


Abb. 3.2 Kofärbung LIMP-2, Renin, Synaptopodin. Zu sehen sind mehrere mit Synaptopodin (rot) gefärbte Glomeruli und dicht daneben mit Ren1 (blau) gefärbte JG-Zellen. Synaptopodin ist ein immunhistochemischer Marker für Podozyten und verdeutlicht hier die glomerulusnahe Lage von Renin bildenden JG-Zellen im glomerulären Gefäßpol. LIMP-2 überlagert sich ganz deutlich mit Ren1. Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Ren1 [Renin], Synaptopodin [Podozyten], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Synaptopodin, rot], Cy5 anti-chicken [Ren1, blau] Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung.

3.1.2 Lokalisierung von LIMP-2 in Nephron und renalem Gefäßsystem

Desmond et al. hatten bereits auf eine Rolle von LIMP-2 bei der Fusion von Endosomen und Lysosomen in den Zellen des proximalen Tubulus hingewiesen. Eine Störung dieser Fusion führt zu einer tubulären Proteinurie, da die im proximalen Tubulus reabsorbierten Proteine intrazellulär nicht weiter metabolisiert werden können und mit dem Urin vermehrt ausgeschieden werden (Desmond, Lee et al. 2010) Eine Analyse des Vorkommens von LIMP-2 im Nephron ist daher wichtig.

Proximaler Tubulus

Im proximalen Tubulus findet der hauptsächliche Stofftransport vom Primärharn über die proximalen Tubuluszellen zurück ins Blut statt. Stoffe wie Glukose und Aminosäuren werden über Na⁺-gekoppelte Transportprozesse reabsorbiert. Proteine werden hingegen in der Regel durch Endozytose aufgenommen, die entstandenen Endosomen fusionieren mit Lysosomen und die Proteine werden durch lysosomale Enzyme hydrolysiert.

Für die Färbung des proximalen Tubulus wurde ein Antikörper gegen Megalin verwendet. Megalin ist ein Rezeptorprotein der apikalen Zellmembran und für die Endozytose von Proteinen aus dem Primärharn von zentraler Bedeutung (Motoyoshi, Matsusaka et al. 2008).

Tatsächlich kolokalisiert LIMP-2 mit Megalin in Zellen des proximalen Tubulus (siehe Abb.7.1, S. 87). Im Zytoplasma dieser Zellen ließen sich grün gefärbte granuläre Bestandteile deutlich abgrenzen. Dieses Muster war unregelmäßig, denn nicht alle Zellen eines Tubulussegments zeigten diese grünen Granulen.

Bei der Betrachtung verschiedener proximaler Tubulussegmente ergaben sich zudem erhebliche Schwankungen in der Intensität des LIMP-2 Signals. Diese Befunde korrelieren möglicherweise mit der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität einzelner proximaler Tubuluszellen bzw. Tubulussegmente.

Henle-Schleife

Die Aufgabe der Henle-Schleife besteht vor allem in der Konzentration des Primärharns. Im wasserundurchlässigen aufsteigenden Teil der Henleschleife wird vor allem NaCl über den NKCC2-Transporter rückresorbiert. In der Folge entsteht ein hyperosmolares Nierenmark und damit wird die Wasserrückresorption im Sammelrohr ermöglicht.

Die Henle-Schleife wurde mit einem Antikörper gegen Tamm-Horsfall-Protein (Uromodulin) markiert. Dieses Protein wird im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife synthetisiert und in das Tubuluslumen sezerniert.

LIMP-2 war in der Henle-Schleife nur sehr schwach erkennbar. Es verteilte sich punktförmig im Zytosol, teilweise auch am apikalen Zellpol (siehe Abb. 7.2, S. 87). Die Signalintensität lag aber weit unter der des proximalen Tubulus.

Distales Nephron (distaler Tubulus und Sammelrohr)

Im distalen Nephron wird die endgültige Harnzusammensetzung festgelegt. Im distalen Tubulus finden überwiegend Na^+ und Ca^{2+} -Transportprozesse gegen hohe Gradienten statt. Im Sammelrohr findet die ADH-vermittelte Wasserrückresorption (Antidiurese) statt. Im distalen Nephrons findet man sog. Schalt- und Hauptzellen. Die Hauptzellen vermitteln aldosterongesteuerte Na^+ -Sekretion bei gleichzeitiger K^+ -Resorption, die Schaltzellen vom Typ A und B haben Einfluss auf den Urin-pH, indem sie H^+ bzw. HCO_3^- sezernieren. Für die Färbung des distalen Tubulus wurde ein Antikörper gegen Calbindin benutzt. Calbindin ist für den intrazellulären Transport von Ca^{2+} von der apikalen zur basolateralen Zellmembran zuständig.

Für die LIMP-2 Färbung wurde ein LIMP-2 Antikörper verwendet, der eine unspezifische Färbung der Schaltzellen sowohl bei LIMP-2 WT Nieren, als auch bei LIMP-2 KO Nieren auslöst. Dieser verwirrende Effekt tritt allerdings nur in den Schaltzellen auf, die JG Zellen und der Rest des Nierengewebes sind auf LIMP-2 KO Schnitten immer für LIMP-2 negativ. Das wurde mehrfach überprüft (hier nicht gezeigt, vgl. dazu Kap. 7.2, Abb. 7.3, S. 88) und der Antikörper ist ansonsten spezifisch für LIMP-2. Bei den LIMP-2 KO Schnitten waren keine LIMP-2 Signale erkennbar (Abb. 3.6 B, S. 47), wohingegen die LIMP-2 WT Schnitte in JG-Zellen deutlich grün angefärbt waren (Abb. 3.6 A, vgl. dazu Kap. 3.1.4, Abb. 3.4 A).

Bei der Überprüfung des distalen Nephrons kam es zur erläuterten unspezifischen Färbung der Schaltzellen, die auch bei LIMP-2 KO Mäusen aufgefallen war. Eine spezifische Färbung von LIMP-2 im distalen Tubulus war nicht zu erkennen (siehe Abb. 7.3, S. 88).

Für die Färbung des Sammelrohres wurde ein Antikörper gegen Aquaporin-2 (AQP2) eingesetzt. Aquaporin-2 ist ein Wasserkanal und wird unter dem Einfluss von ADH in

die luminale Zellmembran des Sammelrohrs eingebaut, um die Wasserpermeabilität zu erhöhen. Wasser folgt dem osmotischen Gradienten und kann vermehrt resorbiert werden.

Auch im Sammelrohr konnte keine LIMP-2 Färbung beobachtet werden (siehe Abb. 7.4, S. 88). Da die direkte Umgebung deutliche punktförmige LIMP-2 Färbungen zeigte, wirkten die Sammelrohre selbst wie aus der Umgebung ausgestanzt.

Podozyten

Für die immunhistochemische Darstellung der Podozyten wurden Antikörper gegen Podocin und Synaptopodin verwendet. Podozyten umschließen und stützen mit ihren Fußfortsätzen die glomerulären Kapillarschlingen und bilden zusammen mit der glomerulären Basalmembran und dem Kapillarendothel die Blut-Harn-Schranke. Das membranständige Protein Podocin wird ausschließlich in Podozyten gebildet (Roselli, Heidet et al. 2004). Synaptopodin kommt in der Niere nur in Podozyten vor und ist mit Aktin assoziiert (Mundel, Heid et al. 1997).

LIMP-2 war in Podozyten nicht nachweisbar, es zeigte sich eine Kolo-kalisation weder mit Synaptopodin noch mit Podocin (siehe Abb. 7.5 A+B, S. 89). Dieses Ergebnis ist deshalb interessant, weil Berkovic et al. bei Nieren von LIMP-2 KO Mäusen elektronenmikroskopisch eine Auslöschung der Fußfortsätze von Podozyten beschrieben hatten (Berkovic, Dibbens et al. 2008). Dieser Podozytendefekt wurde daher als möglicher Auslöser für die Proteinurie der Tiere diskutiert. Es wurde vermutet, dass LIMP-2 für den Erhalt der Podozytenstruktur wichtig ist, und dass das Fehlen von LIMP-2 möglicherweise den lysosomalen Abbau von Proteinen stört, die die Struktur von Podozyten und glomerulärer Schlitzmembran beeinflussen (vgl. Kap 1.2.1). Der fehlende Nachweis von LIMP-2 in Podozyten macht diese Hypothese allerdings unwahrscheinlich.

Mesangialzellen

Die Mesangialzellen sind wichtig für den Erhalt der Glomerulusstruktur. Einerseits stützen sie intraglomerulär das glomeruläre Kapillarknäuel, und andererseits verbinden sie extraglomerulär die glomerulären Arteriolen mit der Macula Densa des distalen Tubulus. Für die Färbung der Mesangialzellen wurde ein Antikörper gegen Desmin verwendet.

Hier wurde eine punktförmige aber deutliche Kolo-kalisation von LIMP-2 und Desmin festgestellt, was darauf hindeutet, dass LIMP-2 in mesangialen Zellen exprimiert wird (siehe Abb. 7.6, S. 90).

Die Abbildungen zur Lokalisation von LIMP-2 im Nephron sind im Anhang (Kap. 7.2, S. 87) dargestellt.

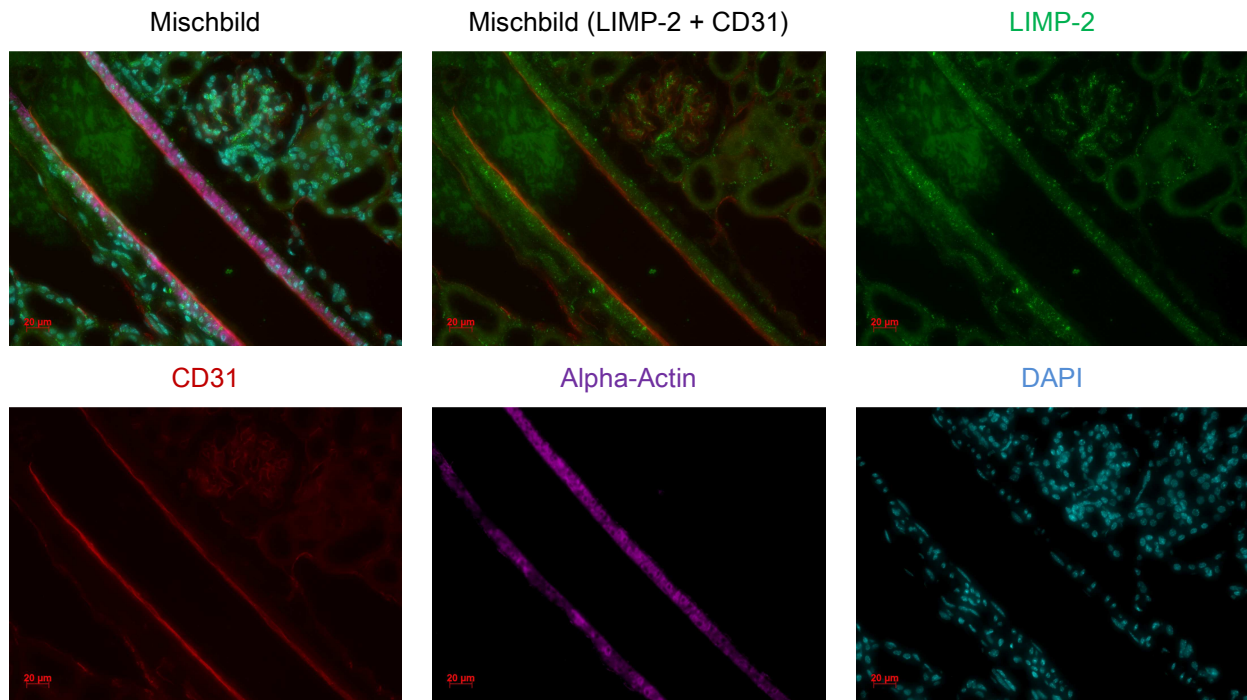
Renales Gefäßsystem

LIMP-2 wird offenbar nur in wenigen Nephronsegmenten exprimiert. Bei der Analyse dieser Segmente waren jedoch klar abgrenzbare punktförmige LIMP-2 Signale im umgebenden Gewebe zu erkennen. Es war daher von besonderem Interesse, auch das renale Gefäßsystem zu untersuchen, insbesondere die peritubulären Kapillaren, die die Nierentubuli unmittelbar umgeben, sowie die Arteriolen.

Für die Färbung der Endothelschicht von Arteriolen und peritubulären Kapillaren wurde ein Antikörper gegen CD31 verwendet. Die Muscularis der Arteriolen wurde mit einem Antikörper gegen Alpha-Actin gefärbt. Zusätzlich wurde DAPI als Zellkern-Marker eingesetzt.

LIMP-2 war in der Muscularis deutlich zu erkennen und es zeigte dabei ein punktförmiges Verteilungsmuster. In den Endothelien der Arteriolen fehlte es allerdings vollständig. Peritubuläre Kapillaren hingegen enthielten LIMP-2 in ihren Endothelien (siehe Abb. 3.3 A+B).

A Arteriolen



B Peritubuläre Kapillaren

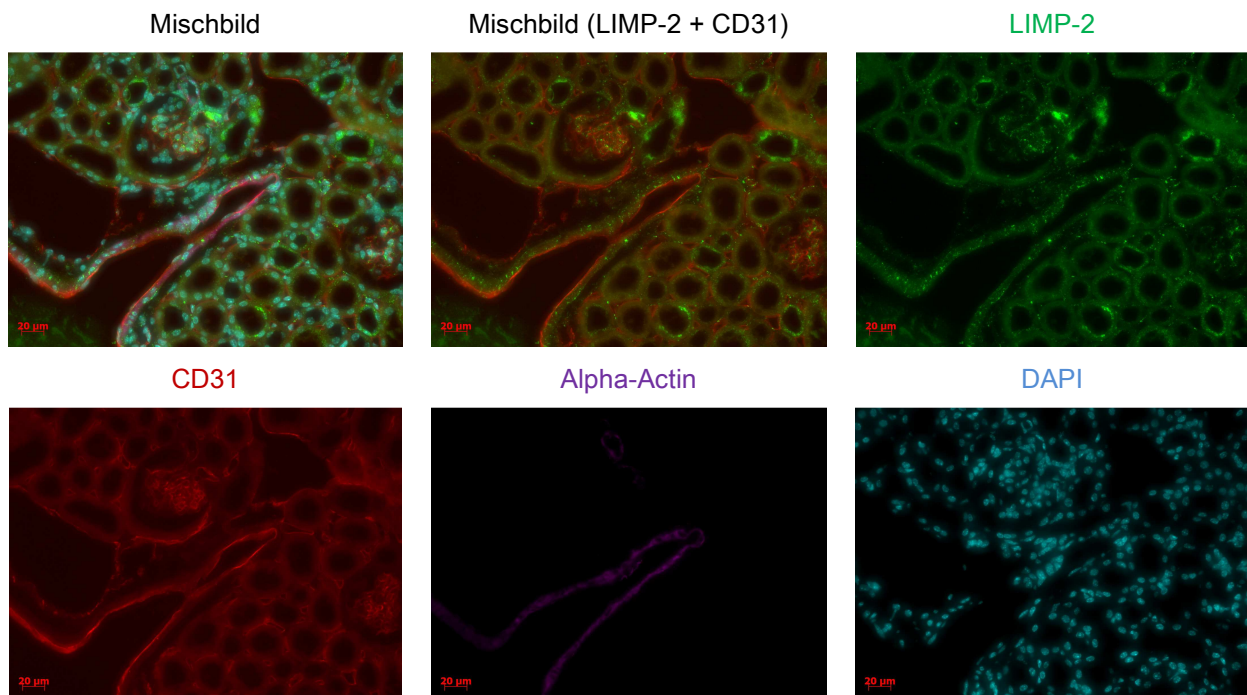


Abb. 3.3 (vorherige Seite) **A** Die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur in Arteriolen (Marker Alpha-Actin) zeigen ein deutliches punktförmiges LIMP-2 Färbemuster. **B** In peritubulären Kapillaren hingegen kann man LIMP-2 in den Endothelzellen (Marker CD31) erkennen. Beachte die flachen Zellkerne (Marker DAPI) der Endothelzellen (**A, B** → Mischbilder).

Paraffinschnitte. Primärantikörper: LIMP-2, Alpha-Actin [Glatte Gefäßmuskelzellen], CD31 [Gefäßendothel], DAPI [Zellkerne], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [CD31, rot], AL647 [Alpha-Actin, pink], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung).

3.1.3 Stimulierung der Reninsynthese *in vivo* durch Nidrigsalzdiät und ACE-Hemmung sowie durch Nierenarterienstenose

Die Ergebnisse aus Kap. 3.1.1 zeigen, dass LIMP-2 in erstaunlich hoher Konzentration in JG-Zellen vorkommt. Bemerkenswert daran ist, dass nirgendwo im restlichen Nierengewebe eine derart hohe Signaldichte von LIMP-2 beobachtet werden konnte (siehe Kap. 3.1.2). Nach Reninstimulation wurde ein schlagartiges Verschwinden von Reninvesikeln aus der Zelle beobachtet (Peti-Peterdi, Fintha et al. 2004) und vermutlich werden diese Vesikel mittels Exozytose freigesetzt (Friis, Jensen et al. 1999). Falls LIMP-2 Bestandteil dieser Vesikelmembranen wäre und einen Einfluss auf die Reninfreisetzung hätte, sollte es ähnlich wie Renin reguliert sein.

Im Folgenden wurde daher überprüft, ob LIMP-2 in diesen rekrutierten Zellen unter Renin stimulierenden Bedingungen verstärkt synthetisiert und exprimiert wird. Dazu wurden Nierenschnitte von Kontrollmäusen mit Nierenschnitten von Mäusen unter Reninstimulation verglichen. Ein Teil dieser Mäuse (Wildtypen, N=6) wurde sieben Tage lang entweder mit normalem Futter (0,3% NaCl, N=3) oder Futter mit einer verminderten Salzkonzentration (0,02% NaCl) in Kombination mit einem ACE-Hemmer gefüttert (Enalapril 10mg/kg KG über das Trinkwasser, N=3). Durch den ACE-Hemmer wird die Bildung von AngII gehemmt und somit die negative Rückkopplung, die AngII auf die Reninsynthese und -freisetzung ausübt, aufgehoben. Dies bewirkt eine sehr starke Stimulation des Reninsystems.

Dem zweiten Teil der Mäuse (N=2) wurde eine künstliche Nierenarterienstenose links gelegt. Die linke Nierenarterie wird bei diesem Verfahren mit einem Silberclip eingengt und der Perfusionsdruck der linken Niere („geclippte Niere“) nimmt ab. Es kommt dadurch zur Stimulation der Reninbildung und –freisetzung in der linken Niere und der Blutdruck steigt an. In der rechten „ungeclippten“ Niere steigt damit der Perfusionsdruck, und entsprechend kommt es hier zu einer Hemmung der Reninsynthese und –freisetzung.

Die Kontroll- und Stimulationsgruppen zeigten alle eine starke LIMP-2 Färbung und auch eine deutliche Überlagerung mit Renin. In der Kontrollgruppe war die Doppelfärbung Renin/LIMP-2 auf den glomerulären Gefäßpol begrenzt (siehe Abb. 3.4 A). Bei Mäusen unter Low-Salt Diät und Enalaprilgabe kam es zur Rekrutierung von Renin bildenden Zellen aus Gefäßzellen. Das rote Reninsignal ist in diesen Zellen entlang der glomerulären Arteriolen zu sehen (siehe Abb. 3.4 B). In den gleichen Zellen war auch LIMP-2 vorhanden. Es breitete sich in gleichem Maße in der Gefäßwand aus wie Renin, beide Signale waren im Mischbild überlagert.

Der gleiche Befund ergab sich bei den Mäusenieren mit Nierenarterienstenose (siehe Abb. 3.4 C). Der verminderte renale Perfusionsdruck steigerte nicht nur die Reninfreisetzung, sondern regte auch die Bildung von LIMP-2 in reninbildenden Zellen an. Immunhistochemisch konnte unter Reninstimulation neben der Rekrutierung von Renin bildenden Zellen eine Koexpression von LIMP-2 und Renin nachgewiesen werden. Die Signale von LIMP-2 und Renin sind deckungsgleich und kommen ausschließlich gemeinsam in den rekrutierten Zellen vor.

Dieser Befund beweist lediglich das gemeinsame Vorkommen von Renin und LIMP-2 in diesen Zellen. Deshalb wurde im Anschluss auch der Gehalt an mRNA für Renin und LIMP-2 im Nierengewebe bestimmt, um einen Anhaltspunkt für ihre mRNA-Syntheserate zu bekommen.

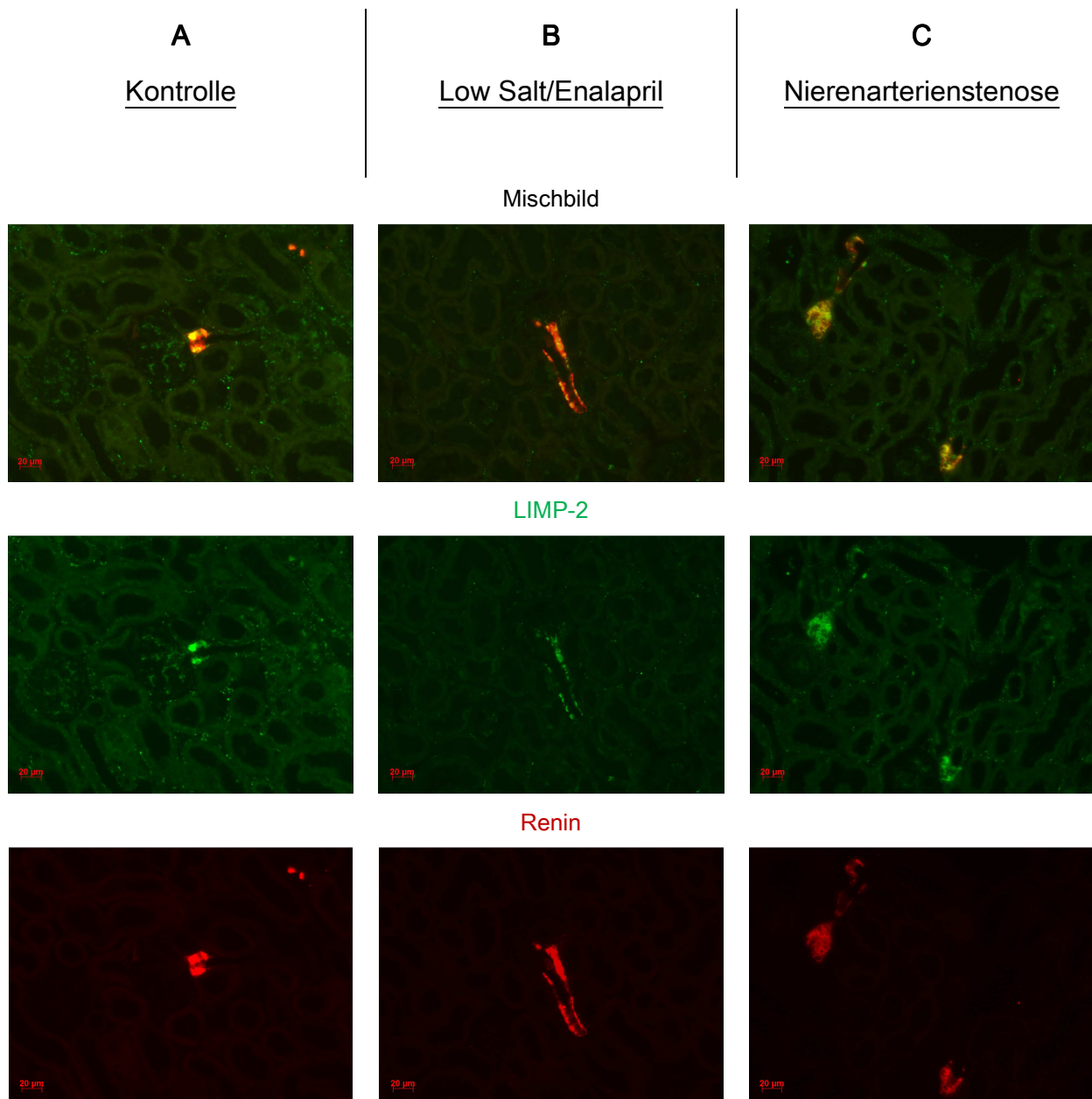


Abb. 3.4 Unter Kontrollbedingungen (A) sind Renin- und LIMP-2 Signal weiterhin sehr deutlich zu erkennen, bleiben aber auf den glomerulären Gefäßpol beschränkt. Die Nieren von Mäusen unter Nidrigsalzdiät (0,02% NaCl) und unter Enalaprilgabe (10mg/kg KG) zeigen eine deutliche Rekrutierung von Renin bildenden Zellen (B). Das LIMP-2 Signal ist an diesen Stellen ebenfalls verstärkt. Den gleichen Effekt erzielt die Nierenarterienstenose durch einen Silberclip (2 kidney – 1 clip, C).

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Ren1 [Renin], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Ren1, rot] Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung.

Nach Niedrigsalzdiät und Gabe von Enalapril kam es im Vergleich zur Kontrolle mit Normalfutter ($0,99 \pm 0,20$) zu einem fast sechsfachen Anstieg ($p < 0,01$) der renalen Renin mRNA Expression ($5,82 \pm 0,95$). Auch nach angelegter Nierenarterienstenose ($3,99 \pm 0,10$) ist sie im Vergleich zur Kontrolle ($0,40 \pm 0,16$) deutlich erhöht ($p < 0,05$).

Auch die Expression von LIMP-2 mRNA im Nierengewebe ist unter der Reninstimulation signifikant erhöht: Unter Low Salt Diät und Enalaprilgabe steigt die LIMP2 mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle mit Normalfutter ($1,10 \pm 0,18$) auf etwa den doppelten Wert ($2,05 \pm 0,12$) an. Die LIMP-2 mRNA Expression bei Mäusen mit angelegter Nierenarterienstenose ($2,55 \pm 0,10$) übersteigt die der Kontrolle ($0,45 \pm 0,14$) um etwa das Fünffache.

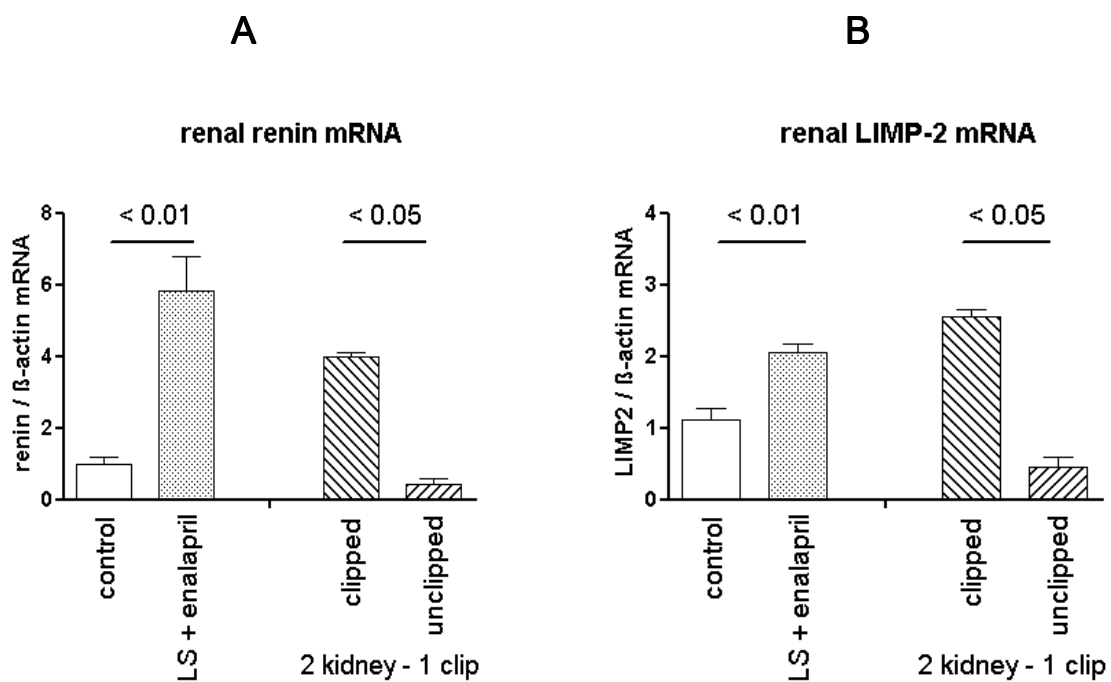


Abb. 3.5 Die renale Renin mRNA Expression (**A**) und LIMP-2 mRNA Expression (**B**) unter Low Salt (LS) Diät (0,02% NaCl) und gleichzeitiger Gabe von Enalapril (10mg/kg KG), sowie unter Nierenarterienstenose (2 kidney – 1 clip). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Die oberhalb der Balken dargestellten p-Werte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle.

3.1.4 Immunhistochemischer Vergleich der Stimulierbarkeit des Reninsystems bei LIMP-2 KO und LIMP-2 WT Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine mögliche funktionelle Relevanz von LIMP-2 bei der Synthese und Freisetzung von Renin hin. Es wurde daher weiterführend untersucht, wie sich die Reninexpression bei LIMP-2 KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen unter Kontroll- bzw. Stimulationsbedingungen verhält. Die Mäuse wurden dazu über 7 Tage entweder mit normalem Futter (0,3% NaCl) oder Futter mit einer verminderten Salzkonzentration (0,02% NaCl) in Kombination mit einem ACE-Hemmer (Enalapril 10mg/kg KG über das Trinkwasser) gefüttert.

Sowohl bei WT-Mäusen als auch bei KO-Mäusen kam es unter Low Salt Diät und Enalaprilgabe zu einer stärkeren und ausgedehnteren Reninfärbung als in den Kontrollgruppen, es konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen ausgemacht werden (siehe Abb. 3.6). Die Reninbildung in rekrutierten Zellen unter Low Salt Diät und Enalaprilgabe scheint durch den LIMP-2 Knockout demnach nicht beeinflusst zu sein.

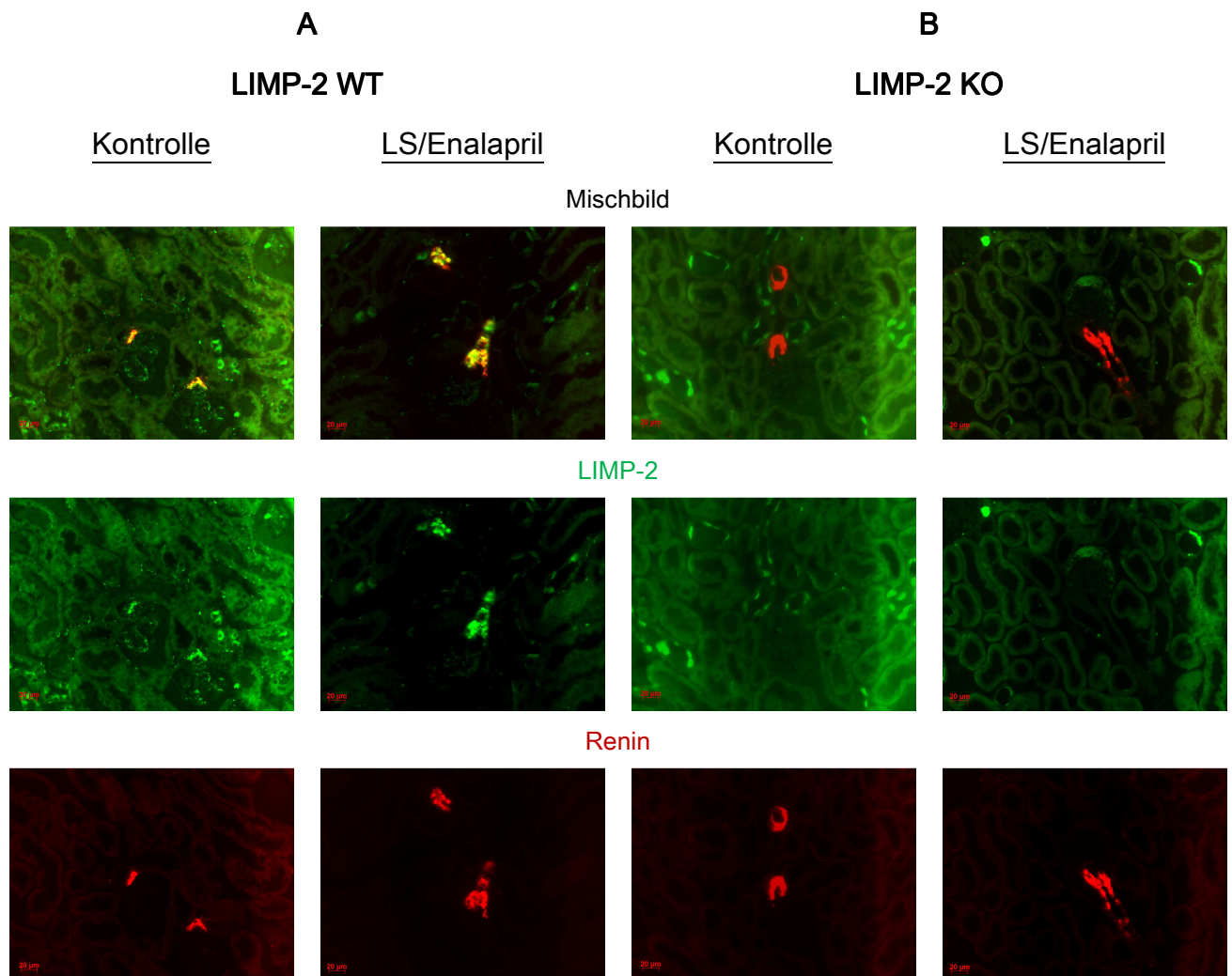


Abb. 3.6 Beim Vergleich der Stimulierbarkeit von Renin zwischen LIMP-2 WT (**A**) und LIMP-2 KO Mäusen (**B**) ist keine verminderte Renin-Färbung bei den LIMP-2 Knockout Schnitten erkennbar. Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Ren1 [Renin], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Ren1, rot] Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung.

3.1.5 Zusammenfassung

LIMP-2 wird innerhalb der Niere am stärksten in den JG-Zellen exprimiert. Außerdem konnte mithilfe Renin stimulierender Maßnahmen (Low Salt Diät und Enalaprilgabe sowie Anlegen einer Nierenarterienstenose) in rekrutierten Renin bildenden Zellen in der Gefäßwand glomerulärer Arteriolen eine verstärkte Koexpression von LIMP-2 und Renin nachgewiesen werden. Sowohl die Renin- als auch LIMP-2 mRNA Expression werden unter Low Salt Diät und Enalaprilgabe sowie durch reduzierten renalen Perfusionsdruck hochreguliert.

Immunhistochemisch ist allerdings kein direkter Einfluss von LIMP-2 auf die Reninbildung und -freisetzung feststellbar. In LIMP-2 KO Mäusen konnte keine Verminderung des Reninsignals unter Stimulationsbedingungen festgestellt werden. LIMP-2 KO Mäuse zeigen dementsprechend eine normale Reninproduktion, die unter Stimulation wie bei den Wildtypen ansteigt.

LIMP-2 wird im renalen Gefäßsystem in den Endothelien peritubulärer Kapillaren und in der Muskularisschicht von Arteriolen exprimiert. LIMP-2 kommt innerhalb der Glomeruli in den Mesangialzellen vor, in Podozyten ist kein LIMP-2 Farbsignal vorhanden. Innerhalb des Nephrons enthalten nur die Zellen des proximalen Tubulus LIMP-2.

Die bisher erhobenen Daten lassen vermuten, dass auch bei LIMP-2 KO Mäusen in JG-Zellen und rekrutierten Zellen eine Reninexpression stattfindet, die der von Wildtypen entspricht und die auch unter Stimulationsbedingungen nicht beeinträchtigt ist. Neben dem immunhistochemischen Ansatz zur Lokalisation von LIMP-2 wurden im Anschluss noch weitere Versuche durchgeführt, um einen Einfluss von LIMP-2 auf die Produktion und Freisetzung von Renin zu eruieren. Hierzu wurden Parameter bestimmt, die weiteren Aufschluss über das Sekretions- und Freisetzungsverhalten von Renin bildenden JG-Zellen in LIMP-2 Wildtyp- und LIMP-2 *knock out* Mäusen geben sollen.

3.2 *In vivo* Experimente

3.2.1 Die Reninsynthese und -sekretion unter Kontrollbedingungen

Die Produktion von LIMP-2 wird durch Renin stimulierende Maßnahmen angeregt, was vermuten lässt, dass LIMP-2 für die Bildung bzw. Freisetzung von Renin eine Bedeutung haben könnte. Dementgegen wurde aber festgestellt, dass das immunhistochemische Reninsignal unter Reninstimulation auf LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Nierenschnitten gleich ist, bzw. sich gleichermaßen auf rekrutierte Zellen ausbreitet. Dies würde wiederum einer Rolle von LIMP-2 im Reninmetabolismus widersprechen. Zur weiteren Klärung war es deshalb wichtig, den Einfluss von LIMP-2 auf die Bildung von Renin innerhalb der Niere und seine Freisetzung ins Blut zu eruieren.

Ergänzend zu den immunhistochemischen Befunden wurden deshalb im Folgenden die Konzentration von Renin im Plasma (Plasma Renin Concentration, PRC), sowie der Reningehalt und die Renin mRNA Expression im Nierengewebe bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen bestimmt und miteinander verglichen.

Bei der PRC weiblicher Mäuse unter Kontrollbedingungen konnte kein Unterschied zwischen Wildtypen ($145,08 \pm 18,33$) und Knockouts ($140,37 \pm 20,44$) festgestellt werden und auch bei den Männchen bestand kein Unterschied zwischen Wildtypen ($102,12 \pm 17,22$) und Knockouts ($104,15 \pm 12,88$). Die PRC weiblicher Mäuse liegt insgesamt etwas höher als die PRC männlicher Mäuse.

Wie zu erwarten, war der Reningehalt im Nierengewebe bei allen Mäusen um ein Vielfaches höher als die PRC. Bei den Männchen ergab sich kein Unterschied im Reningehalt des Nierengewebes bei Wildtypen ($556,1 \pm 39,9$) und Knockouts ($546,2 \pm 39,7$). Auch bei der Renin mRNA Expression war kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar (weiblicher WT: $1 \pm 0,11$; weiblicher KO: $0,83 \pm 0,15$; männlicher WT: $1 \pm 0,07$; männlicher KO: $0,92 \pm 0,11$).

Insgesamt besteht also unter Kontrollbedingungen weder bei der PRC, dem Reningehalt im Nierengewebe, noch bei der renalen Renin mRNA Expression ein signifikanter Unterschied zwischen LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen.

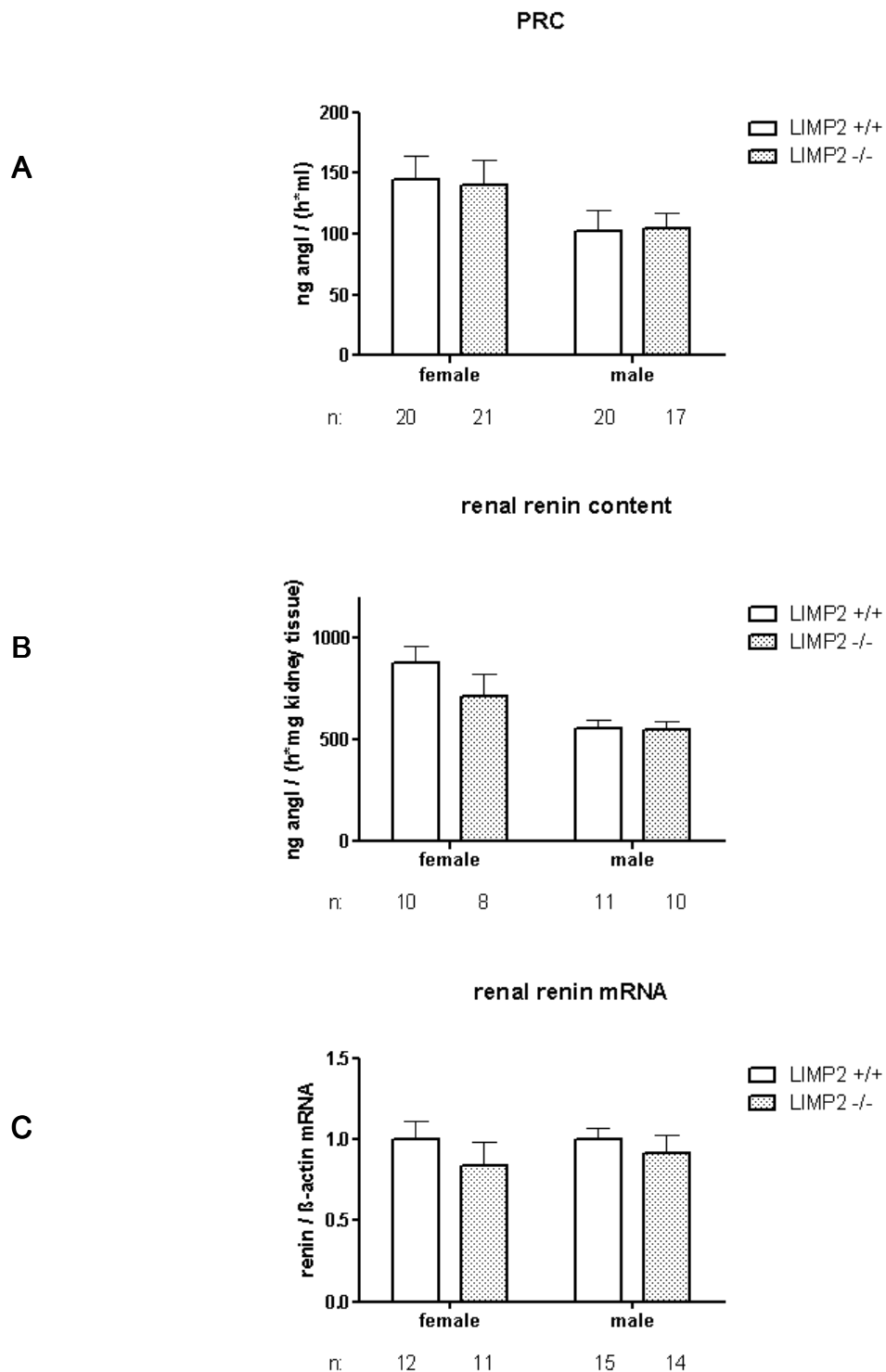


Abb. 3.7 (vorherige Seite) Bestimmung der PRC (A), des renalen Reningehaltes (B) und der renalen Renin mRNA Expression (C) unter Kontrollbedingungen bei LIMP-2 WT und KO Mäusen. Die Anzahl der Versuchstiere des jeweiligen Experiments (n) sind unter den dazugehörigen Balken angegeben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

3.2.2 Stimulierung der Reninsynthese und –sekretion durch Isoproterenol

In einer Reihe von *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnte die Wirkung des β -Rezeptoragonisten Isoproterenol als potenter Stimulator der Reninfreisetzung und Reninsynthese belegt werden (Hackenthal, Paul et al. 1990). Wie körpereigene Katecholamine bewirkt auch Isoproterenol über die Bindung an β 1-Rezeptoren eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase und damit die Bildung von cAMP. Dies führt im Sinne einer Stimulation der Reninfreisetzung kurzfristig zu einem Anstieg der PRC um ein Vielfaches. Längerfristig bewirkt Isoproterenol unter Normal- und Hochsalzdiät im Sinne der Stimulation der Reninsynthese einen Anstieg der Renin mRNA Expression (Holmer, Kaissling et al. 1997). Isoproterenol wird daher im folgenden Experiment eingesetzt, um zu untersuchen, wie sich eine akute Stimulation der Reninfreisetzung auf die PRC von LIMP-2 WT und LIMP-2 *knockout* Mäusen auswirkt, bzw. ob LIMP-2 *knockout* Mäuse gleichermaßen stimulierbar sind wie die Wildtypen.

Einer Gruppe Männchen (N=9, davon 4 *knockouts*) und einer Gruppe Weibchen (N=8, davon 4 *knockouts*) wurden unter Kontrollbedingungen zunächst 20 μ l Blut durch Punktion des submandibulären Venenplexus entnommen. Nach 10 Tagen wurde jeder Maus 10mg/kg KG Isoproterenol intraperitoneal injiziert und nach 60min wurden erneut 20 μ l Blut durch submandibuläre Punktion entnommen. Aus dem Plasma der Blutproben wurde mittels RIA die PRC bestimmt (siehe Abb. 3.8).

Die PRC-Kontrollwerte unterschieden sich bei den Weibchen zwischen Wildtypen (245,48 \pm 27,49) und Knockouts (233,22 \pm 64,06) nicht voneinander. Gleichermäßen verhielt es sich bei den PRC-Kontrollwerten der Männchen (WT control: 384,64 \pm 117,55; KO control: 468,30 \pm 424,82).

Unter Stimulation mit Isoproterenol kam es bei Männchen und Weibchen beider Genotypen zu einem drastischen Anstieg der PRC. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Stimulierbarkeit zwischen WT-Weibchen (19240 \pm 1737) und KO-Weibchen (18975 \pm 3083), bzw. zwischen WT-Männchen (16359 \pm 1893) und KO-Männchen (18005 \pm 1708) festgestellt werden.

Das Verhalten der PRC nach Stimulation mit Isoproterenol erweist sich bei allen Mäusen ähnlich, *in vivo* sind keinerlei Unterschiede in der akuten Stimulierbarkeit der Reninfreisetzung durch Isoproterenol erkennbar.

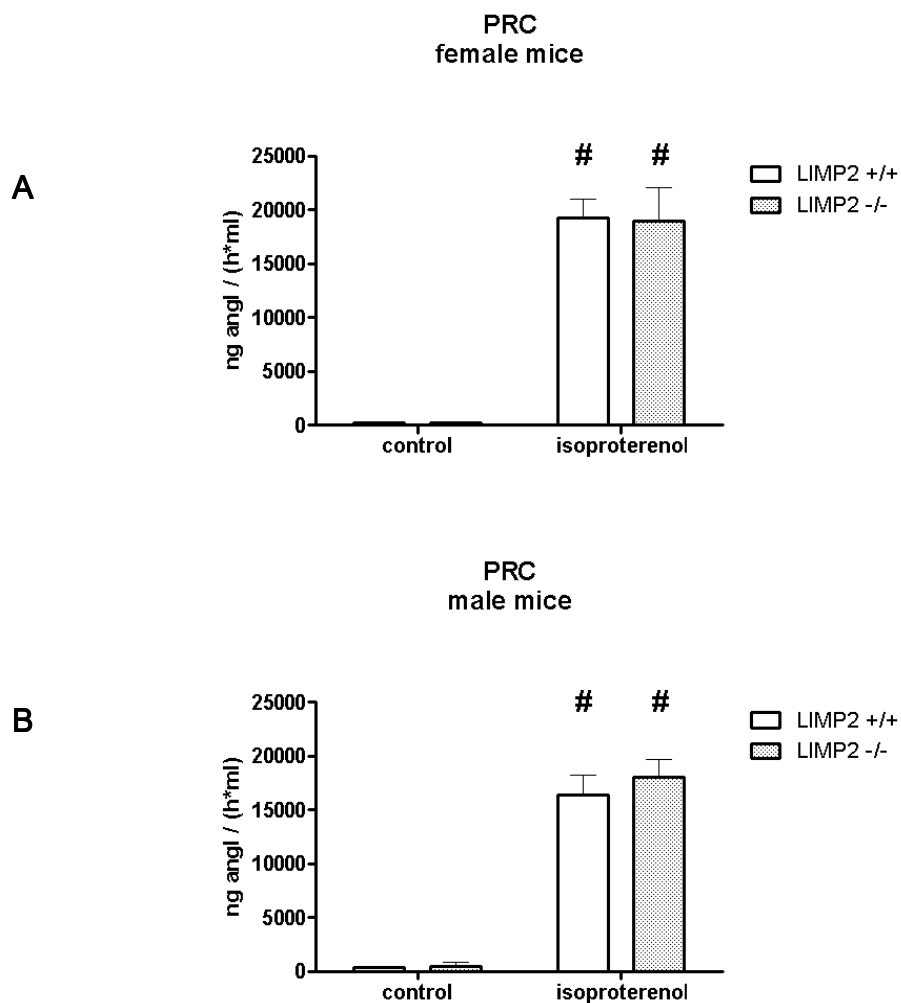


Abb. 3.8 PRC weiblicher (A) und männlicher (B) Mäuse unter Kontrollbedingungen und 60min nach Stimulation mit 10mg/kg KG Isoproterenol. Jeweils Vergleich von LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. # $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.3 Stimulierung der Reninsynthese und -sekretion durch Niedrigsalzdiät

Im Anschluss sollten die Auswirkungen einer längerfristigen Stimulation der Reninfreisetzung auf LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen analysiert werden. Deshalb wurden bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen die Folgen einer 14-tägigen Niedrigsalzdiät (0,02% NaCl) für die Parameter PRC, renaler Reningehalt und Renin mRNA Expression im Vergleich zur Normalsalzdiät (0,3% NaCl) untersucht.

Nach 14-tägiger Salzrestriktion kam es zu einem Anstieg der PRC (siehe Abb. 3.9). Diese war im Vergleich zur Kontrolle (LIMP-2 WT: $140,7 \pm 23,8$; KO: $116,7 \pm 22,1$) etwa auf das Doppelte erhöht. LIMP-2 Wildtypen ($299,2 \pm 47,8$) und Knockouts ($268,7 \pm 57,4$) unterschieden sich unter Niedrigsalzdiät nicht signifikant voneinander. Auch beim renalen Reningehalt ließen sich unter Kontrollbedingungen zwischen Wildtypen ($608,4 \pm 41,4$) und Knockouts ($552,6 \pm 80,8$) keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Der Reningehalt stieg unter Niedrigsalzdiät bei Wildtypen ($1013,8 \pm 92,6$) und Knockouts ($893,8 \pm 90,2$) ähnlich an, sodass auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ersichtlich war.

Die Expression der renalen Renin mRNA war bei beiden Genotypen unter Kontrollbedingungen ähnlich (WT: $1,1 \pm 0,04$; KO: $1,0 \pm 0,09$). Sie wurde unter Salzrestriktion insgesamt nur sehr schwach angeregt und war im stimulierten Zustand bei Wildtypen ($1,3 \pm 0,12$) und Knockouts ($1,3 \pm 0,13$) gleich.

Es lassen sich auch bei dem Versuchsansatz einer chronischen Stimulation der Reninfreisetzung durch Salzrestriktion *in vivo* keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit des Reninsystems feststellen. Die Niedrigsalzdiät (low salt) ist bei Mäusen im Vergleich zum Menschen und zu Ratten ein relativ schwacher Stimulus des Reninsystems. Es ist daher nicht ungewöhnlich, dass die Expression der Renin mRNA durch eine Niedrigsalzdiät nicht signifikant stimuliert wird.

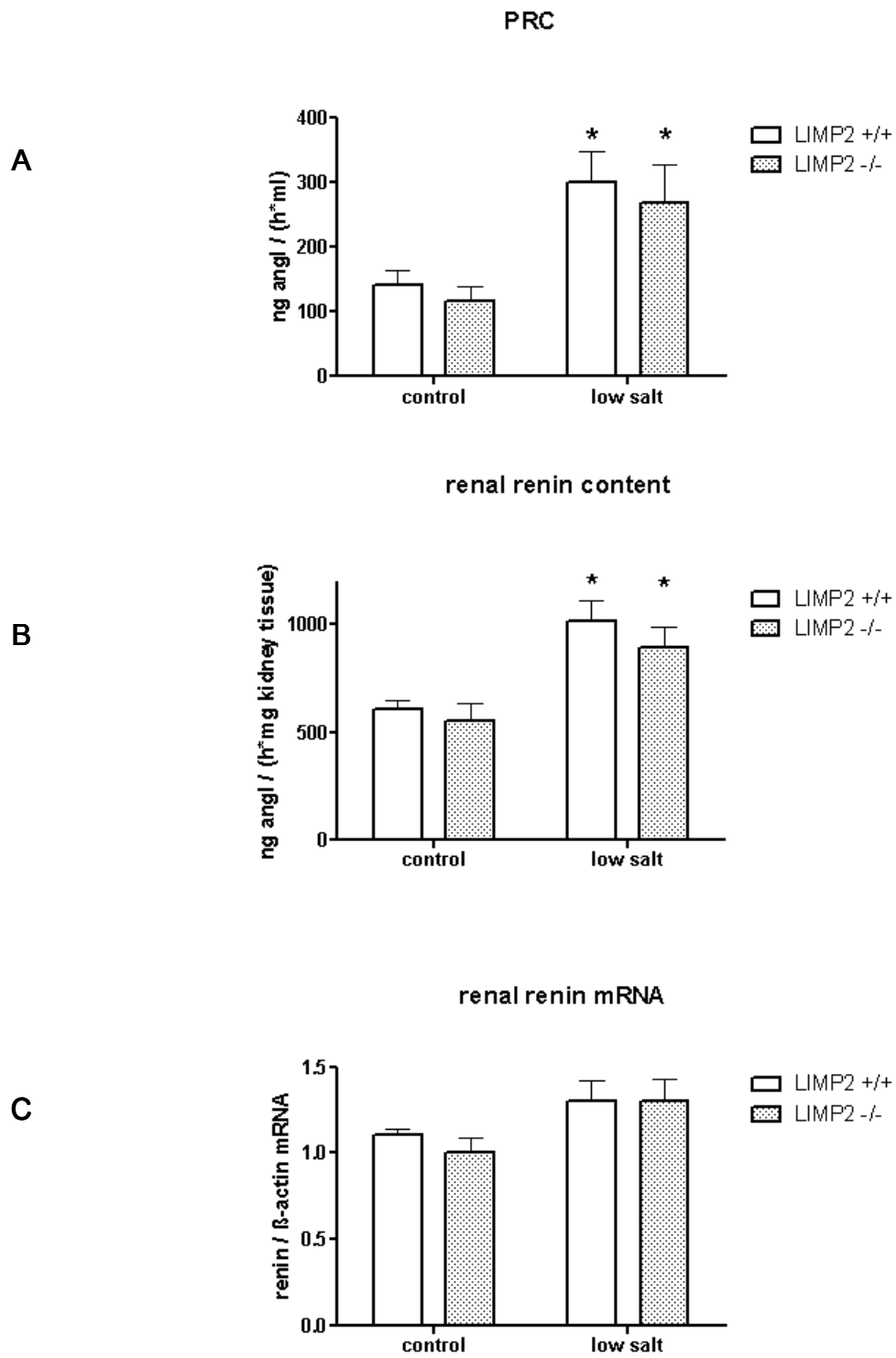


Abb. 3.9 PRC (A), renaler Reningehalt (B) und renale Renin mRNA Expression (C) in LIMP-2 KO und WT Mäusen unter Nidrigsalzdiät (low salt, 0,02% NaCl über 14 Tage). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.4 Stimulierung der Reninsynthese und -sekretion durch Niedrigsalzdiät und ACE-Hemmung

Im nächsten Experiment wurde durch eine Kombination aus low salt Diät und Enalaprilbehandlung die Reninsynthese und -freisetzung maximal stimuliert, um zu untersuchen, ob LIMP-2 unter diesen Bedingungen einen Einfluss auf das Reninsystem ausübt. Enalapril hebt durch die Hemmung der ACE-Bildung gleichzeitig die negative Rückkopplung auf, die ACE normalerweise auf die Reninfreisetzung ausübt. Dadurch fällt die hemmende ACE-Wirkung auf die Reninfreisetzung weg und das Reninsystem wird sehr stark stimuliert.

Die immunhistochemischen Ergebnisse aus Kap. 3.1 haben gezeigt, dass es bei Wildtypmäusen unter einer kombinierten Stimulation durch Low Salt Diät und Enalapril zu einer Zellrekrutierung entlang von Gefäßwänden kommt und in diesen Zellen neben dem starken Reninsignal auch ein deutliches zum Reninsignal deckungsgleiches LIMP-2 Signal auftauchte. Weiterhin wurde unter der Reninstimulation eine signifikante Erhöhung der Expression von LIMP-2 mRNA im Nierengewebe beobachtet (siehe Kap. 3.1.5).

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Stimulation durch Niedrigsalzdiät und Enalaprilgabe auf die PRC, den renalen Reningehalt und auf die renale Renin mRNA Expression bei LIMP-2 WT und KO Mäusen untersucht. Die Kontrollgruppe (N=6-7 pro Genotyp) wurde über 7 Tage mit normalem Futter (0,3% NaCl) gefüttert. Die zweite Gruppe (N=6-7 pro Genotyp) bekam Futter mit einer verminderten Salzkonzentration (0,02% NaCl) in Kombination mit Enalapril (10mg/kg KG über das Trinkwasser).

Bei stimulierten Wildtypen lag der Mittelwert der PRC beim 43fachen (5046 ± 2057) des Kontrollwertes ($116 \pm 11,2$). Stimulierte KO Mäuse hatten eine fast 70fach erhöhte PRC (11840 ± 2285) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($173 \pm 30,6$). Hier ist eine tendenziell stärkere Stimulation der PRC bei den Knockouts erkennbar ($p=0.06$). Bei der renalen Renin mRNA zeigte sich unter der Stimulation ebenfalls eine verstärkte Expression ($p=0.06$) bei Knockout Mäusen ($10,1 \pm 1,52$) im Vergleich zu

den Wildtypen ($6,52 \pm 0,8$) bei ähnlichen Kontrollwerten (WT: $0,98 \pm 0,24$; KO: $1,25 \pm 0,03$).

Der renale Reningehalt unterschied sich zwischen Wildtypen ($542 \pm 42,7$) und Knockouts ($532 \pm 41,1$) unter Kontrollbedingungen nicht. Unter Low Salt und Enalapril erhöhte er sich bei beiden Genotypen in ähnlicher Weise, so dass auch im stimulierten Zustand kein Unterschied zwischen Wildtypen (1636 ± 222) und Knockouts (1453 ± 297) bestand.

Die kombinierte Stimulation durch Low Salt Diät und Enalapril führte zu einer stärkeren Stimulation der PRC und Renin mRNA bei LIMP2 *knock outs*. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied beim renalen Reningehalt beobachtet (siehe Abb. 3.10).

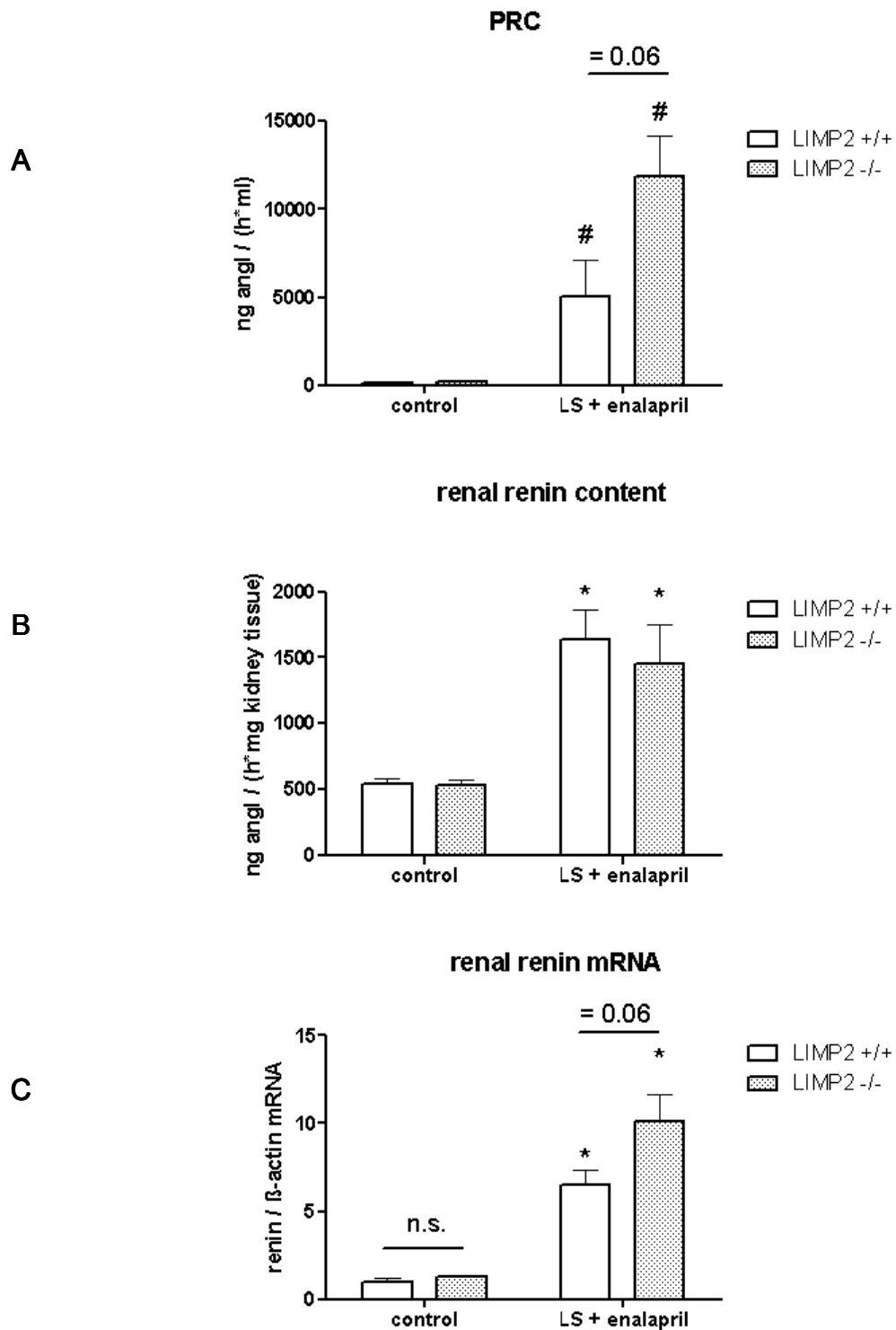


Abb. 3.10 Auswirkungen der Stimulation durch Nidrigsalzdiät (0,02% NaCl) und Enalaprilgabe (10mg/kg KG) auf die PRC (A), den renalen Reningehalt (B) und die renale Renin mRNA Expression (C). N=6-7 je Genotyp je Gruppe. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle. # $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.5 Zusammenfassung

Bei LIMP-2 Wildtypen und *knock out* Mäusen wurden keine Unterschiede in der Regulation der Reninsynthese und -sekretion festgestellt. Unter Kontrollbedingungen waren die Reninparameter PRC, mRNA und renaler Reningehalt bei beiden Genotypen gleich und sie reagierten in gleichem Maß auf akute (Isoproterenol) und chronische (Niedrigsalzdiät, Enalaprilgabe) Stimulation der Reninfreisetzung. Ein erkennbarer Einfluss von LIMP-2 auf die Reninfreisetzung konnte trotz der immunhistochemischen Experimente (Kap. 3.1), die eine deutliche Kolo-kalisation von LIMP-2 in JG-Zellen und die gemeinsame Regulation von LIMP-2 und Renin mRNA ergaben, nicht festgestellt werden.

3.2.6 Bestimmung der Proreninkonzentration im Nierengewebe und im Plasma bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen

Neben Renin, welches intrazellulär in den Reninvesikeln aus Prorenin gebildet wird, findet sich im Plasma sein Vorläufer Prorenin in ca. zehnfach höherer Konzentration (Campbell 2008). Wie eingangs erwähnt, besitzt Prorenin neben seiner klassischen Funktion als inaktive Reninvorstufe noch weitere Funktionen im Zusammenhang mit seiner Bindung an den Prorenin-/Reninrezeptor (PRR, siehe Kap. 1.1.8).

Die bisherigen Versuche haben deutlich gezeigt, dass LIMP-2 KO Mäuse eine normale PRC haben. Im weiteren Ablauf wurde bei den LIMP-2 *knockout* Mäusen deshalb untersucht, ob stattdessen die Proreninkonzentration im Plasma im Vergleich zu den Wildtypen verändert ist.

Prorenin wird mittels Trypsin zu Renin gespalten, um es damit indirekt mittels RIA messen zu können. Prorenin muss dabei möglichst spezifisch gespalten werden. In einem Vorversuch (siehe Kap. 2.2.1.2) wurden dazu diejenigen Bedingungen eruiert, unter denen es zu einer möglichst exklusiven Spaltung von Prorenin ohne gleichzeitige Spaltung von Renin in der Probe kommt. Es wurden eine Temperatur von 4°C, eine Trypsinkonzentration von 10mg/ml und eine Inkubationszeit für Trypsin von 4-6min ermittelt. Es konnten keine Unterschiede in der Proreninkonzentration bei

LIMP-2 *knockout* Mäusen ($204 \pm 65,5$) im Vergleich zu den Wildtypen ($193 \pm 50,6$) abgegrenzt werden (siehe Abb. 3.11 A). Auch der Vergleich des renalen Reningehaltes zwischen LIMP-2 Wildtypen (1377 ± 184) und LIMP-2 *knockouts* (1387 ± 154) lieferte keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 3.11 B).

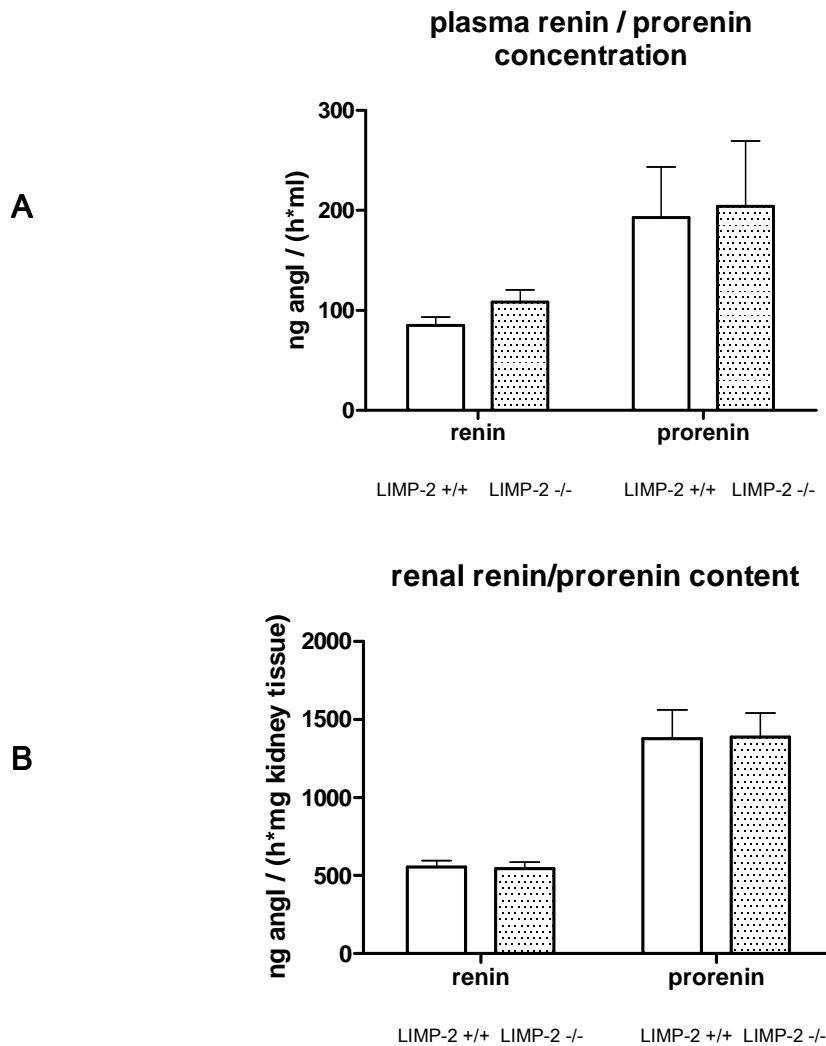


Abb. 3.11 Vergleich der PRC und Plasma-Proreninkonzentration (**A**) und des renalen Renin- und Proreningehaltes (**B**) zwischen LIMP-2 Wildtypen und LIMP-2 *knockouts*. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

3.2.7 Nicht-invasive Blutdruckmessung bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen

Betrachtet man die vorangegangenen Ergebnisse in der Gesamtschau, so ergeben sich keine relevanten Einflüsse von LIMP-2 auf die Bildung und die Freisetzung von Renin. Um dennoch mögliche Blutdruckveränderungen, die indirekten Einfluss auf das Reninsystem haben könnten, zu erfassen, wurde im nächsten Schritt der Blutdruck von LIMP-2 Wildtypen und LIMP-2 *knockout* Mäusen sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter Low Salt Diät verglichen.

Hierzu wurde der Blutdruck mittels der nicht invasiven „Tail Cuff Methode“ (siehe Kap. 2.2.2.4) über 3 Wochen bei einer Gruppe Weibchen (N=13, davon 7 KO) gemessen (siehe Tab. 3.1). Innerhalb der ersten Woche erfolgte eine Gewöhnung der Mäuse an die Messvorrichtung, es wurde täglich probeweise der Blutdruck gemessen, die Messwerte allerdings nicht in die Auswertung einbezogen. Ab der zweiten Woche wurde eine Hälfte der Gruppe unter Nidrigsalzdiät gesetzt (N=6, davon 3 KO) (0,02% NaCl, „Low Salt“). Die zweite Hälfte (N=6, davon 3 KO) erhielt als Kontrollgruppe eine Normalsalzdiät (0,3% NaCl, „Kontrolle“). Der Blutdruck wurde täglich zur gleichen Tageszeit gemessen.

Es ließen sich weder signifikante Blutdruckunterschiede zwischen WT und KO Mäusen ($p=0,9$ bei Kontrollwerten, $p=0,7$ unter LS-Bedingungen) noch zwischen Kontroll- und LS-Bedingungen ($p=0,6$ bei KO, $p=0,5$ bei WT Mäusen) feststellen.

Der Blutdruck blieb bei den Wildtypen wie auch bei den Knockouts sowohl unter Basal- als auch unter Stimulationsbedingungen unverändert.

	A		B	
	Kontrolle		Low Salt (LS)	
	<u>LIMP-2 KO</u>	<u>LIMP-2 WT</u>	<u>LIMP-2 KO</u>	<u>LIMP-2 WT</u>
Mittelwert [mmHg]	105,7	104,6	102,9	110,2
SEM	± 5,9	± 3,6	± 3,4	± 2,8
tTest KO vs. WT	0,9		0,7	
tTest Kontrolle vs. LS	0,6	0,5		

Tab. 3.1 Systolischer Blutdruck von LIMP-2 Wildtypen und LIMP-2 *knockout* Mäusen unter Kontrollbedingungen (**A**) und unter Low Salt Diät (0,02% NaCl, **B**).

3.2.8 Urinunteruschung bei LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen

Nachdem die Reninbildung und –freisetzung von LIMP-2 Wildtypen und Knockouts umfassend verglichen wurde, erfolgte ergänzend eine Untersuchung des Urins. Ausscheidungsstörungen bei LIMP-2 KO Mäusen sind bereits bekannt (Gamp, Tanaka et al. 2003; Reczek, Schwake et al. 2007; Berkovic, Dibbens et al. 2008; Desmond, Lee et al.).

Im Folgenden wurden Urinmasse, Urinosmolarität und Osmolytausscheidung, sowie Natrium- und Kaliumkonzentrationen und deren Ausscheidung im Urin von LIMP-2 WT und KO Mäusen bestimmt. Gelegentlich zeigte sich bei Mäusen bei der späteren Organentnahme eine Hydronephrose, die möglicherweise durch Harnleiterobstruktion bedingt war. Diese Mäuse wurden daher nicht in die Auswertung aufgenommen, um Ergebnisverzerrungen zu vermeiden.

Zwischen Männchen und Weibchen ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede bei den Ergebnissen. Es werden im Folgenden nur die Daten der Männchen dargestellt, die der Weibchen sind nicht gezeigt.

Die *knockout* Mäuse schieden mehr als doppelt so viel Urin aus wie die Wildtypen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,01$) bei der Urinmasse (siehe Abb 3.11 A) zwischen WT ($1,17 \pm 0,32$ g/24h) und KO ($2,75 \pm 0,34$ g/24h). Die Osmolarität (siehe Abb 3.11 B) war im Gegensatz zur Urinmasse bei *knockout* Mäusen ($1,37 \pm 0,05$ osmol/kg) gegenüber den Wildtypen ($3,64 \pm 0,60$ osmol/kg) stark vermindert, der Urin bei den Knockouts daher stark verdünnt. Folglich konnten bei der Osmolytausscheidung (Urinmasse x Osmolarität, siehe Abb 3.11 C) keine Unterschiede zwischen WT ($3,50 \pm 0,59$ mosmol/24h) und KO ($3,70 \pm 0,49$ mosmol/24h) gesehen werden.

Die Natrium- und Kaliumkonzentrationen waren bei den *knockout* Mäusen (Na^+ : $23,81 \pm 1,09$; K^+ : $25,00 \pm 1,35$ mmol/l) aufgrund der starken Verdünnung des Urins signifikant geringer ($p<0,05$) als bei den Wildtypen (Na^+ : $41,21 \pm 5,94$; K^+ : $79,33 \pm 12,65$ mmol/l). Natrium und Kalium wurden sowohl von Wildtypen (Na^+ : $48,33 \pm 12,95$; K^+ : $77,00 \pm 12,90$ mmol/l) als auch von Knockouts (Na^+ : $65,93 \pm 9,37$; K^+ : $69,18 \pm 9,62$ mmol/l) in ähnlicher Menge ausgeschieden.

LIMP-2 KO Mäuse scheiden also weit mehr Urin aus als die Wildtypen. Der Urin ist dabei stark hypoosmolar.

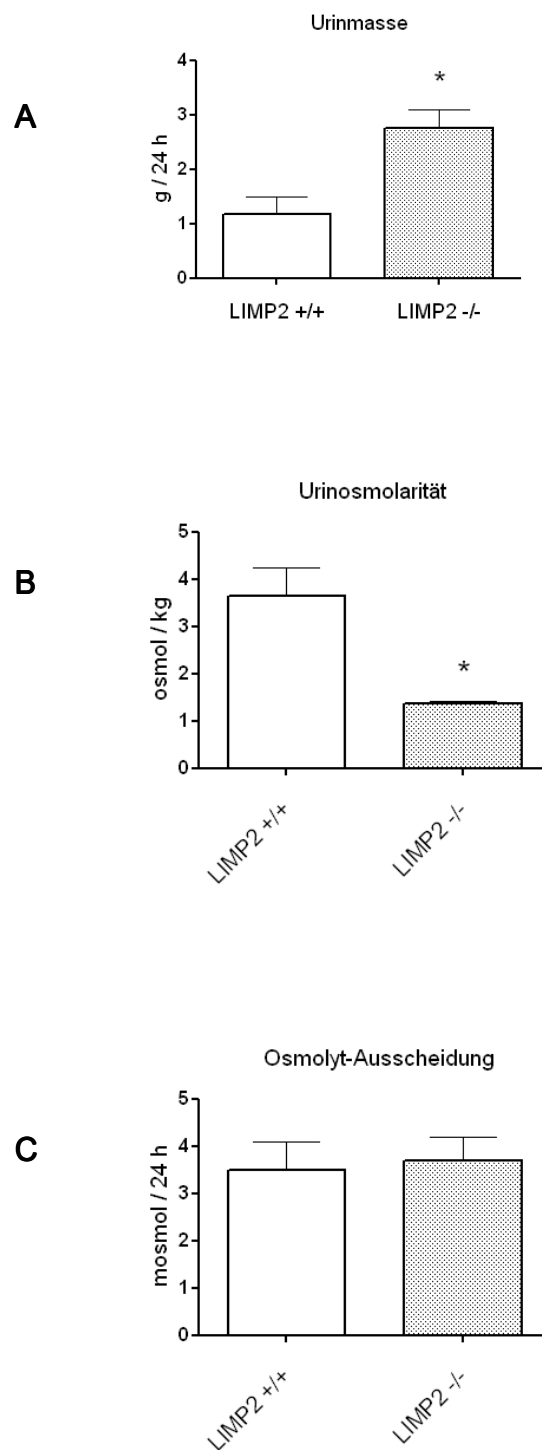


Abb. 3.12 Vergleich von Urinmasse [mg/24h] (A), Urinosmolarität [osmol/kg] (B) und Osmolytausscheidung [mosmol/24h] (C) zwischen LIMP-2 WT und LIMP-2 KO Mäusen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Einzelmessungen. * $p < 0,05$ gegenüber LIMP-2 WT.

3.3 *In vitro* Experimente

3.3.1 Bestimmung der Reninfreisetzung mittels ipN

In vivo konnten weder unter Kontrollbedingungen, noch nach akuten oder chronischen Stimulationsmanövern relevante Einflüsse des LIMP-2 Knockouts auf die Freisetzung von Renin und seine Konzentration im Plasma und im Nierengewebe festgestellt werden. Die relevanten Reninparameter wurden bislang unter systemischen Bedingungen *in vivo* untersucht und die bestimmten Werte waren daher alle durch den systemischen LIMP-2, bzw. LIMP-2 *knockout* Phänotyp abhängig. Die Reninbildung und -freisetzung wird zudem über viele Kontrollmechanismen lokal und systemisch beeinflusst, sodass ein möglicher Einfluss von LIMP-2 auch kompensiert werden könnte.

Um eine derartige systemische Einflüsse auszuschließen, wurde die Reninfreisetzung am Modell der „*isoliert perfundierten Niere*“ (ipN) untersucht. Die Nieren werden hierbei *ex situ* mit einem modifizierten Krebs-Henseleit Puffer nach Schweda et al. perfundiert (Schweda, Wagner et al. 2003).

Der Perfusionsdruck, der einen großen Einfluss auf die Reninsekretion ausübt, wird konstant gehalten. Der LIMP-2 Knockout wird mit dieser Methode auf die Niere eingegrenzt, die Reninsekretion unterliegt dabei keiner systemischen Beeinflussung.

Nach dem Start der Nierenperfusion mit dem Puffer stellen sich innerhalb von 20 Minuten stabile Verhältnisse bei der Durchblutung und der Reninfreisetzung ein. Es werden dann im Abstand von 2 Minuten Proben des venösen Effluates genommen und darin die basale Reninaktivität bestimmt. Im weiteren Verlauf wurde die Reninfreisetzung nacheinander durch Infusion von 10nM Isoproterenol, 30mM NaCl und Isoproterenol 10 nm + EGTA 3,1 mM stimuliert. Isoproterenol fördert als β -Agonist die Reninfreisetzung über die Stimulation der cAMP-Bildung, EGTA komplexiert Ca^{2+} als Hauptinhibitor der Reninfreisetzung. Eine kombinierte Infusion beider Reninstimulanzien sorgt somit für den Effekt einer maximalen Reninstimulation. NaCl

wirkt durch Erhöhung der intravasalen Osmolarität stimulierend auf JG-Zellen (Kurtz und Schweda 2006).

Es wurden 6-10min nach Start der Infusion Proben abgenommen und darin die Reninaktivität mittels RIA bestimmt.

Das ipN-Experiment wurde von Marlies Hamann (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) durchgeführt, die Proben wurden anschließend von mir analysiert (siehe Abb. 3.12).

Basal konnte auch unter Ausschluss systemischer Einflüsse keine unterschiedliche Reninsekretionsrate (= Reninaktivität x Flussrate) bei LIMP-2 Wildtypen ($24,1 \pm 6,1$) und Knockouts ($27,2 \pm 8,9$) gemessen werden. Bei NaCl Infusion kam es zu einem 3-4fachen Anstieg der Reninaktivität von Wildtypen ($75,4 \pm 23$) und Knockouts ($92,2 \pm 7,3$). Unter Isoproterenolgabe stieg die Reninsekretion sowohl bei den Wildtypen (435 ± 142) als auch bei den Knockouts (464 ± 246) sprunghaft an. Unterschiede in der Stimulierbarkeit waren aber auch hier nicht zu erkennen.

Unter maximaler Stimulation mittels Isoproterenol und dem Komplexbildner EGTA kam es zu einer weiteren Steigerung der Reninaktivität, welche die durch alleinige Isoproterenolstimulation provozierten Werte weit übertraf. Der Anstieg erfolgte auch hier bei Wildtypen (3228 ± 363) und Knockouts (3764 ± 466) gleichermaßen.

Der LIMP-2 Knockout führt auch unter Ausschluss systemischer Einflüsse zu keinen relevanten Unterschieden in der akuten Stimulierbarkeit der Reninfreisetzung *in vitro*.

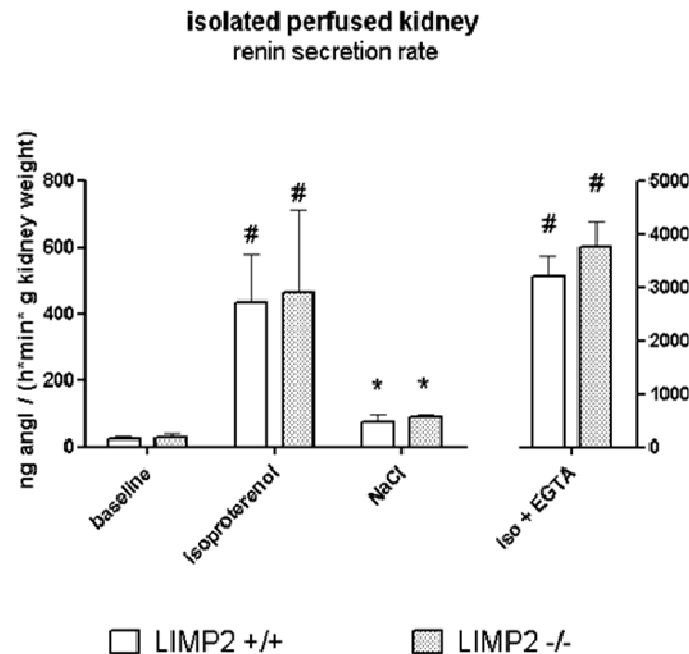


Abb. 3.13 Bestimmung der Reninaktivität bei isoliert perfundierter Niere unter Kontrollbedingungen (*baseline*), 10nM Isoproterenol, 30mM NaCl und 10nM Isoproterenol+ 3,1 nM EGTA. # $p < 0,001$ im Vergleich zur *baseline*, * $p < 0,05$ im Vergleich zur *baseline*. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4 Elektronenmikroskopischer Vergleich von JG-Zellen bei LIMP-2 WT und KO Mäusen

JG-Zellen von LIMP-2 KO Mäusen sind offenbar zu einer normalen Reninsekretion in der Lage. Die bisherigen Versuche gaben lediglich Aufschluss über die Sekretionsleistung der JG-Zellen. In diesem Experiment sollte deshalb mittels Elektronenmikroskopie ein möglicher Einfluss von LIMP-2 auf die Vesikelzahl und –morphologie innerhalb von JG-Zellen untersucht werden.

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse verdanke ich Frau Anita Zügner (Institut für Physiologie, Universität Regensburg), die die folgenden Bilder (siehe Abb. 3.13) erstellt hat.

Die Reninvesikel haben innerhalb einer Zelle unterschiedliche Größen und Formen, was durch unterschiedliche Anschnitte der jeweiligen Vesikel bedingt sein kann. Offensichtliche Unterschiede zwischen KO und WT waren nicht zu sehen, insbesondere keine Verminderung der Vesikelzahl, d.h. der elektronendichten Granulen, oder eine Veränderung der Vesikelgröße.

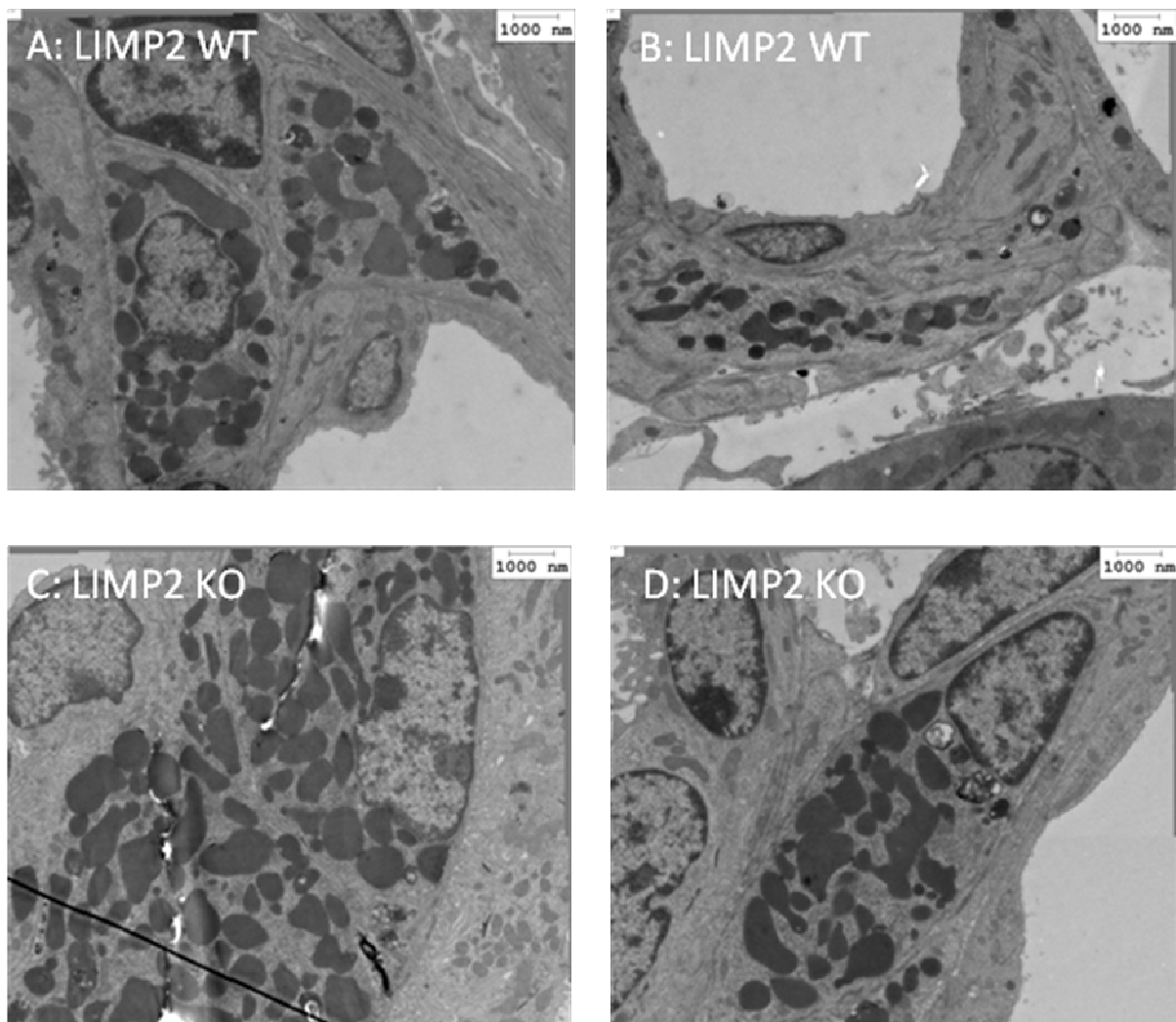


Abb. 3.14 Elektronenmikroskopischer Vergleich von JG-Zellen bei LIMP-2 Wildtypen (A,B) und LIMP-2 Knockouts (C,D). Die homogenen reninhaltigen Sekretionsvesikel sind dunkel angeschnitten. Der dargestellte Maßstab ist 1µm lang.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden das Vorkommen von LIMP-2 in der Niere, seine Rolle bei der Synthese und Freisetzung von Renin in JG-Zellen und sein Einfluss auf den systolischen Blutdruck untersucht. Es ist bereits bekannt, dass LIMP-2 einerseits als lysosomales Membranprotein wichtig für den Endosomen- und Lysosomenhaushalt ist und andererseits den vesikulären Stofftransport in Zellen beeinflusst. Da in zahlreichen Arbeiten zudem eine große Ähnlichkeit zwischen Lysosomen und Reninvesikeln festgestellt wurde, war die Rolle von LIMP-2 in Reninvesikeln von besonderem Interesse.

Mithilfe immunhistochemischer Experimente konnte in dieser Arbeit LIMP-2 in hohem Maße in JG-Zellen nachgewiesen werden. Die Häufung von LIMP-2 in JG-Zellen lässt vermuten, dass LIMP-2 ein Bestandteil der Membranen von Reninvesikeln ist, die in JG-Zellen in großen Mengen vorkommen (siehe Abb. 3.13). Normalerweise ist LIMP-2 in der Membran von Lysosomen lokalisiert. In JG-Zellen konnten klassische Lysosomen ohne Renin aber nur sehr schwer identifiziert werden (Taugner und Metz 1986). Es ist daher wahrscheinlich, dass JG-Zellen keine klassischen, sondern spezielle Lysosomen besitzen, welche Renin speichern und in denen die Aktivierung von Prorenin zu Renin erfolgt. LIMP-2 wäre in diesem Fall als Membranprotein innerhalb der JG-Zellen statt in klassischen Lysosomen in diesen lysosomenähnlichen Reninvesikeln lokalisiert. Diese Annahme stützt damit auch die Hypothese, dass Reninvesikel modifizierte Lysosomen sind.

Eine Hypothese zur Rolle von LIMP-2 in lysosomenähnlichen Reninvesikeln wäre ein M6P-Rezeptor-unabhängiger aber LIMP-2-abhängiger Renin- bzw. Prorenintransport, ähnlich dem von LIMP-2 vermittelten Transport der Protease β -GC (Reczek, Schwake et al. 2007), bei dem Renin, bzw. Prorenin mit Hilfe von LIMP-2 in die Reninvesikel transportiert würde. Da die Reninfreisetzung aber bei LIMP-2 *knock outs* nicht gestört ist, ist diese Vorstellung unwahrscheinlich. Es gibt indes Hinweise auf einen Einfluss des M6P-Rezeptors beim Renintransport: Prorenin wird M6P-

rezeptorvermittelt in kardiale Myozyten und Fibroblasten aufgenommen und dort zu Renin aktiviert (van Kesteren, Danser et al. 1997).

Im restlichen Nierengewebe wurde LIMP-2 nur vereinzelt im proximalen Tubulus und im Gefäßsystem gefunden. Die Lokalisation von LIMP-2 im proximalen Tubulus steht in Einklang mit den Ergebnissen von Desmond et al. von 2010, die in ihrer Arbeit einen essenziellen Einfluss von LIMP-2 beim Proteintransport in proximalen Tubuluszellen beschrieben hatten (Desmond, Lee et al. 2010). Berkovic et al. beschrieben bei LIMP-2 KO Nieren einen Verlust der Fußfortsätze von Podozyten (Berkovic, Dibbens et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte LIMP-2 jedoch nicht in Podozyten lokalisiert werden, stattdessen zeigte sich eine LIMP-2 Färbung in Mesangialzellen. LIMP-2 konnte zudem in den Gefäßwänden von peritubulären Kapillaren identifiziert werden. Außerdem zeigte sich bei der Urinanalyse bei LIMP-2 *knockout* Mäusen im Gegensatz zu den Wildtypen eine hypoosmolare Polyurie. Der Grund hierfür könnte in einer gestörten Rückresorption von Stoffen aus dem Primärharn ins Tubulussystem liegen. Möglicherweise sind bei LIMP-2 knockout Mäusen die peritubulären Kapillaren beeinträchtigt.

Unter Stimulationsbedingungen wird die LIMP-2 mRNA in gleichem Maße wie die Renin mRNA hochreguliert und LIMP-2 wird offensichtlich vermehrt synthetisiert. Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass bei vermehrter Reninbildung und -freisetzung auch verstärkt LIMP-2 für den Einbau in Reninvesikel benötigt wird. Denkbar wäre daher eine Rolle von LIMP-2 beim intrazellulären Vesikelhaushalt. LIMP-2 könnte möglicherweise, in Analogie zu seinem Effekt in den Zellen des proximalen Tubulus, eine Rolle bei der Fusion von Vesikeln spielen: Während der Reifung von Reninvesikeln fusionieren sog. Protogranulen miteinander und mit Intermediägranulen, wobei schließlich große reife Reninvesikel entstehen (Taugner und Hackenthal 1988). Eine spezifische Rolle von LIMP-2 bei der Fusion von Endosomen mit Lysosomen ist bereits mehrfach beschrieben worden (Kuronita, Eskelinen et al. 2002; Desmond, Lee et al. 2010) (Vgl. Kap. 1.2.1). LIMP-2 könnte auf ähnliche Weise auch die Fusion von Reninvesikeln und deren Transport zur

Zellmembran mit regulieren. Zumindest spricht die starke Stimulation der LIMP-2 mRNA im Zuge der Reninstimulation dafür, dass LIMP-2 als Membranprotein in neu gebildeten Reninvesikeln verstärkt benötigt wird.

Bei LIMP-2 *knockout* Mäusen ist das immunhistochemische Reninsignal allerdings nicht vermindert. Offenbar bilden LIMP-2 *knock out* Mäuse unverändert Renin und setzen normale Reninkonzentrationen ins Plasma frei. Unter Kontrollbedingungen sowie nach akuten (Isoproterenol) und chronischen (Niedrigsalzdiät und ACE-Hemmung) Stimulationsmaßnahmen ließen sich *in vivo* bei LIMP-2 *knockout* Mäusen keine Reninparameter (PRC, renaler Reningehalt, Renin mRNA) nachweisen, die von den Werten der Wildtyp-Mäuse signifikant abwichen. Dementsprechend ist auch der systolische Blutdruck bei LIMP-2 *knock out* Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen unter Kontrollbedingungen und nach Niedrigsalzdiät nicht verändert. Auch morphologisch sind bei LIMP-2 *knock out* Nieren keine Veränderungen feststellbar: Die Reninvesikel von JG-Zellen sind in Anzahl und Größe identisch mit denen der Wildtypmäuse. Die Vesikelbildung und -freisetzung scheint daher bei LIMP-2 *knockout* Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein.

Der eingangs beschriebene systemische LIMP-2 *knockout* Phänotyp könnte die Reninbildung und -sekretion verfälschen. Um einen solchen Einfluss auszuschließen, wurden anschließend *in vitro* Experimente mit dem Modell der isoliert perfundierten Niere durchgeführt. Auch hier konnten weder nach Stimulation mit Isoproterenol noch nach einer Erhöhung der Plasmaosmolarität keine Unterschiede in der Bildung und Freisetzung von Renin zwischen Wildtypen und knockouts erkannt werden.

Eine essenzielle Rolle von LIMP-2 bei der Reninfreisetzung erscheint in Anbetracht der bisherigen Ergebnisse unwahrscheinlich und die im Vergleich zu Wildtypmäusen unveränderten Renin-Blutkonzentrationen der *knock out* Mäuse belegen das eindrücklich. Alternativ ist eine Rolle von LIMP-2 bei der Rückführung von Vesikelmembranen nach erfolgter Reninfreisetzung mittels Exozytose denkbar. Friis et al. konnten mithilfe von Kapazitätsmessungen an Membranen von JG-Zellen eine hohe Exo- und Endozytoseaktivität dieser Zellen nachweisen (Friis, Jensen et al. 1999).

Dass JG-Zellen endozytotisch aktiv sind, ist schon länger bekannt: JG-Zellen sind in der Lage, die lysosomalen Marker HRP (*horseradish peroxidase*) und CF (*cationized ferritin*) in ihr Zytoplasma aufzunehmen (Taugner und Metz 1986). LIMP-2 könnte an dieser Rückführung von Vesikelmembranen in die Zellmembran auf ähnliche Weise beteiligt sein, wie es auch die Fusion von Endosomen mit Lysosomen koordiniert. Um eine derartige Hypothese zu stützen, müssten Kapazitätsmessungen an JG-Zellen von LIMP-2 *knock out* Mäusen durchgeführt werden.

Die oben genannten Befunde sprechen gegen eine Schlüsselrolle von LIMP-2 bei der Reninfreisetzung. LIMP-2 ist demnach nicht zwingend für die Reninbildung und – freisetzung von Bedeutung. Die molekularen Mechanismen, die dem Transport von (Pro)renin innerhalb der Zelle und der Exozytose von Reninvesikeln zugrunde liegen sind bisher nicht befriedigend geklärt. Ein erkennbarer Einfluss von LIMP-2 auf das Reninsystem konnte nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Tatsache kann entweder angenommen werden, dass der Ausfall von LIMP-2 die Reninbildung 1) tatsächlich nicht beeinträchtigt oder 2) dass die Rolle von LIMP-2 bei der Reninbildung ersetzbar ist und bei *knock out* Mäusen durch andere regulierende Mechanismen wie etwa eine Hochregulierung anderer Membranproteine (LIMP-1, LAMP) kompensiert wird. Ein möglicher Effekt von LIMP-2 auf das Reninsystem kann daher nicht ausgeschlossen werden, auch wenn er mit den hier angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte.

Unklar bleibt auch, ob bzw. inwieweit die kontinuierliche Proreninfreisetzung von Prorenin ins Blut durch LIMP-2 kontrolliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwar keine signifikanten Unterschiede der Proreninkonzentration zwischen LIMP-2 Wildtypen und LIMP-2 knockouts gesehen. Allerdings waren die Proreninkonzentrationen der untersuchten Mausgruppen sehr gering. Ob LIMP-2 die Proreninkonzentration beeinflusst, ist prinzipiell sehr interessant. Immerhin werden (beim Menschen) drei Viertel des Prorenins über den kontinuierlichen Weg direkt ins Plasma freigesetzt und nur ca. 25 % reguliert in Form von Renin sezerniert. In diesem Fall hätte LIMP-2 möglicherweise keinen Einfluss auf das Reninsystem,

sondern auf die Wirkung von Prorenin, die sehr komplex aber bisher noch weitgehend unverstanden ist. LIMP-2 könnte auf das Proreninsystem entweder direkt über Prorenin wirken oder möglicherweise über den Proreninrezeptor (PRR). Der PRR kommt in der Niere in Gefäßen, Glomeruli und im Tubulussystem vor (Huang und Siragy 2012). Advani et al. zeigten in der Niere eine Kollokalisierung des PRR mit der V-ATPase, die für die pH-Kontrolle innerhalb von Zellen und Vesikeln verantwortlich ist (Advani, Kelly et al. 2009). Diese Assoziation scheint überdies für die Stabilität und Funktion der Podozyten eine immense Bedeutung zu haben (Oshima, Kinouchi et al.; Riediger, Quack et al.). LIMP-2 ist ebenso wie die V-ATPase ein Membranprotein in sauren Kompartimenten, es ist mit Renin kolokalisiert, beeinflusst Renin aber offenbar nicht. Eine immunhistochemische Kofärbung von LIMP-2 mit Prorenin und dem Proreninrezeptor in der Niere wäre deshalb ein interessanter Ansatz, um eine potenzielle Rolle von LIMP-2 im Proreninsystem zu überprüfen.

Die Resultate dieser Arbeit machen deutlich, dass LIMP-2 bei der Bildung und Freisetzung von Renin keinen Einfluss ausübt oder zumindest entbehrlich ist. Nichtsdestotrotz weist die starke Koexpression von LIMP-2 in Reninvesikeln und seine Koregulation mit Renin auf die lysosomalen Eigenschaften von Reninvesikeln hin und unterstützt damit die Ergebnisse früherer Studien.

5. Kurzfassung der Arbeit

Das Enzym Renin ist das Schlüsselprotein zur Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts im Körper. Es wird in Vesikelform auf zwei verschiedenen Wegen aus juxtaglomerulären Zellen der Niere freigesetzt und unterliegt dabei einer Reihe lokaler und systemischer Kontroll- und Einflussfaktoren. Es ist bekannt, dass Reninvesikel lysosomale Eigenschaften besitzen und das Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Rolle des lysosomalen Membranproteins LIMP-2 bei der Reninbildung und -freisetzung zu analysieren, sowie seine Lokalisierung in der Niere zu charakterisieren. Weiterhin wurde der Einfluss von LIMP-2 auf die Regulation des systolischen Blutdrucks untersucht.

Mittels Immunhistochemie wurde LIMP-2 eindeutig und nahezu ausschließlich in JG-Zellen lokalisiert. Nach Stimulation von Renin kolokalisierte LIMP-2 mit Renin in reninbildenden Zellen. Die Signale der beiden Proteine sind gekoppelt und verhalten sich nach Stimulation ähnlich. *Real time* PCR Experimente bestätigten diesen Befund: Die Expression der mRNA für Renin und LIMP-2 war unter Stimulation signifikant erhöht. Bei LIMP-2 *knock out* Mäusen konnte hingegen immunhistochemisch kein vermindertes Reninsignal festgestellt werden.

In weiteren Versuchen wurde die Reninproduktion von LIMP-2 *knock out* und Wildtyp Mäusen *in vivo* verglichen. Nach Analyse der Plasmapreninkonzentration, der Renin mRNA Expression und des renalen Reningehalts waren keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Mausgruppen erkennbar, weder unter Basalbedingungen noch während Reninstimulation (durch Isoproterenol, ACE-Hemmung durch Enalaprilgabe, sowie Niedrigsalzdiät). Auch beim Vergleich des systolischen Blutdrucks von *knock out* und Wildtyp-Mäusen ließen sich keine Unterschiede feststellen. Diesen *in vivo* Befunden entsprechen *in vitro* Messungen der Reninfreisetzung an isoliert perfundierten Nieren unter Ausschluss systemischer Einflüsse. Auch hier konnte bei LIMP-2 *knock out* Mäusen keine veränderte Plasmapreninkonzentration gemessen werden. Darüber hinaus konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt

werden, dass sich die Reninvesikel in juxtaglomerulären Zellen von *knock out* und Wildtypmäusen in Größe und Anzahl nicht unterscheiden, so dass sich neben den oben genannten negativen funktionellen Ergebnissen auch morphologisch kein Anhalt für einen essenziellen Einfluss von LIMP-2 auf die Vesikelbildung, bzw. den intrazellulären Renintransport ergibt.

Insgesamt ließ sich mit den genannten Methoden kein erkennbarer Einfluss von LIMP-2 auf das Reninsystem und damit auf die Blutdruckregulation nachweisen. Zwar werden LIMP-2 und Renin unter Stimulation gleichermaßen reguliert, LIMP-2 übt allerdings keinen signifikanten Effekt auf die Plasmakonzentration von Renin und Prorenin aus. Die deutliche Koexpression von LIMP-2 und Renin liefert weitere Hinweise dafür, dass Reninvesikel lysosomaler Natur sind.

6. Literaturverzeichnis

- Abel, K. J. and K. W. Gross (1988). "Close physical linkage of the murine Ren-1 and Ren-2 loci." Nucleic Acids Res **16**(5): 2111-26.
- Advani, A., D. J. Kelly, et al. (2009). "The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney." Hypertension **54**(2): 261-9.
- Barajas, L., L. Liu, et al. (1992). "Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin." Can J Physiol Pharmacol **70**(5): 735-49.
- Beavo, J. A. (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms." Physiol Rev **75**(4): 725-48.
- Bell, P. D., J. Y. Lapointe, et al. (2003). "Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4322-7.
- Berkovic, S. F., L. M. Dibbens, et al. (2008). "Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis." Am J Hum Genet **82**(3): 673-84.
- Bing, J. and K. Poulsen (1979). "Differences in renal and submaxillary renin release after stimulation with isoprenaline and noradrenaline." Acta Physiol Scand **105**(1): 58-63.
- Bodin, P. and G. Burnstock (2001). "Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular." J Cardiovasc Pharmacol **38**(6): 900-8.
- Boivin, V., R. Jahns, et al. (2001). "Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney." Kidney Int **59**(2): 515-31.
- Brown, R., A. Ollerstam, et al. (2001). "Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(5): R1362-7.

- Burckle, C. A., A. H. Jan Danser, et al. (2006). "Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats." Hypertension **47**(3): 552-6.
- Campbell, D. J. (2008). "Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research." Hypertension **51**(5): 1259-64.
- Campean, V., F. Theilig, et al. (2003). "Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse)." Am J Physiol Renal Physiol **285**(1): F19-32.
- Cantin, M., M. D. Araujo-Nascimento, et al. (1977). "Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study." Am J Pathol **87**(3): 581-602.
- Castrop, H. (2007). "Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine." Acta Physiol (Oxf) **189**(1): 3-14.
- Castrop, H., K. Höcherl, et al. (2010). "Physiology of kidney renin." Physiol Rev **90**(2): 607-73.
- Castrop, H., Y. Huang, et al. (2004). "Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice." J Clin Invest **114**(5): 634-42.
- Churchill, P. C. and M. C. Churchill (1985). "A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices." J Pharmacol Exp Ther **232**(3): 589-94.
- Churchill, P. C., M. C. Churchill, et al. (1983). "Evidence that beta 1-adrenoceptor activation mediates isoproterenol-stimulated renin secretion in the rat." Endocrinology **113**(2): 687-92.
- Clark, A. F., M. G. Sharp, et al. (1997). "Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology." J Biol Chem **272**(29): 18185-90.
- de Duve, C. (1983). "Lysosomes revisited." Eur J Biochem **137**(3): 391-7.

- Desmond, M. J., D. Lee, et al. (2010). "Tubular proteinuria in mice and humans lacking the intrinsic lysosomal protein SCARB2/Limp-2." Am J Physiol Renal Physiol **300**(6): F1437-47.
- DiBona, G. F. (2000). "Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(5): R1517-24.
- Dickinson, D. P., K. W. Gross, et al. (1984). "Evolution and variation of renin genes in mice." Genetics **108**(3): 651-67.
- Ekker, M., D. Tronik, et al. (1989). "Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5155-8.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, et al. (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." Trends Cell Biol **13**(3): 137-45.
- Febbraio, M., D. P. Hajjar, et al. (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." J Clin Invest **108**(6): 785-91.
- Feldt, S., W. W. Batenburg, et al. (2008). "Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide." Hypertension **51**(3): 682-8.
- Field, L. J. and K. W. Gross (1985). "Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6196-200.
- Field, L. J., R. A. McGowan, et al. (1984). "Tissue and gene specificity of mouse renin expression." Hypertension **6**(4): 597-603.
- Friis, U. G., B. L. Jensen, et al. (1999). "Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells." Circ Res **84**(8): 929-36.
- Friis, U. G., B. L. Jensen, et al. (2002). "Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases." Circ Res **90**(9): 996-1003.
- Fukamizu, A., K. Nishi, et al. (1988). "Structure of the rat renin gene." J Mol Biol **201**(2): 443-50.

- Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." J Biol Chem **266**(32): 21327-30.
- Gamp, A. C., Y. Tanaka, et al. (2003). "LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice." Hum Mol Genet **12**(6): 631-46.
- Gerber, J. G., R. A. Branch, et al. (1979). "Influence of hypertonic saline on canine renal blood flow and renin release." Am J Physiol **237**(6): F441-6.
- Griffiths, G., R. Back, et al. (1989). "A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 2703-20.
- Grünberger, C., B. Obermayer, et al. (2006). "The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6." Circ Res **99**(11): 1197-206.
- Hackenthal, E., M. Paul, et al. (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-116.
- Hansen, P. B., T. Yang, et al. (2004). "Plasma renin in mice with one or two renin genes." Acta Physiol Scand **181**(4): 431-7.
- Holmer, S. R., B. Kaissling, et al. (1997). "Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo." J Hypertens **15**(12 Pt 1): 1471-9.
- Honing, S. and W. Hunziker (1995). "Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-1) in MDCK cells." J Cell Biol **128**(3): 321-32.
- Huang, J. and H. M. Siragy (2012). "Sodium depletion enhances renal expression of (pro)renin receptor via cyclic GMP-protein kinase G signaling pathway." Hypertension **59**(2): 317-23.
- Huang, Y., S. Wongamorntham, et al. (2006). "Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms." Kidney Int **69**(1): 105-13.
- Inscho, E. W. (2001). "P2 receptors in regulation of renal microvascular function." Am J Physiol Renal Physiol **280**(6): F927-44.

- Inscho, E. W., A. K. Cook, et al. (1996). "Pressure-mediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoceptor activation." Am J Physiol **271**(5 Pt 2): F1077-85.
- Kaneshiro, Y., A. Ichihara, et al. (2007). "Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats." J Am Soc Nephrol **18**(6): 1789-95.
- Kim, S. M., D. Mizel, et al. (2006). "Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion." Am J Physiol Renal Physiol **290**(5): F1016-23.
- Kirchner, K. A., T. A. Kotchen, et al. (1978). "Importance of chloride for acute inhibition of renin by sodium chloride." Am J Physiol **235**(5): F444-50.
- Klar, J., P. Sandner, et al. (2002). "Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells." Pflugers Arch **444**(3): 335-44.
- Kobori, H., M. Nangaku, et al. (2007). "The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease." Pharmacol Rev **59**(3): 251-87.
- Komlosi, P., J. Peti-Peterdi, et al. (2004). "Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake." Am J Physiol Renal Physiol **286**(6): F1054-8.
- Krieger, M. (2001). "Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems." J Clin Invest **108**(6): 793-7.
- Kuronita, T., E. L. Eskelinen, et al. (2002). "A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology." J Cell Sci **115**(Pt 21): 4117-31.
- Kurtz, A. (1989). "Cellular control of renin secretion." Rev Physiol Biochem Pharmacol **113**: 1-40.
- Kurtz, A., R. Della Bruna, et al. (1988). "Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release." Kidney Int **33**(4): 798-803.

- Kurtz, A. and F. Schweda (2006). "Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools." Am J Physiol Renal Physiol **290**(4): F797-805.
- Kurtz, A. and C. Wagner (1998). "Role of nitric oxide in the control of renin secretion." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): F849-62.
- Lorenz, J. N., T. A. Kotchen, et al. (1990). "Effect of Na and Cl infusion on loop function and plasma renin activity in rats." Am J Physiol **258**(5 Pt 2): F1328-35.
- Lorenz, J. N., H. Weihprecht, et al. (1991). "Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): F486-93.
- Luetscher, J. A., F. B. Kraemer, et al. (1985). "Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications." N Engl J Med **312**(22): 1412-7.
- Majid, D. S., E. W. Inscho, et al. (1999). "P2 purinoceptor saturation by adenosine triphosphate impairs renal autoregulation in dogs." J Am Soc Nephrol **10**(3): 492-8.
- Matsuba, H., T. Watanabe, et al. (1989). "Immunocytochemical localization of prorenin, renin, and cathepsins B, H, and L in juxtaglomerular cells of rat kidney." J Histochem Cytochem **37**(11): 1689-97.
- Meneton, P., I. Ichikawa, et al. (2000). "Renal physiology of the mouse." Am J Physiol Renal Physiol **278**(3): F339-51.
- Mercure, C., I. Jutras, et al. (1996). "Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex." Hypertension **28**(5): 840-6.
- Motoyoshi, Y., T. Matsusaka, et al. (2008). "Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria." Kidney Int **74**(10): 1262-9.

- Mundel, P., S. Bachmann, et al. (1992). "Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells." Kidney Int **42**(4): 1017-9.
- Mundel, P., H. W. Heid, et al. (1997). "Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes." J Cell Biol **139**(1): 193-204.
- Neves, F. A., K. G. Duncan, et al. (1996). "Cathepsin B is a prorenin processing enzyme." Hypertension **27**(3 Pt 2): 514-7.
- Nguyen, G., F. Delarue, et al. (1996). "Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen." Kidney Int **50**(6): 1897-903.
- Nguyen, G., F. Delarue, et al. (2002). "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin." J Clin Invest **109**(11): 1417-27.
- Nguyen, G. and D. N. Müller (2010). "The biology of the (pro)renin receptor." J Am Soc Nephrol **21**(1): 18-23.
- O'Shaughnessy, K. M. and F. E. Karet (2004). "Salt handling and hypertension." J Clin Invest **113**(8): 1075-81.
- Oppermann, M., D. J. Friedman, et al. (2008). "Tubuloglomerular feedback and renin secretion in NTPDase1/CD39-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol **294**(4): F965-70.
- Oshima, Y., K. Kinouchi, et al. (2011). "Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function." J Am Soc Nephrol **22**(12): 2203-12.
- Peti-Peterdi, J., A. Fintha, et al. (2004). "Real-time imaging of renin release in vitro." Am J Physiol Renal Physiol **287**(2): F329-35.
- Peti-Peterdi, J., P. Komlosi, et al. (2003). "Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells." J Clin Invest **112**(1): 76-82.
- Pratt, R. E., J. E. Carleton, et al. (1987). "Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(22): 7837-40.

- Rasch, R., B. L. Jensen, et al. (1998). "Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system." Cell Tissue Res **292**(3): 563-71.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." Cell **131**(4): 770-83.
- Riediger, F., I. Quack, et al. (2011). "Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival." J Am Soc Nephrol **22**(12): 2193-202.
- Roselli, S., L. Heidet, et al. (2004). "Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice." Mol Cell Biol **24**(2): 550-60.
- Satofuka, S., A. Ichihara, et al. (2006). "Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(6): 2686-92.
- Schmid, J., M. Oelbe, et al. (2013). "Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane protein 2 in renin-producing cells: further evidence for a lysosomal nature of renin secretory vesicles." Pflügers Arch **465**(6):895-905.
- Schnermann, J. and D. Z. Levine (2003). "Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide." Annu Rev Physiol **65**: 501-29.
- Schroen, B., J. J. Leenders, et al. (2007). "Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy." J Exp Med **204**(5): 1227-35.
- Schweda, F., U. Friis, et al. (2007). "Renin release." Physiology (Bethesda) **22**: 310-9.
- Schweda, F. and A. Kurtz (2004). "Cellular mechanism of renin release." Acta Physiol Scand **181**(4): 383-90.
- Schweda, F. and A. Kurtz (2009). "Regulation of renin release by local and systemic factors." Rev Physiol Biochem Pharmacol **161**: 1-44.
- Schweda, F., F. Segerer, et al. (2005). "Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors." Hypertension **46**(4): 780-6.

- Schweda, F., C. Wagner, et al. (2003). "Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice." Am J Physiol Renal Physiol **284**(4): F770-7.
- Sequeira Lopez, M. L., E. S. Pentz, et al. (2004). "Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened." Dev Cell **6**(5): 719-28.
- Skott, O. (1986). "Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles." Pflugers Arch **407**(1): 41-5.
- Skott, O. and J. P. Briggs (1987). "Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion." Science **237**(4822): 1618-20.
- Stankovic, A. R., N. D. Fisher, et al. (2006). "Prorenin and angiotensin-dependent renal vasoconstriction in type 1 and type 2 diabetes." J Am Soc Nephrol **17**(12): 3293-9.
- Sun, D., L. C. Samuelson, et al. (2001). "Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9983-8.
- Taugner, C., K. Poulsen, et al. (1979). "Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney." Histochemistry **62**(1): 19-27.
- Taugner, R. and E. Hackenthal (1988). "On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells." Int Rev Cytol **110**: 93-131.
- Taugner, R., E. Hackenthal, et al. (1982). "Vascular and tubular renin in the kidneys of mice." Histochemistry **75**(4): 473-84.
- Taugner, R. and R. Metz (1986). "Development and fate of the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells." Cell Tissue Res **246**(3): 595-606.
- Taugner, R., A. Whalley, et al. (1985). "Are the renin-containing granules of juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes?" Cell Tissue Res **239**(3): 575-87.

- Thurau, K. and J. Schnermann (1965). "[The Sodium Concentration In The Macula Densa Cells As A Regulating Factor For Glomerular Filtration (Micropuncture Experiments)]." Klin Wochenschr **43**: 410-3.
- Toffelmire, E. B., K. Slater, et al. (1989). "Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay." J Clin Invest **83**(2): 679-87.
- van Kesteren, C. A., A. H. Danser, et al. (1997). "Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells." Hypertension **30**(6): 1389-96.
- Wagner, C. and A. Kurtz (1998). "Regulation of renal renin release." Curr Opin Nephrol Hypertens **7**(4): 437-41.
- Wilcox, C. S., W. J. Welch, et al. (1992). "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11993-7.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
β-GC	beta-Glucocerebrosidase
A	Adenin
Aa.	Arteriae (Plural von Arteria – Arterie)
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ADH	Antidiuretisches Hormon
AMRF	<i>action myoclonus renal failure syndrome</i>
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	<i>cationized ferritin</i> (Kationisiertes Ferritin)
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK 1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase 1 bzw. 2</i>
FSGS	Fokal Segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
G	Guanin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gll.	Glandulae (Plural von Glandula – Drüse)
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ipN	Isoliert Perfundierte Niere
JG bzw. JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
k	Kilo
Kap.	Kapitel

KG	Körpergewicht
KO	<i>knock out</i>
l	Liter
LAMP	<i>lysosomal associated protein</i>
LIMP-1, LIMP-2	<i>lysosomal integral membrane proteine type 1 bzw. 2</i>
LS	<i>low salt</i>
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MD	Macula Densa
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
p	Piko
PDE3, PDE4	Phosphodieesterase 3 bzw. 4
PKC	Proteinkinase C
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	(Pro)Renin-Rezeptor
PRC	<i>plasma renin concentration</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	<i>radio immuno assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen Pro Minute
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	<i>real time</i> PCR
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T	Thymin
T3	Trijodthyronin
Tab.	Tabelle
TGF-β1	<i>transforming growth factor β1</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat
Vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

7.2 Immunhistochemische Abbildungen

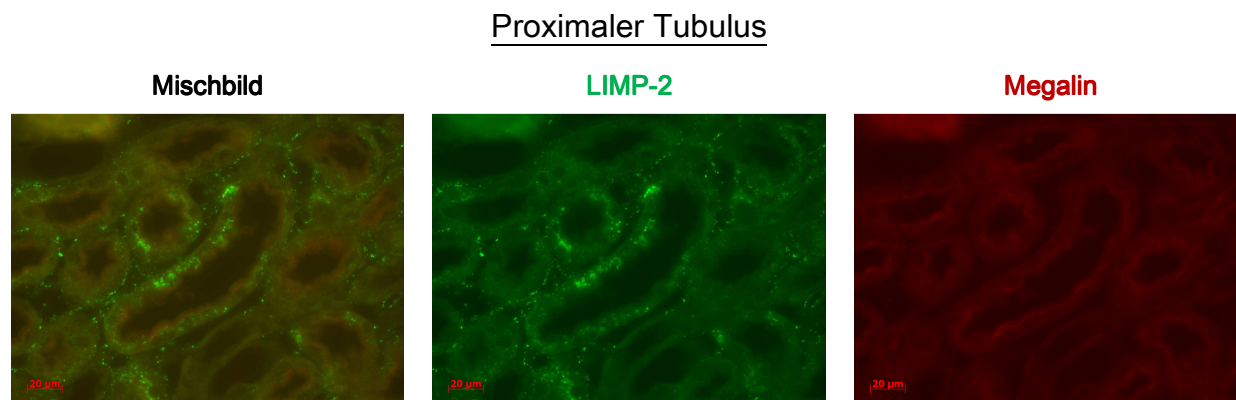


Abb.7.1 Kofärbung LIMP-2 mit Megalin. LIMP-2 ist im Zytoplasma der Zellen des proximalen Tubulus deutlich zu erkennen. In anderen Schnitten (hier nicht gezeigt) fehlte LIMP-2 in den gleichen Zellen jedoch vollständig. Möglicherweise sind die abgebildeten Tubuluszellen stoffwechselaktiver als die Zellen ohne LIMP-2 Färbung.

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Megalin [Proximaler Tubulus], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-guineapig [Megalin, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung)

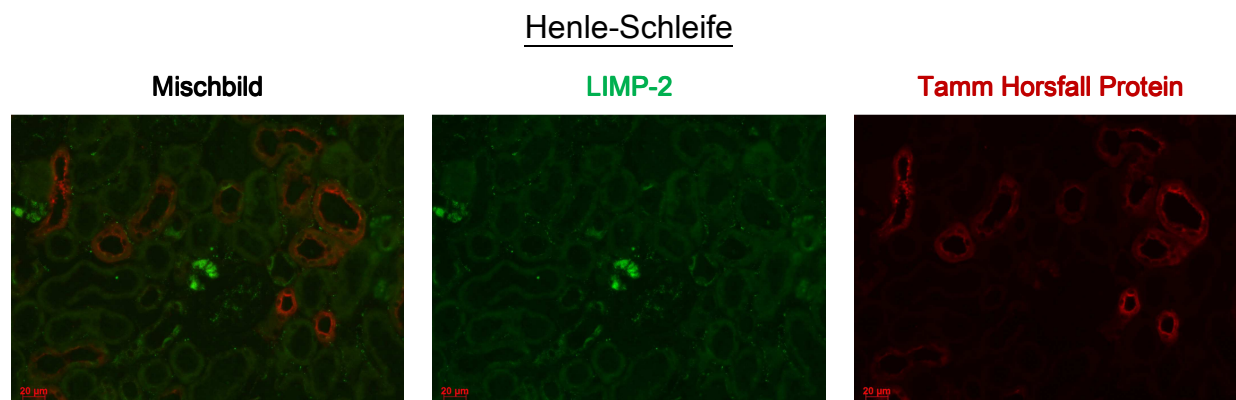


Abb.7.2 Kofärbung LIMP-2 mit Tamm-Horsfall Protein. In der Henle-Schleife ist eine sehr schwache LIMP-2 Färbung erkennbar.

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Tamm Horsfall Protein [Henle-Schleife], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Tamm Horsfall Protein, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung)

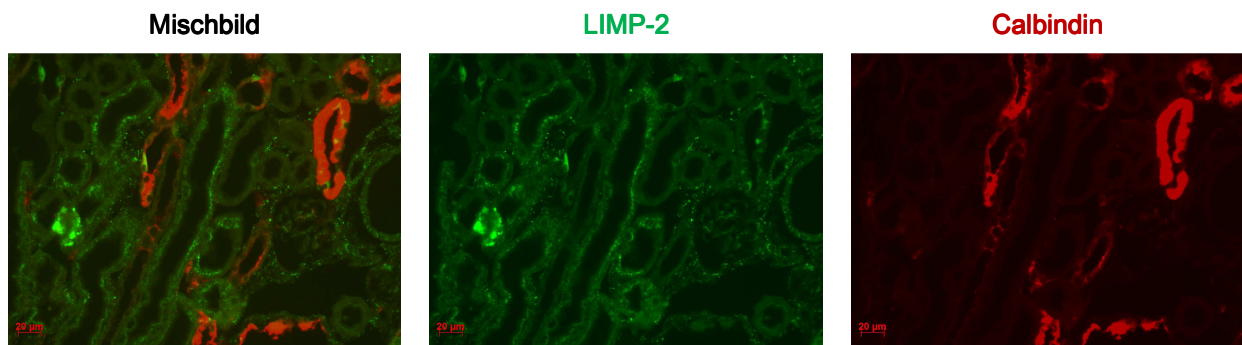
Distaler Tubulus

Abb.7.3 Kofärbung LIMP-2 mit Calbindin. Die Zellen des distalen Tubulus zeigen ebenfalls kein LIMP-2 Signal. Es sind vereinzelt grün gefärbte Schaltzellen erkennbar, was durch eine unspezifische Färbung des LIMP-2 Antikörpers verursacht wird. Diese unspezifische Färbung ist auch im LIMP-2 KO Schnitt vorhanden

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Calbindin [Distaler Tubulus], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-mouse [Calbindin, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung

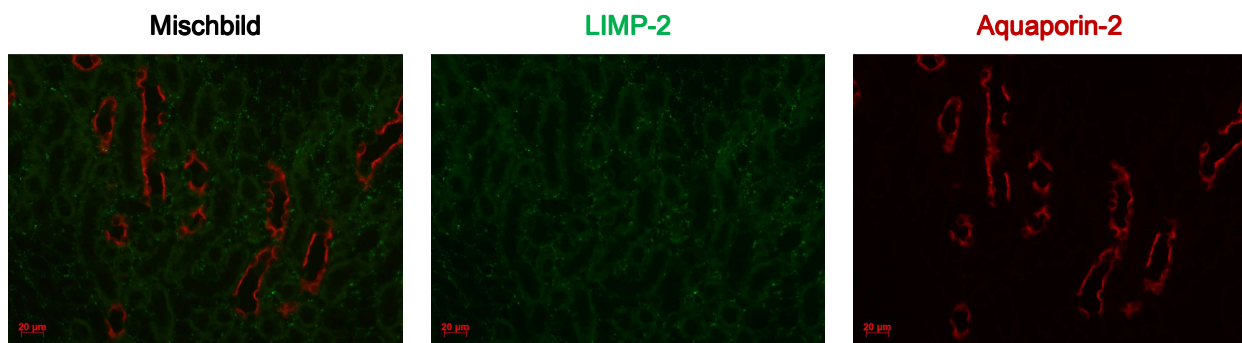
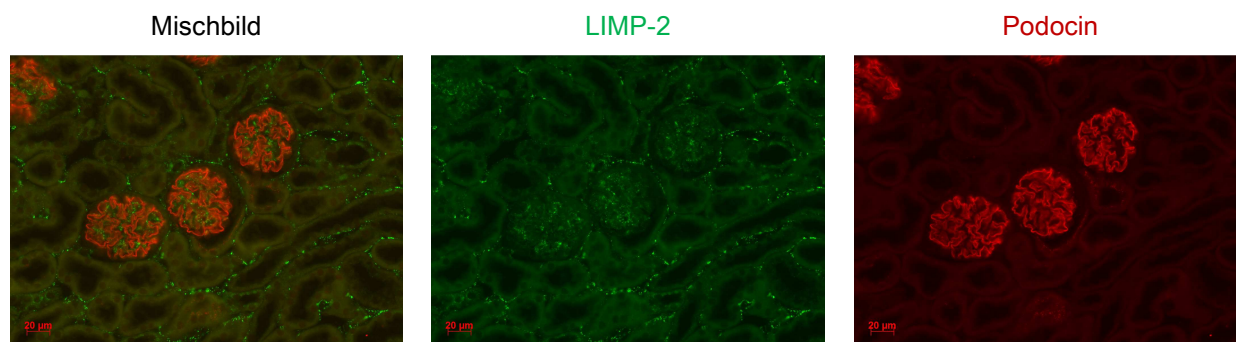
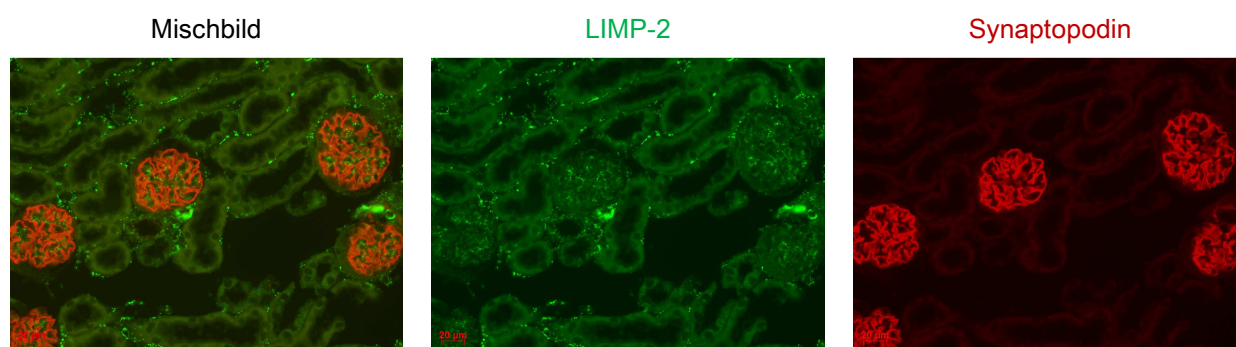
Sammelrohr

Abb.7.4 Kofärbung LIMP-2 mit AQP-2. LIMP-2 wird im Sammelrohr nicht exprimiert. Im umliegenden Gewebe sind klar abgrenzbare, punktförmige LIMP-2 Signale erkennbar.

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Aquaporin-2 [Sammelrohr], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Aquaporin-2, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung)

A Podozyten – Podocin

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Podocin [Podozyten], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Podocin, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung)

B Podozyten – Synaptopodin

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Ren1 [Renin], Synaptopodin [Podozyten], Verdünnung je 1:200; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC [Synaptopodin, rot] ; Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung

Abb.7.5 Kofärbungen LIMP-2 mit Podocin (**A**) und Synaptopodin (**B**). LIMP-2 ist in Podozyten nicht zu sehen. Weder mit Podocin noch mit Synaptopodin wurde eine Kolokalisation festgestellt.

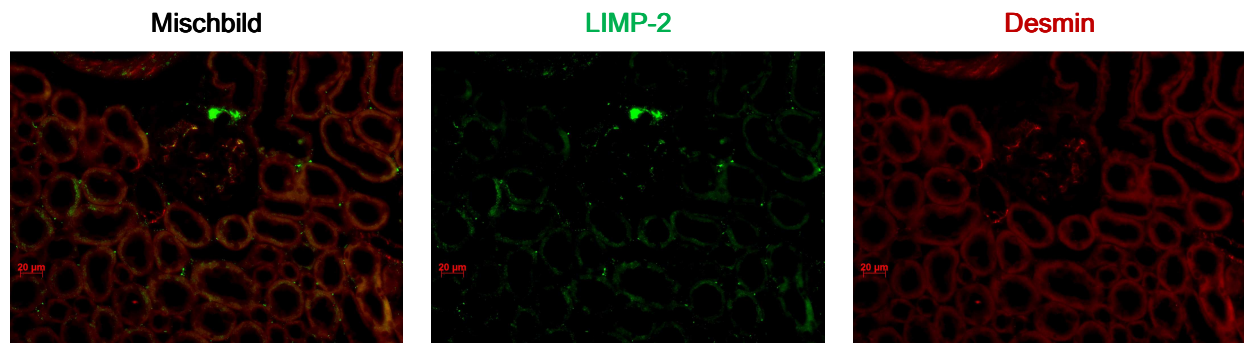
Mesangialzellen

Abb.7.6 LIMP-2 ist punktförmig in Mesangialzellen der Glomeruli zu sehen. Es kommt zu einer deutlichen Überlagerung von LIMP-2 und Desmin.

Paraffinschnitt. Primärantikörper: LIMP-2, Desmin [Mesangiumzellen], Verdünnung je 1:100; Sekundärantikörper: Cy2 anti-rabbit [LIMP-2, grün], TRITC anti-goat [Desmin, rot], Verdünnung je 1:400; 400fache Vergrößerung.

7.3 Verwendete Materialien

Oligonukleotide (*Biomers.net GmbH*, Ulm)

Verwendung	Kodierung
LIMP-2 sense	5'-GTTCCAGCTCGCCGTTCCGG-3'
LIMP-2 antisense	5'-GTTCCGGAGCTCCCTGTAGGTG-3'
LIMP-2 sense	5'-CCAGCTCGCCGTTCCGGTC-3'
LIMP-2 antisense	5'-GTTCCGGAGCTCCCTGTAGGTG-3'
Renin sense	5'-ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGG-3'
Renin antisense	5'-ATGCGGGGAGGGTGGGCACCT-3'
Aktin sense	5'-CCGCCCTAGGCACCAGGGTG-3'
Aktin antisense	5'-GGCTGGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'

Puffer

Maleatpuffer, pH 6,0	4,06g Tris, 5,8g Maleinsäure, 2,96g EDTA, in 1 l H ₂ O bidest gelöst, mit NaOH auf pH 6,0 titriert
DEPC-H ₂ O	0,1 Vol.% DEPC in H ₂ O bidest gelöst, über Nacht stehen gelassen, dann autoklaviert
PBS Puffer, pH 7,5 (20 mM Phosphat, 140 mM NaCl)	4,56 g K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O, 0,68 g 10mM KH ₂ PO ₄ , 16,36 g NaCl, in 2 l H ₂ O bidest. gelöst
Tris-EDTA Puffer, pH 8,5	1,2 g Tris, 0,37 g EDTA, in 1l H ₂ O bidest. gelöst, mit HCl auf pH 8,5 titriert, 1 h lang im Wasserbad auf 95°C erhitzt
Citratpuffer, pH 6,0	0,32 g Citrat-Monohydrat, 2,06 g Natriumcitrat-Dihydrat, in 1 l H ₂ O bidest. gelöst, 20 min lang im Wasserbad bei 95°C erhitzt

Antikörper

Zielstruktur	Antikörper
LIMP-2	<i>LIMP-2</i> ; Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Univ. Kiel
Zellkerne	<i>DAPI</i> ; Antikörper: Santa Cruz: sc 3598; Verdünnung 1:400
Renin bildende Zellen	<i>Ren-1</i> ; Antikörper: R&D Systems: AF4277; Verdünnung 1:200; anti-mouse
Peritubuläre Kapillaren	<i>CD31</i> ; Antikörper: Sigma-Aldrich F8402; Verdünnung 1:400; anti-goat
Glatte Gefäßmuskelzellen	<i>Smooth Muscle Actin</i> ; Antikörper: Beckman Coulter PN IM 1144; Verdünnung 1:200; anti-mouse
Podozyten	<i>Synaptopodin</i> ; Antikörper: Santa Cruz N-14: sc 21536; Verdünnung 1:200; anti-goat <i>Podocin</i> ; Antikörper: Santa Cruz sc 22298; Verdünnung 1:200, anti-goat
Mesangium	<i>Desmin</i> ; Antikörper: abcam, ab 8592; Verdünnung 1:100; anti-goat
Prox. Tubulus	<i>Megalin</i> ; Antikörper: Santa Cruz sc 16478; Verdünnung 1:200; anti-goat
Dist. Tubulus	<i>Calbindin</i> ; Antikörper: Swant , Code No. 300; Verdünnung 1:200, anti-mouse
Henle-Schleife	<i>Tamm-Horsfall Protein</i> ; Antikörper: Santa Cruz , sc19554; Verdünnung 1:200, anti-goat
Sammelrohr	<i>Aquaporin-2</i> ; Antikörper: Santa Cruz, sc9882; Verdünnung 1:200, anti-goat

7.4 Versuchsprotokolle

Messung der Reninkonzentration in Plasma und Nierengewebe mittels RIA

Zur Bestimmung der Reninaktivität mittels RIA wurde das RENCTK Renin RIA Kit (DiaSorin Diagnostics GmbH, Dietzenbach) verwendet. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Zunächst wurden die Plasmaproben zehnfach mit Maleatpuffer verdünnt. Da bei Mäusen die Reninaktivität im Nierengewebe höher ist als im Plasma, wurden die Nierengewebsproben stärker mit Maleatpuffer verdünnt (200- bis 500-fach). 50 µl der Verdünnung wurden anschließend auf Eis mit 22,2 µl Reninsubstrat (Angiotensinogen), 27,8 µl RIA-Reaktionspuffer und 2 µl PMSF gemischt. Eine Hälfte dieses Gemisches (51µl) wurde 90 min lang im Eisbad inkubiert, um bereits in der Probe vorliegendes AngI zu erfassen und bei der Auswertung auszuschließen. Die andere Hälfte wurde 90 min lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert und dann mit Eis abgekühlt.

Die Proben wurden anschließend in die mit Anti-AngI-Antikörpern beschichteten Röhrchen überführt, mit 500µl *tracer* (radioaktiv markiertes AngI) gemischt und 3 - 24 h lang inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen sorgfältig abgesaugt und die Radioaktivität der Röhrchenwand im Gamma-Zähler (Berthold, Germany) gemessen und PC-gestützt ausgewertet. Die Reninaktivität der Proben wurde mit Hilfe einer gleichzeitig erstellten Eichkurve bestimmt.

Proreninaktivierung durch Trypsin

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurden je 55 µl aus einem Plasmapool entnommen und 1:5 mit Maleatpuffer verdünnt. Dieser Probe wurden 55 µl von 1mg/ml Trypsin in PBS hinzugefügt und die Gesamtprobe von 110 µl in 5 Aliquots zu 20 µl aufgeteilt und parallel auf Eis und bei 37°C inkubiert. Die in den Proben ablaufende Trypsinreaktion wurde nach 0 min (1), 5 min (2), 10 min (3), 30 min (4) und 60 min (5) mit 20 µl Trypsininhibitor abgestoppt wurde. Parallel zu diesen fünf Proben wurde eine Kontrollprobe mit 55 µl Plasma + 55 µl PBS angesetzt. Nach

kurzem Schütteln und Zentrifugation wurden die Proben bis zur Bestimmung der PRC mittels RIA bei -20 °C eingefroren.

Fluoreszenzmikroskopischer LIMP-2 Nachweis in der Niere mittels Immunhistochemie

Die Schnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (2x Xylobad je 10 min; Isopropanol abs. 5 min; 96%, 80%, 70% Isopropanol je 5 min). Danach wurden die Schnitte auf dem Rüttler dreimal je 5 min lang mit PBS gewaschen und dann 20 min lang mit 10 % HS-Serum und 1 % BSA in PBS blockiert. Die Blockierlösung wurde abgesaugt und die Schnitte mit dem Primärantikörper (verdünnt mit 10 % HS-Serum und 1% BSA in PBS) überschichtet. Die jeweilige Primär- und Sekundärantikörperverdünnung ist im entsprechenden Abbildungstext angegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Schnitte auf dem Rüttler dreimal je 5 min lang mit 1 % BSA in PBS gewaschen. Währenddessen wurden die Sekundärantikörper mit 1 % BSA in PBS verdünnt und 10 min lang bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die verdünnte Antikörperlösung auf die abgesaugten Schnitte aufgetragen und die Schnitte 90 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Sekundärantikörper sind äußerst lichtempfindlich und die Schnitte wurden im Dunkeln weiter bearbeitet. Nach dem dreimaligen fünfminütigen Waschen mit PBS auf dem Rüttler wurde der Hintergrund blockiert. Dazu wurden die Schnitte in PBS mit 2 mg Phenylhydrazin bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln 10 min lang inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 30% H₂O₂ erfolgte eine weitere Inkubation für 20 min. Anschließend wurden die Schnitte abermals auf dem Rüttler 5-10 min lang in PBS gewaschen und schließlich mit *mounting medium* versiegelt und mit Deckgläsern verschlossen. Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop *AxioVert 200M (Carl Zeiss)* analysiert.

Die Schnitte zur Färbung der Sammelrohre mit AQP-2, zur Färbung von Glomeruli mit Synaptopodin und zur Färbung des proximalen Tubulus mit Megalin wurden nach

der Entparaffinierung zunächst 45 min lang in Tris-EDTA Puffer gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde mit den Schnitten gemäß dem obigen Protokoll verfahren.

RNA-Isolierung aus Nierengewebe

Eine halbe Mausniere (nach Organentnahme zunächst bei -80°C eingefroren) wurde mit 1 ml TRIzol in Sarstedt-Tubes vorgelegt und etwa 30 s mit einem feinen Mixer homogenisiert (Ultra Turrax). Nach Überführung in Eppendorfgefäße und fünfminütiger Inkubation bei RT (in dieser Zeit werden die Proteine denaturiert und lösen sich im Phenol) wurden der Probe 200 μl Chloroform hinzugefügt. Die Probe wurde anschließend 20 min bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert, wobei das Gemisch in drei Phasen getrennt wird. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, DNA und Proteine befinden sich in der unteren roten Chloroform-Phenolphase. Die dazwischen liegende weiße Interphase besteht aus relativ aggregierten Proteinen. Die obere Phase mit der RNA wurde in ein neues Gefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde die Probe nach Zugabe von 500 μl Isopropanol und nach kurzem kräftigem Schütteln bei RT 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde 10 min bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das darin enthaltene RNA-Pellet mit einer Pipette möglichst vollständig von Flüssigkeit befreit. Zur Verdrängung der Hydrathülle um die RNA wurde dem Pellet 1 ml 75 % Ethanol hinzugefügt. Die Probe wurde 5 min bei 4°C mit 7500 rpm zentrifugiert, danach der Überstand abdekantiert und das Pellet 10 min bei RT getrocknet. Dann wurde es in 270 μl Wasser gelöst und 3 min bei 65°C geschüttelt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Für die RNA-Konzentrationsbestimmung wurden 2 μl der Probe mit 98 μl bidest. H_2O verdünnt. Die Absorption der Probe wurde bei 260 und 280nm mit einem *Nanodrop* Spektrometer gemessen und das Verhältnis A_{260}/A_{280} bestimmt. Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei etwa 280nm, so dass ein hohes A_{260}/A_{280} Verhältnis auf

einen hohen Nukleinsäureanteil in der Probe hinweist. Bei einem Verhältnis $> 1,8$ ist die RNA-Probe für die reverse Transkription geeignet.

7.5 Danksagung

Mein Doktorvater **Prof. Dr. Frank Schweda** hat mich über die gesamte Zeit der Doktorarbeit stets hervorragend betreut und unterstützt. Ich freue mich und bin stolz, dass ich in dieser angenehmen Laboratmosphäre seiner Gruppe auf diesem interessanten Gebiet der Physiologie arbeiten konnte.

Von seinen Ratschlägen, Ideen und Analysen in zahlreichen Gesprächen habe ich wissenschaftlich und menschlich enorm profitiert und dafür bin ich ihm sehr dankbar!

Mein weiterer besonderer Dank gilt **Regine Volkmann, Katharina Ehm** und **Frieda Webinger** für ihre Hilfe und Unterstützung bei meinen vielen Fragen. Damit habt Ihr maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Ebenso danke ich **Prof. Dr. Paul Saftig** und **PD Dr. Michael Schwake** vom biochemischen Institut der Universität Kiel dafür, dass sie mir LIMP-2 Antikörper und LIMP-2 *knockout* Mäuse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Meine Eltern haben mir durch ihre stete Unterstützung in jeder Hinsicht ermöglicht, mein Medizinstudium und diese Doktorarbeit erfolgreich zu absolvieren. Euch danke ich ganz besonders!

7.6 Lebenslauf



Johannes Schmid

geb. am 22.11.1987 in Amberg

Bahnhofstraße 1
93047 Regensburg
carloschmid@hotmail.de
0171-9338731

Schulbildung

1994-1998 Grundschule Meyernberg, Bayreuth
1998-2007 Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth, Abitur Note 1,1
06/2007 Aufnahme in das Max Weber Programm des Freistaats Bayern
01/2008 Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes

Studium

2007 – 2013 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
11/2013 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
09/2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“
2009 und 2010 Assistent im anatomischen und neuroanatomischen Präparierkurs,
Anatomisches Institut der Universität Regensburg
04/2011 – 08/2012 Anstellung als Sitzwache am Universitätsklinikum Regensburg
04/2012 – 08/2012 Mitarbeit beim studentischen Präventionsprojekt „Mit Sicherheit verliebt“

Famulaturen

04/2010 Internistische Praxis, Dres. Hennig/Vogelsberg, Bayreuth
08/2010 Frauenklinik, Krankenhaus Friedrichstadt, Dresden
03/2011 Klinik für Anästhesie, Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin
08-09/2011 Lutheran Hospital, Karatu, Tansania

Praktisches Jahr

08/2012 – 12/2012 Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg
12/2012 – 04/2013 Gynäkologie und Geburtshilfe, Frauenklinik St. Hedwig, Regensburg
04/2012 – 07/2013 Chirurgie, Kantonsspital Winterthur, Schweiz

Veröffentlichung

J. Schmid, M. Oelbe, P. Saftig, M. Schwake und F. Schweda
„Parallel regulation of renin and lysosomal integral membrane proteins 2
in renin producing cells: Further evidence for a lysosomal nature of renin
secretory vesicles.“; Pflügers Archiv, 465 (2013): 895-905

J. Schmid, R. Volkmann, F. Schweda „Localization of Lysosomal Integral
Membrane Protein type 2 (LIMP-2) in Mouse Kidney.“
Posterpräsentation im Rahmen der 90. Jahrestagung der Deutschen
Physiologischen Gesellschaft vom 26.-29.03.2011 in Regensburg.

Sprachen

Französisch und Englisch in Wort und Schrift

7.7 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, im Dezember 2013

Johannes Schmid