

# Funktionelle Analyse der cGMP-abhängigen Proteinkinase I in der Niere, insbesondere im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife



## **DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Franziska Limmer**  
aus Kaufbeuren

im Jahr 2015

Promotionsgesuch eingereicht am: 01.12.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

*Meiner Familie*

*„Imagination is more important than knowledge“*

Albert Einstein

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg.....	8
1.2	Die cGMP-abhängigen Proteinkinase.....	10
1.3	NO/cGMP-Signaltransduktionsweg und pharmakologische Angriffspunkte .....	12
1.4	VASP und phosphoVASP.....	13
1.5	Die physiologische Bedeutung der Niere.....	14
1.6	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	18
1.7	Dehydratation.....	18
1.8	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter .....	20
1.8.1	NKCC1 und NKCC2 .....	20
1.8.2	NKCC2 Phosphorylierung und Vasopressin .....	21
1.8.3	Furosemid .....	22
1.9	Verwendete transgene Mäuse.....	23
1.10	Ziele dieser Arbeit.....	24
2	Material und Methoden .....	26
2.1	Verwendete Mausmutanten.....	26
2.2	Puffer und Lösungen .....	26
2.3	Antikörper für Western-Blots, Immunhisto- und Immunocytochemie.....	27
2.4	Zellkulturmedium und Stimulantien.....	29
2.5	Primer (jeweils von mus musculus) für RT-PCR.....	29
2.6	Chemikalien, Arzneistoffe und Verbrauchsmaterial .....	30
2.7	Densitometrie und Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung.....	30
2.8	Statistische Auswertung .....	31
2.9	Stoffwechselversuche .....	32
2.9.1	Untersuchung des Effekts von Furosemid .....	32
2.9.2	Versuche mit YC1 .....	32
2.9.3	Wasserentzug .....	33
2.10	Gewinnung von Serum .....	33
2.11	Bestimmung des Hämatokritwertes.....	33
2.12	Ermittlung der Elektrolytkonzentration im Blut und Urin.....	33
2.12.1	Natrium- und Kaliumionenkonzentration .....	33
2.12.2	Chloridionenkonzentration .....	34
2.13	Bestimmung der Osmolalität von Urin und Serum.....	35
2.14	Bestimmung von cGMP und Vasopressin im Urin.....	35
2.15	Ermittlung der Reninkonzentration im Plasma .....	36

2.16	Immuncytochemie und Immunhistochemie .....	37
2.16.1	Immuncytochemie.....	37
2.16.2	Immunhistochemie.....	38
2.17	mRNA Bestimmung und reverse Transkriptase/Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	41
2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	45
2.19	Plasmamembranpräparation mittels differentieller Zentrifugation .....	48
3	Ergebnisse .....	49
3.1	Analyse von NKCC2 in MKTAL-Zellen .....	49
3.2	Untersuchung der Auswirkungen der Gabe von Furosemid.....	52
3.2.1	Nachweis der mRNA Expression von cGKI im TAL .....	52
3.2.2	Rolle von cGKI bei der Regulation des renalen NKCC2 .....	53
3.2.2.1	Ermittlung von Urinparametern.....	54
3.2.2.2	Bestimmung der Konzentrationen von Renin im Plasma und von Vasopressin im Urin.....	56
3.2.2.3	Ermittlung des cGMP-Gehalts im Urin und im Nierengewebe.....	57
3.2.2.4	Analyse des Serums .....	58
3.2.2.5	Analyse der Phosphorylierungs-Kinetik von NKCC2 .....	59
3.2.2.6	Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 mittels Western-Blot .....	60
3.2.2.7	Analyse der Membranverteilung von pNKCC2 .....	61
3.2.2.8	Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 mittels Immunhistochemie ....	62
3.2.3	Untersuchung der Wirkung von Furosemid auf das cGMP-Kinase Substrat VASP.....	66
3.2.4	Einfluss von NO/cGMP/cGK-beeinflussenden Pharmaka auf Urinparameter ..	67
3.2.4.1	Analyse der Urinparameter nach YC1-Behandlung .....	67
3.2.4.2	Kombinierte Gabe von YC1 und Furosemid .....	69
3.3	Analyse eines Zusammenhangs von cGKI und Dehydratation .....	71
3.3.1	Wasser- und Futteraufnahme.....	71
3.3.2	Renale Parameter .....	73
3.3.3	Blutuntersuchung .....	79
4	Diskussion .....	82
4.1	Analyse von NKCC2 in MKTAL-Zellen .....	82
4.2	Expression von cGKI mRNA im TAL .....	83
4.3	Untersuchung der Auswirkungen der Gabe von Furosemid.....	83
4.3.1	Einfluss von Furosemid auf renale Parameter .....	83
4.3.2	Plasma Renin Aktivität .....	85
4.3.3	Vasopressin .....	85

---

4.3.4	Einfluss von Furosemid auf die Elektrolyte des Serums .....	87
4.3.5	Einfluss von Furosemid auf die Phosphorylierung von NKCC2 .....	87
4.3.6	Einfluss von Furosemid auf die Aktivierung der cGKI mittels Analyse des cGKI SubstratsVASP .....	89
4.3.7	NO/cGMP/cGK-beeinflussende Pharmaka .....	89
4.4	Beteiligung von cGKI bei der Dehydratation .....	90
4.4.1	Wasser- und Futteraufnahme .....	91
4.4.2	Beeinflussung renaler und hämatologischer Parameter durch Wasserentzug .....	91
5	Zusammenfassung .....	95
6	Literaturverzeichnis .....	97
7	Anhang .....	107
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	107
7.2	Abbildungen und Tabellen .....	110
7.3	Danksagung .....	113
7.4	Eidesstattliche Erklärung .....	114

## 1 Einleitung

Das gasförmige Radikal Stickstoffmonoxid, kurz „NO“, das früher EDRF (Endothelium-derived relaxing factor) (51) genannt wurde, ist ein körpereigner Stoff, diffundiert schnell innerhalb von Geweben und stellt einen wichtigen Botenstoff dar (51, 81, 132). Obwohl bereits Ende der 1970er Jahre seine gefäßdilatorische Wirkung erkannt wurde und heute zahlreiche NO freisetzende Pharmaka therapeutisch eingesetzt werden, z. B. zur Behandlung von Angina pectoris, bedarf der NO-Signalweg noch weiterer Untersuchungen. Die cGMP-Bindungsstellen, die Substratspezifität und strukturelle Details des katalytischen Zentrums wurden bereits eingehend erforscht. Es ist bekannt, dass NO zu einem Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Dadurch werden u. a. die sogenannten cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cG-Kinasen, PKGs) aktiviert. Durch Änderung des Phosphorylierungsstatus einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen induziert cGMP / PKG u. a. die Relaxation des glatten Muskels (173). In jüngster Zeit wurden Studien veröffentlicht, die eine Beteiligung von PKG bei der Regulation des renalen Natriumhaushalts beschreiben (33). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem NO/cGMP/PKG-Signalweg und der renalen Diurese und Natriurese gibt.

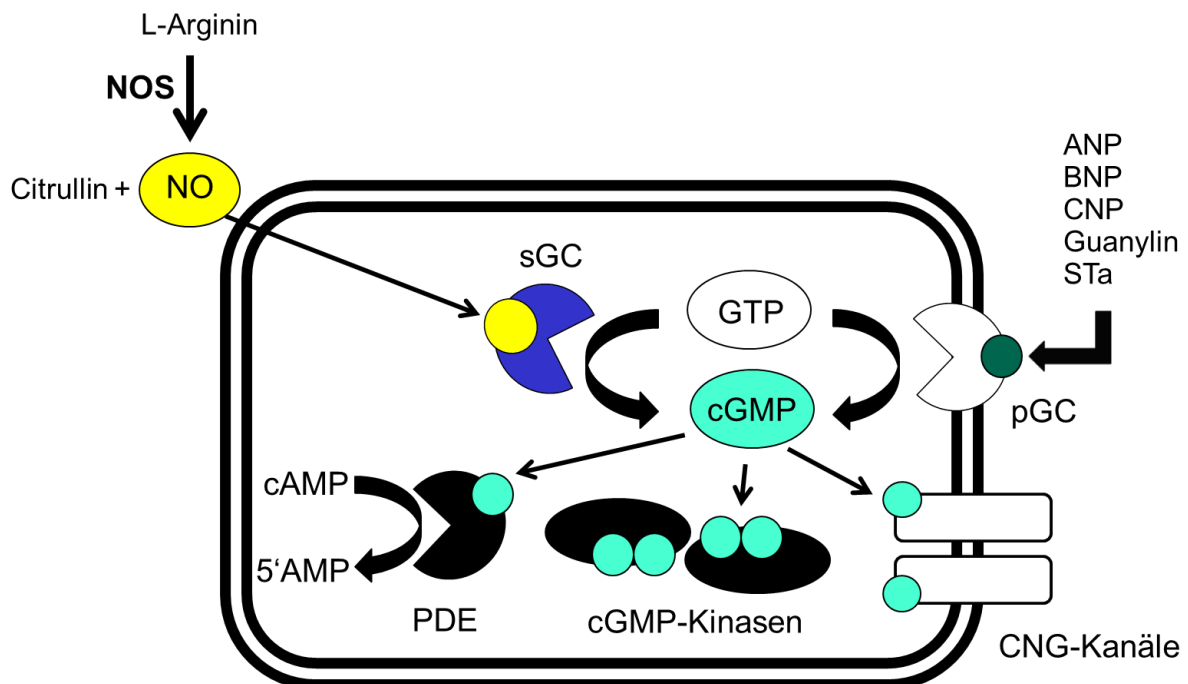
### 1.1 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg

Die endogene Bildung von Stickstoffmonoxid läuft über drei verschiedene Isoenzyme, die sog. NO-Synthasen (NOS), ab. Diese katalysieren die Desaminierung von L-Arginin, wobei L-Citrullin und Stickstoffmonoxid gebildet werden. L-Arginin stellt dabei das Substrat dar. NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat) und molekularer Sauerstoff fungieren als Co-Substrate. Es werden dabei die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3), die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) unterschieden (60). Die überholte Namensgebung der nNOS und eNOS geht auf die Gewebe zurück, in denen deren Nachweis als erstes gelang. So lässt sich eNOS neben den Endothelzellen auch in Thrombozyten und vielen weiteren Zellen nachweisen (48). Die neuronale NOS ist nicht nur in zentralen Neuronen, sondern auch in peripheren NANC-Neuronen, in Skelettmuskelzellen und in Macula densa-Zellen der Niere auffindbar. Die Expression der induzierbaren NOS in Makrophagen, vaskulären Endothelzellen, in der Leber oder auch im Myokard wird durch inflammatorische Zytokine oder Lipopolysaccharid induziert (48, 60). Aufgrund ihrer konstitutiven Expression erfolgt die funktionelle Einteilung von NOS1 (nNOS) und NOS3 (eNOS) auch unter cNOS (konstitutive NOS). Die cNOS werden zu den Calcium-abhängigen NO-Synthasen gezählt, weil ihre Aktivität durch die freie

intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert wird. Bei der Aktivierung der NOS3 (eNOS) spielt die Phosphorylierung von Ser1177 eine wichtige Rolle. Deren Induktion verläuft beispielsweise über VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Bradykinin oder Scherstress. Die Proteinkinase A (PKA) ist nach Scherstress die phosphorylierende Kinase und bei der Stimulation von Bradykinin ist es die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (49). Die Regulation der NOS2 (iNOS) erfolgt Calcium-unabhängig auf Transkriptionsebene. Nach ihrer Aktivierung produziert sie viel höhere NO-Konzentrationen als die cNOS. Die Funktion der NOS2 bei Entzündungsreaktionen ist daher auf die Bildung hoher zytotoxischer NO-Konzentrationen zurückzuführen. Die Regulation der Kontraktion glatter Muskulatur, von Proliferationsprozessen und die Aktivierung von Thrombozyten laufen über die Calcium-abhängigen cNOS, genauer über den NO/cGMP-Signalweg ab. Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (soluble Guanylate-Cyclase, sGC), dem für NO wichtigsten intrazellulären Rezeptor, ist der physiologisch bedeutendste NO-stimulierte Signalweg. Die im Cytosol vorliegende lösliche Guanylatzyklase (sGC) ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer Häm-bindenden  $\beta$ -Untereinheit (141). Das gasförmige Radikal NO diffundiert frei durch die Zellmembran und bindet an die Häm-Gruppe der sGC. Die sGC wird dadurch aktiviert und erzeugt aus intrazellulärem Guanosin-5'-triphosphat (GTP) den „second messenger“ zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). cGMP ist ein zyklisches Nukleotid, das eine Vielzahl von Signalprozessen in der Zelle vermittelt (85). Die Konversion von GTP zu cGMP wird neben der sGC auch noch durch die partikuläre Guanylatzyklase (pGC) katalysiert. Dieser membranständige Rezeptor weist keinen NO-bindenden Protoporphyrin IX-Ring auf. Deshalb wird die pGC nicht durch NO, sondern durch Bindung von ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain-type natriuretic peptide), CNP (C-type natriuretic peptide), Guanylin oder STa (heat-stable enterotoxin of *E. coli*) an ihre extrazelluläre Domäne aktiviert (Abb. 1) (50, 100).

GC-A bis GC-G stellen die sieben identifizierten pGC-Isoformen dar. ANP, BNP und CNP aktivieren GC-A und GC-B. Guanyline binden an GC-C (99). cGMP wird durch die aktivierte Guanylatzyklase gebildet. Von cGMP ausgehend geht die Signaltransduktion in verschiedene Zielstrukturen über, die in drei Gruppen unterteilt werden können: CNG-Kanäle (cyclic nucleotide-gated channels oder zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle), cGKs bzw. PKGs (cGMP-abhängige Proteinkinasen) (75) und PDEs (cGMP-regulierte Phosphodiesterasen). Derzeit werden die Phosphodiesterasen in 11 PDE-Familien unterteilt. Diese tragen aufgrund der Hydrolyse der zyklischen Nukleotide zur Regulation intrazellulärer Konzentrationen von cAMP und cGMP bei. PDE5, PDE6 und PDE9 hydrolysieren nur cGMP. Die PDE-Familien weisen eine unterschiedliche Affinität zu cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) bzw. cGMP auf. Die Hydrolyseaktivität von PDE2 und PDE3 wird durch cGMP reguliert. So ist cGMP für die Stimulation von PDE2 und für die Inhibition von PDE3

verantwortlich. Da PDE2 und PDE3 cAMP hydrolysieren, kann cGMP auf diese Weise die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflussen (sog. „crosstalk“) (12, 157). In der Niere sind PDE5 (25) und PDE9 (39) für die Hydrolyse von cGMP verantwortlich. Die Aktivierung der zyklisch Nukleotid-aktivierten Kationenkanäle (CNG-Kanäle) erfolgt durch Bindung von cAMP und cGMP. Von diesen Ionenkanälen existieren sechs verschiedene Homologe, die Tetramere aus vier Untereinheiten sind und für den Transport von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich sind (14).



**Abb. 1: NO/cGMP-Bildungs- und Signaltransduktionsweg**

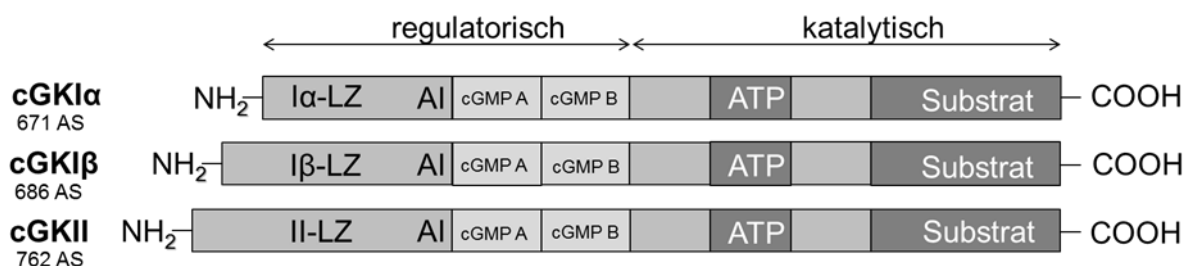
NOS katalysiert die Entstehung von NO aus L-Arginin. Nach Diffusion von NO durch die Zellmembran aktiviert es die sGC, die für die Katalyse der Bildung von cGMP aus GTP verantwortlich ist. Wird die pGC durch ANP, BNP, CNP, Guanylin oder STa (heat-stable enterotoxin of *E. coli*) aktiviert, entsteht auf diese Weise ebenfalls cGMP. cGMP besitzt diverse Zielstrukturen: PDEs, cGKs und CNG-Kanäle.

## 1.2 Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) werden der Klasse der Serin/Threoninkinasen zugeordnet und durch cGMP aktiviert. Diese phosphorylieren die Aminosäuren (AS) Serin und Threonin, wobei diese die Akzeptoren darstellen und ATP der Donor der Reaktion ist (137). Zwei verschiedene cGK-Gene, *prkg1* und *prkg2*, werden im Genom von Vertebraten unterschieden. Diese kodieren für die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ1 (cGKI) bzw. Typ2 (cGKII) (75). cGKI und cGKII unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation,

ihrer Gewebeverteilung und ihrer Funktion. cGKI $\alpha$  bzw. cGKI $\beta$  sind die beiden Isoformen, die bei der Expression von *prkg1* durch alternatives Spleißen zweier für den Aminoterminus kodierender Exons entstehen. Diese beiden Isoformen liegen im Cytosol in löslicher Form vor. Demgegenüber erfolgt bei der cGKII nach N-Myristoylierung eine Verankerung in der Plasmamembran (166, 180).

Bei den cGKs handelt es sich um Homodimere. Ihre monomeren Untereinheiten weisen im Fall von cGKI ein Molekulargewicht von 76-78 kDa (76) und im Falle von cGKII von 87 kDa (83) auf. Strukturell sind sowohl die lösliche cGKI als auch die membranständige cGKII aus einer regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut. Die regulatorische Untereinheit besteht einerseits aus einem Aminoterminus, der sich aus einer N-terminalen Isoleucin/Leucin-Zipper-Region, der autoinhibitorischen Domäne, und einer Linker-Region zusammensetzt und andererseits aus den beiden cGMP-Bindungstaschen A und B. Die Domäne A stellt die hochaffine Bindungsstelle und die Domäne B die niedrigaffine Bindungsstelle dar (Abb. 2). Nach der Bindung von cGMP ändert sich die Konformation. Dies führt zur Aufhebung der Hemmung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudosubstratbindungsstelle (20, 31, 160).



**Abb. 2: Struktur (schematisch) der cGMP-abhängigen Proteinkinasen**

LZ: Leucin-Zipper; AI: autoinhibitorische Domäne; cGMP A/B: cGMP-Bindungstasche A/B;  
AS: Aminosäure

Der Aminoterminus ist für drei Funktionen verantwortlich. Zu diesen gehört die Bindung von G-Kinase Anker Proteinen (GKAPs) und die Dimerisierung durch die Isoleucin/Leucin-Zipper-Region, wodurch Homodimere der cGKs gebildet werden. Zudem zählt die Autoinhibierung des aktiven Zentrums der katalytischen Domäne des Enzyms bei Abwesenheit von cGMP dazu (Pseudosubstratbindung). Zuletzt ist die intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms, das „Targeting“, zu nennen (74). Die darauffolgende katalytische Domäne weist eine ATP-Bindungsstelle und eine Substratbindungsstelle auf. Hier wird der  $\gamma$ -Phosphatrest von ATP auf ein Serin oder Threonin des Substratproteins übertragen. cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  unterscheiden sich nur in den ersten ca. 100 Aminosäuren, demnach in ihren Leucin-Zipper-Regionen bzw. N-Termini. Das ist der Grund dafür, dass sie verschiedene

Kompartimentierungen in der Zelle aufweisen und Interaktionen mit unterschiedlichen Substratproteinen zeigen (26, 90). Es kommt hinzu, dass die cGKI $\alpha$  eine wesentlich höhere Sensitivität für cGMP als die cGKI $\beta$  besitzt, weshalb ca. zehn Mal niedrigere Konzentrationen für die Aktivierung der cGKI $\alpha$  benötigt werden.

Die Expression der cGKs in verschiedenen Geweben erklärt ihre unterschiedliche physiologische Bedeutung. Im allgemeinen wird die cGKI in Purkinjezellen des Kleinhirns, in viszeralen und vaskulären glatten Muskelzellen (z. B. in der glatten Muskulatur von Uterus, Blutgefäßen, Gastrointestinaltrakt und Trachea) (75), in Endothelzellen von Blutgefäßen, im Herz, in den Zellen der Nierengefäße, in Spinalganglien, in der neuromuskulären Endplatte, in neutrophilen Granulozyten, in Makrophagen, im Hippocampus und in der Retina exprimiert. Im Gegensatz zur  $\beta$ -Isoform wird die  $\alpha$ -Isoform der cGKI im renalen Interstitium und im juxtaglomerulären Apparat (JGA) exprimiert. Dagegen findet man in humanen Thrombozyten und im Bulbus olfactorius nur die cGKI $\beta$ .

Eine wichtige Funktion der cGKI ist die Relaxation von glatten Muskelzellen. Die Folge eines Verlusts von cGKI sind ernsthafte vaskuläre und intestinale Fehlfunktionen. So sind cGKI defiziente Mäuse beispielsweise juvenil hypertensiv und haben einen vergrößerten Magen-/Darm-Trakt sowie eine gestörte Verdauung (136).

Die membrangebundene cGKII kommt in diversen Teilen des Gehirns wie dem Thalamus, Bulbus olfactorius und Cortex (66), in Chondrozyten, in der Niere, in der Lunge und im Bürstensaumepithel des Dünndarms vor (75, 108). Die cGKII ist an der Sekretion von Chloridionen und Wasser beteiligt, da sie den CFTR Chloridkanal (zystische Fibrose Transmembran Leitfähigkeitsregulator) phosphorylieren kann. Des Weiteren ist die cGKII an der CNP/cGMP-vermittelten endochondralen Ossifikation (73) beteiligt und soll bei der renalen Reninfreisetzung eine Rolle spielen (171). cGKII-knockout-Mäuse sind von zwergenhaftem Wuchs (75).

### **1.3 NO/cGMP-Signaltransduktionsweg und pharmakologische Angriffspunkte**

Der NO/cGMP-Signalweg besitzt hohe pharmakologische Relevanz. So finden viele Pharmaka des Herzkreislaufsystems im NO/cGMP-Signalweg ihre Angriffspunkte. Glyceroltrinitrat setzt NO frei und findet aufgrund seiner gefäßerweiternden Wirkung in Form eines Pumpsprays bei akuten Angina-pectoris Anfällen Einsatz. Neben Glyceroltrinitrat gehören zu den NO freisetzenden Pharmaka, die zur Prophylaxe von Angina-pectoris Anfällen eingesetzt werden, noch Isosorbidmononitrat (ISMN) und Molsidomin.

Des Weiteren werden PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil eingesetzt, um die erektile Dysfunktion des Mannes zu behandeln. Durch Hemmung von PDE5 kommt es zur Erhöhung des cGMP-Blutspiegels im Corpus cavernosum. Die dadurch ausgelöste Vasodilatation ruft eine vermehrte Erektion hervor.

Riociguat stimuliert NO-unabhängig und Häm-abhängig die sGC. 2014 erhielt Riociguat (Adempas<sup>®</sup>) die EU-Zulassung für die Behandlung von CTEPH (chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie) und PAH (pulmonale arterielle Hypertonie). Cinaciguat ist ein NO- und Häm-unabhängiger sGC-Aktivator. Es soll einen positiven Einfluss auf die pulmonale arterielle Hypertonie haben (35).

#### **1.4 VASP und phosphoVASP**

VASP (Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein) ist ein regulatorisches, Aktin bindendes Protein und zählt zu den Zytoskelett-assoziierten Proteinen der Ena (Enabled)/VASP-Proteinfamilie, die eine Familie von proline-rich Proteinen darstellt. Proteine der Ena/VASP Familie regulieren u. a. den Aktinzusammenbau und die Zellmotilität. Man findet VASP in Thrombozyten, Lymphozyten, Leukozyten, Endothelzellen, vaskulären Glattmuskelzellen und Fibroblasten. Zudem handelt es sich bei VASP um ein Substrat der cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen. Es ist an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts und des Vesikel-Transports beteiligt. Als Mikrofilament-assoziiertes Protein tritt VASP u. a. an Zell-Zell Kontakten auf. VASP bindet an Profilin, Zyxin, Vinculin, F-Aktin und an Listeria monocytogenes Oberflächenprotein ActA (21, 64, 70, 97). Zwei Ena/VASP Homologie Domänen, EVH1 und EVH2, umrahmen im VASP-Molekül die zentrale proline-rich Domäne. EVH1 spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion. EVH2 Domäne vermittelt die Bindung und Bündelung von Aktinfilamenten. Die zentrale proline-rich Domäne interagiert mit Profilin (172). Durch Proteinkinase A und cGKI wird humanes VASP an Serin-157, Serin-239 und Threonin-278 phosphoryliert. Dabei ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle von cGMP/cGKI Ser-239 und von cAMP/PKA Ser-157 (21, 29). Die dephosphorylierte Form von VASP und das an Ser-239 phosphorylierte Protein weisen ein apparentes Molekulargewicht von 46 kDa auf. Die Phosphorylierung von VASP an Ser-157 führt zu einem shift von 46 kDa nach 50 kDa (37, 63).

## 1.5 Die physiologische Bedeutung der Niere

Die bohnenförmigen Nieren liegen retroperitoneal beiderseits der Wirbelsäule unterhalb des Zwerchfells und sind paarig angeordnet. In der Konkavität, die nach medial weist, besitzen sie eine Vertiefung, den Hilus (Nierenpforte); dieser ermöglicht den Ein- bzw. Austritt von Arteria renalis, Vena renalis, Lymphgefäßen und Nerven. Zudem befindet sich am Hilus die Austrittsstelle des Ureters (Harnleiters) aus dem Nierenbecken. Der Harnleiter ist für die Weiterleitung des Harns zur Vesica urinaria (Harnblase) verantwortlich. Um die Homöostase aufrechterhalten zu können, führen die Nieren lebensnotwendige Aufgaben aus. Zu diesen zählen u. a. die Regulation des Säure-Basen-Haushalts, die Exkretion harnpflichtiger Stoffwechselprodukte, die Kontrolle des Blutdrucks mit Hilfe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Überwachung des Wasser- und Elektrolythaushaltes. V. a. die Regelung der Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten steht im Vordergrund dieser Arbeit.

Die Niere gliedert sich in zwei Schichten, die äußere Rinde (Cortex renis) und das innere Mark (Medulla renis). In jeder Niere findet man etwa eine Millionen kleinster, morphologischer und funktioneller Einheiten, die Nephrone. Hier erfolgt die Harnbildung. Jedes Nephron setzt sich aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und dem Tubulusapparat zusammen (Abb. 3). Man unterscheidet corticale und juxtamedulläre Nephrone. Corticale Nephrone weisen kurze Henle-Schleifen auf. Die langen Henle-Schleifen der juxtamedullären Nephrone reichen dagegen bis in die Papille (6). Die Papille ist der Teil der inneren Medulla, der in das Nierenbecken ragt. Bei dem in der Nierenrinde liegenden Nierenkörperchen handelt es sich um ein Gefäßknäuel (Glomerulus), das in die sogenannte Bowman-Kapsel eingestülpt ist. Im Nierenkörperchen findet die Abfiltration des Primärharns statt. Im Tubulusapparat wird der Primärharn durch Resorptions- und Sekretionsprozesse in den Endharn umgewandelt. Da sich diese Arbeit v. a. mit der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts beschäftigt, wird im Weiteren näher auf den Tubulusapparat eingegangen. Dieser besteht aus dem proximalen Tubulus, der sich aus dem Pars contorta (Pars convoluta, gewundener Teil) und dem Pars recta (gerader Teil) zusammensetzt. Hier werden 60-80 % des glomerulären Filtrats reabsorbiert. Der auf den Pars convoluta folgende haarnadelförmig gewundene Abschnitt ist die Henle-Schleife (Loop of Henle). Zu dieser gehören der Pars recta des proximalen Tubulus, ein dünner absteigender (thin descending limb), ein dünner aufsteigender Teil und ein dicker aufsteigender Abschnitt (engl. TAL = thick ascending limb). Der TAL erstreckt sich über den Innen- und den Außenstreifen der äußeren Medulla und die Nierenrinde. In der Plasmamembran des TAL ist das Tamm-Horsfall Glycoprotein zu finden (153). Die Funktion dieses Glykoproteins ist noch nicht ganz geklärt. Zum Tubulusapparat zählt auch der distale

Tubulus, dessen dicker aufsteigender Schleifenschenkel in einen Pars convoluta übergeht (6, 98, 111). An dieser Stelle ist der sog. juxtaglomeruläre Apparat zu nennen, der aus den Renin-produzierenden Epitheloidzellen des Vas afferens (afferente Arteriole) und aus der Macula densa besteht. Die Macula densa stellt einen Bereich mit größeren Epithelzellen dar, an dem sich der distale Konvolut und das Vas afferens berühren (10). Neben der Messung der Chloridionenkonzentration der angrenzenden, luminalen Flüssigkeit regulieren die Macula densa Zellen die Reninfreisetzung und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) (tubuloglomerulärer feedback) (151). An den Pars convoluta des distalen Tubulus schließt sich das Sammelrohr an. Dieses führt den Harn zur Papillenspitze.

Im Zuge der glomerulären Filtration werden pro Tag ca. 180 l Primärharn gebildet. In Folge tubulärer Reabsorptionsprozesse werden täglich nur 1-2 l Urin ausgeschieden. Die selektive Durchlässigkeit bestimmter Segmente des Nephrons für Wasser, Ionen und Harnstoff ist bei der Harnkonzentrierung von entscheidender Bedeutung. Der dicke aufsteigende Schleifenschenkel der Henle-Schleife ist für die Harnkonzentrierung nach dem Gegenstromprinzip mitverantwortlich. Der Endharn kann bei Wassermangel bis auf die vierfache Osmolalität des Blutplasmas (ca. 290 mosmol/kg H<sub>2</sub>O) konzentriert werden, d. h. die Urinosmolalität liegt dann bei ca. 1200 mosmol/kg H<sub>2</sub>O (148). An der osmotischen Konzentrierung und Verdünnung des Urins sind mehrere Faktoren beteiligt. Im proximalen Tubulus ist die Reabsorption von Wasser mit der Reabsorption von Natrium verbunden und ist von Adiuretin unabhängig (6). Hinzu kommt die Resorption von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> im dicken Teil der Henle-Schleife, in dem Aquaporin nicht exprimiert wird und der für Wasser praktisch impermeabel ist (123). Des Weiteren spielt die Harnstoffkonzentrierung in der inneren Markzone eine Rolle. Zusätzlich beeinflusst Adiuretin die Wasser- und Harnstoffpermeabilität im Bereich des Sammelrohrs. Die variable Wasserpermeabilität des distalen Tubulus ermöglicht einen variablen Grad des osmotischen Gleichgewichts mit dem isotonen Cortex. Hinzu kommt die niedrige Durchblutung der Vasa recta. Das komplexe Zusammenspiel von medullären Nephron Segmenten und dem Gefäßsystem ist für die Bildung von konzentriertem Urin notwendig. Die Voraussetzung für die Bildung eines osmotischen Gradienten in Längsrichtung (vom Cortex bis zur Papillenspitze) stellt die parallele Anordnung der Henle-Schleifenschenkel dar, die sich zudem in ihren Resorptionseigenschaften unterscheiden. Aufgrund der Na<sup>+</sup>-Resorption im dicken aufsteigenden Schleifenschenkel nimmt die Na<sup>+</sup>-Konzentration im Tubuluslumen ab. Parallel kommt es zur einer Zunahme der Na<sup>+</sup>-Konzentration im Interstitium. Dies führt aus osmotischen Gründen zu einem Wasserentzug aus dem absteigenden Schleifenschenkel. Auf diese Weise erhöht sich die Na<sup>+</sup>-Konzentration im absteigenden Schenkel. Entscheidend ist die Auswirkung des tubulären Flüssigkeitsstroms. Aufgrund der Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration im oberen Abschnitt des absteigenden Schenkels kommt es im folgenden

Abschnitt, der von der Tubulusflüssigkeit durchflossen wird, zur weiteren Konzentrierung. Die Konzentration steigt von Abschnitt zu Abschnitt bis zum Schleifenscheitel immer mehr an. Diese Gegenstrommultiplikation führt im absteigenden Schenkel zu einer Zunahme der Osmolalität der strömenden Tubulusflüssigkeit. Nachdem der Schleifenscheitel passiert wurde, erfolgt im aufsteigenden Schenkel eine Abnahme der Osmolalität. So baut sich sowohl in der Henle-Schleife als auch im gesamten Interstitium ein osmotischer Längsgradient auf. Bis auf den aufsteigenden Schleifenschenkel liegt in allen Flüssigkeitsräumen, die sich auf derselben Höhe befinden, die gleiche Osmolalität vor. Im besagten Schenkel ist die osmotische Konzentration geringer als im umgebenden Interstitium (6, 148, 178).

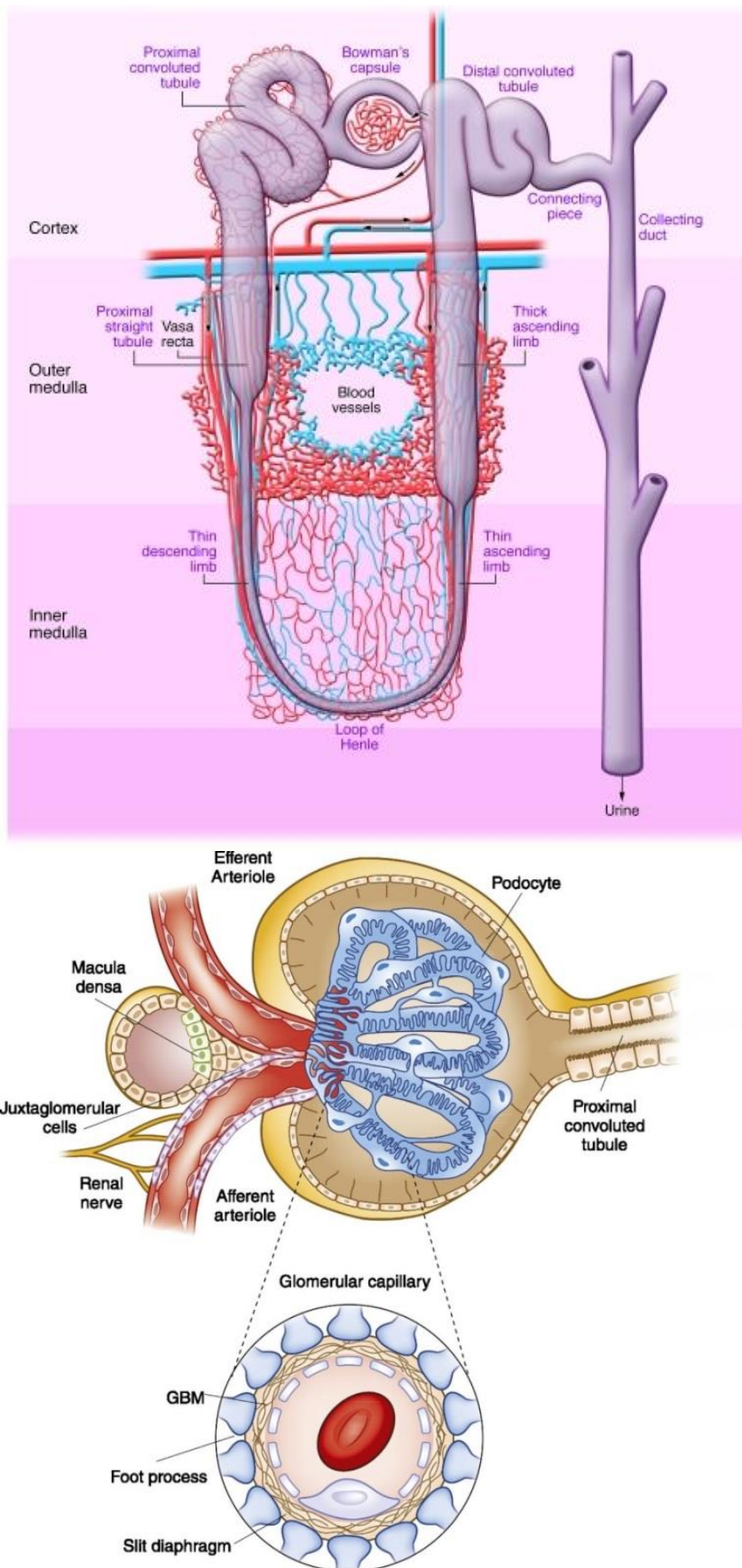


Abb. 3: Übersicht über ein Nephron (oben) (15) und Struktur des Glomerulus mit juxtaglomerulärem Apparat (unten) (140)

## 1.6 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Renin wird aus granulierten Epitheloidzellen der *vas afferentia*, die Teil des juxtaglomerulären Apparates der Nieren sind, abgegeben. Stimulus für die Reninfreisetzung sind Hyponatriämie, Hypovolämie, Abfall des arteriellen Blutdrucks im *vas afferens* und eine gesteigerte, durch  $\beta_1$ -Adrenozeptoren vermittelte Sympathikusaktivität. Renin spaltet als Protease bzw. Endopeptidase aus dem in der Leber produzierten  $\alpha_2$ -Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid AngiotensinI ab. Daran schließt sich die Umwandlung von AngiotensinI in das Oktapeptid AngiotensinII an, die durch das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) vermittelt wird. AngiotensinII wirkt als Vasokonstriktor und führt damit zu einer Reduktion des renalen Blutflusses. Zudem löst AngiotensinII Durst aus, führt zur Ausschüttung von Vasopressin aus der Neurohypophyse und von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark (6).

## 1.7 Dehydratation

Der Anteil von Wasser beträgt zwischen 60 und 70 % des Körpergewichts. Dieses Wasser verteilt sich auf den Intra- (zwei Drittel) und Extrazellularraum (ein Drittel). An dieser Stelle sei Natrium erwähnt, das ebenfalls eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Körperflüssigkeiten einnimmt. Während Kaliumionen für die intrazellulären Flüssigkeiten entscheidend sind, sind Natriumionen die Hauptionen in den extrazellulären Flüssigkeiten. Ein Anstieg der Osmolalität der Extrazellularflüssigkeit wird von Osmorezeptoren, die in der Region des Organum Vasculosum Lamina Terminalis (OVLT) und des Subfornical Organs (SFO) des Hypothalamus lokalisiert sind, gemessen (16, 115, 163). Die in der Zellmembran vorhandene  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Pumpe sorgt dafür, dass Natrium- und Kaliumionen osmotisch aktiv sein können, obwohl die Zellmembran für beide Ionen permeabel ist. Dabei werden die Ionen in ihr jeweiliges Kompartiment gepumpt. Gemäß des „Two –compartment model of  $\text{Na}^+$  balance“ soll bei der Akkumulation von 140 mmol  $\text{Na}^+$  ein Liter extrazelluläres Volumen zurückgehalten werden, um die Isoosmolalität im intra- und extrazellulären Raum aufrechtzuerhalten (164). Es existieren Daten, die darauf hindeuten, dass große Mengen von  $\text{Na}^+$  akkumuliert werden können ohne zu einer Wasserretention zu führen (72). Bei eingeschränkter Wasserzufuhr besitzen Säugetiere die einzigartige Fähigkeit hyperosmotischen Urin auszuscheiden und so freies Wasser einzusparen. Der nicht wahrnehmbare Flüssigkeitsverlust über Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt muss trotz renaler Wassereinsparung durch adäquate Flüssigkeitsaufnahme ausgeglichen werden (177).

Synonyme für die Dehydratation sind Dehydratisierung, Dehydration, Hypohydratation und Austrocknung. All diese Bezeichnungen stehen für einen Wassermangel des Körpers. Verringert sich die Körperflüssigkeit durch pathologische Abnahme der Flüssigkeitsaufnahme bzw. durch krankhafte Steigerung des Verlusts von Flüssigkeit, so hat dies die sog. Exsikkose zur Folge. Damit ist eine Austrocknung durch Verringerung der Körperflüssigkeit bzw. des Körperwassers eines Organismus gemeint. Der Flüssigkeitsverlust erfolgt entweder über den Magen-Darm-Trakt (Stuhlgang), die Lunge (Atemluft), die Haut (Transpiration) oder über die Nieren (Urin). Ursachen einer Dehydratation sind z. B. zu geringe Trinkmenge, Hitze, Fieber, körperliche Aktivität, Blutverlust (Hypovolämie, Schock), Sepsis, Verbrennung, Morbus Addison, Therapie mit Diuretika. Wasserentzug verursacht ein zelluläres Wasserdefizit, eine Zunahme der Osmolalität und eine Verringerung des Plasmavolumens (hyperosmotische Hypovolämie). Dies führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und zur Stimulation von Barorezeptoren, wodurch Durst ausgelöst wird. Zentrale Osmorezeptoren stimulieren die Vasopressinfreisetzung. Vasopressin verursacht eine Verminderung der Urinausscheidung infolge von erhöhter tubulärer Wasserreabsorption im Nephron (2, 89, 142). Bei Ratten bewirkt der Entzug von Wasser eine Zunahme der Plasmareninaktivität und der Konzentration von Angiotensin II im Plasma (38). Verminderte Gewebedurchblutung und Oligurie sind Folge von Dehydratation. Zur Diagnose wird der Hautturgor untersucht. Mit dessen Hilfe lassen sich aber nur Wasserverluste feststellen, die 5 bis 10 % des Körpergewichts ausmachen. Zusätzliche Indikatoren für eine Dehydratation sind die Konzentrationen von Kreatinin und Hämoglobin im Blut. Um eine Volumenverminderung von 2,1 % des Körpergewichts festzustellen wird die kinetische Analyse einer Bolusinfusion einer Ringer Lösung durchgeführt (183).

Man teilt die Dehydratation in drei Formen ein: hypotone, hypertone und isotone Dehydratation. Hypotone oder hyponatriämische Dehydratation ist die Folge des Verlusts von Elektrolyten, besonders Natrium. Der Anteil des Natriumverlusts ist größer als der des Wasserverlusts. Hierbei liegt neben einem Mangel an totalem Körperwasser v. a. ein Natriumdefizit vor. Klinisch manifestiert sich extrazellulärer Volumenmangel. Es kommt zur Stimulation des RAAS, Durst und Vasopressinfreisetzung. Hypotone Dehydratation tritt beispielsweise bei Einnahme von osmotischen Diuretika, Brandopfern und Niereninsuffizienz auf. Zur Behandlung verwendet man isotone Kochsalzlösung. Hypertone oder hypernatriämische Dehydratation wird durch Wassermangel verursacht. Aus dem extrazellulären Flüssigkeitsraum wird mehr Wasser als Natrium verloren. Dies ist beispielsweise bei extrarenalem Flüssigkeitsverlust wie Fieber, übermäßigem Schwitzen bei körperlicher Anstrengung ohne angemessene Wasseraufnahme (menschlicher Schweiß ist eine hypotone Flüssigkeit) der Fall. Auch eine erhöhte renale Ausscheidung wie bei diabetischem Koma oder Diabetes insipidus verursacht eine hypertone Dehydratation. Zur

Therapie wird 5%-ige Glucoselösung verabreicht. Wasser- und Elektrolytverlust resultieren in isotoner oder isonatriämische Dehydratation. Die Natriumkonzentration im Serum bleibt dabei normal (13, 41, 87, 93, 127, 179). Ursache hierfür ist beispielsweise Erbrechen. Die Behandlung erfolgt durch Infusion von isotoner Ringer-Lösung oder bei leichten Fällen durch Flüssigkeits- und Kochsalzaufnahme (32).

## 1.8 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter

### 1.8.1 NKCC1 und NKCC2

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  - Cotransporter (oder auch NKCCs), die an der Reabsorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (TAL = thick ascending limb) beteiligt sind und somit elektroneutrale Transportproteine darstellen, zählen zur Familie der CCCs (cation-chloride-cotransporter) (Abb. 4). Zu dieser Superfamilie gehören auch der im distalen konvoluten Tubulus vorkommende NCC ( $\text{K}^+$ -unabhängiger  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter) und die vier  $\text{Na}^+$ -unabhängigen  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter (KCC1, KCC2, KCC3 und KCC4) (44). NKCC1 (oder BSC2, Bumetanid-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  - Cotransporter) und NKCC2 (oder BSC1) sind die Isoformen des  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters. Diese werden von zwei verschiedenen Genen kodiert: SLC12A2 kodiert für NKCC1 und SLC12A1 für NKCC2. NKCC1 wird vor allem in der basolateralen Membran von sekretorischen Epithelzellen, aber auch in nicht-epithelialen Zellen exprimiert und kann prinzipiell in allen Körperzellen vorkommen. Dabei dient er unter anderem zur Regulation des Zellvolumens. Anders als NKCC1 kommt NKCC2 nur in apikalen Membranen und in subzellulären Vesikeln von Epithelzellen in medullären und corticalen Segmenten des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife und in Macula densa-Zellen der Niere von Säugetieren vor (56, 67, 126). Mit Hilfe des Furosemid-sensitiven Na-K-Cl-Cotransporters messen die Macula densa-Zellen Veränderungen in der luminalen NaCl-Konzentration (150). Es sind sechs Splicevarianten des Nieren spezifischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter Gens bekannt: die drei BSC 1-9 Varianten besitzen eine lange COOH-terminale Domäne, mBSC 1-A4, B4 und F4 hingegen verfügen über eine kurze COOH-terminale Domäne (138). Diese drei Varianten unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und in einer kleinen Region, die einen Teil der Transmembrandomäne 2 beinhaltet. Von dieser wird angenommen, dass sie die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Bindungsaffinität des Transporters bestimmt. Dies würde erklären, weshalb sich die drei Varianten in ihrer Affinität zu den Ionen unterscheiden (44). Darüber hinaus zeigen die Varianten ein unterschiedliches Lokalisationsprofil. So findet man NKCC2F im inneren Streifen der äußeren Medulla. NKCC2A befindet sich im äußeren Streifen der äußeren Medulla und im renalen Cortex. Dieser Transporter besitzt verglichen mit NKCC2F eine vierfach höhere Affinität zu  $\text{Na}^+$  und

$Rb^+$  und eine zweifach höhere Affinität für  $Cl^-$ . Die dritte Splicevariante NKCC2B ist nur in der Region der Macula densa lokalisiert (58). Die Aminosäurestruktur weist 12 transmembranäre Domänen, einen 454 Aminosäuren umfassenden COOH-Terminus und einen kleineren  $NH_2$  Terminus (174 Aminosäuren) auf (52). Der NKCC2 ist in der Niere für die Reabsorption von 20 % des filtrierten NaCl verantwortlich (67). Das luminal aufgenommene  $Na^+$  verlässt die Zelle an der basolateralen Membran im Austausch gegen  $K^+$  via  $Na^+-K^+-ATPase$  (176). In der TAL-Zelle sorgen weitere Ionentransportproteine für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gleichgewichts.  $K^+$  verlässt die Zelle an der luminalen Membran über den ROMK (renal outer medullary potassium channel) (42) und  $Cl^-$  wird mit Hilfe eines basolateralen  $Cl^-$ -Kanals (ClC-K2) aus der Zelle transportiert (96). Da im TAL keine Aquaporine exprimiert werden, ist dieses Nephronsegment für Wasser impermeabel (147).

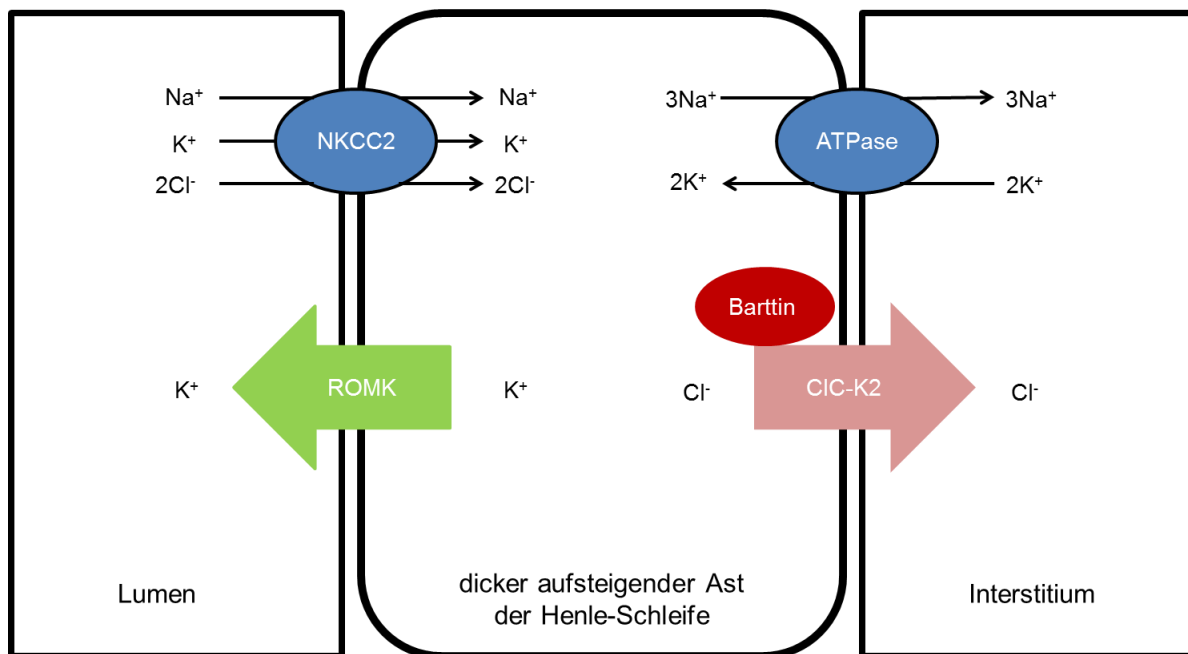


Abb. 4: Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife und seine Transporter (96)

### 1.8.2 NKCC2 Phosphorylierung und Vasopressin

In NKCC2 von Ratten, Mäusen, Kaninchen und Menschen findet man Phosphorylierungsstellen. Es werden Serine und Threonine sowohl am  $NH_2$ - als auch am COOH-Terminus phosphoryliert (5). Der von Flemmer et al. 2002 beschriebene Antikörper R5 detektiert phosphorylierte Threonine 212 und 217 in NKCC1 von Menschen (46). Gimenez und Forbush konnten (56, 57) unter Verwendung dieses Antikörpers zeigen, dass NKCC2 in den Nieren von Mäusen unter basalen Bedingungen an Threonin 96 und 101 phosphoryliert wird. Zudem stellten sie 2003 erstmals einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Aktivierung von NKCC2 her. Sie behandelten Mäuse mit dem

Vasopressinrezeptor  $V_2$  Agonisten dDAVP und erhielten unter Detektion mit dem phosphospezifischen Antikörper R5 ein um 100 % gesteigertes Signal für phospho-NKCC2. Zudem wiesen sie eine erhöhte Menge von NKCC2 in der apikalen Membran nach. Das antidiuretische Hormon Vasopressin erhöht cAMP und die Reabsorption von NaCl (57). Der NKCC2-abhängige Eintritt von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen im TAL kann u. a. durch eine Vasopressin vermittelte Erhöhung von cAMP stimuliert werden (119). Vasopressin erhöht die Oberflächenexpression von NKCC2 im TAL, indem es cAMP erhöht. Die totalen NKCC2 Level werden durch cAMP nicht verändert. Einige Daten deuten darauf hin, dass an dem cAMP vermittelten trafficking von NKCC2 zur apikalen Membran Mitglieder der VAMP Familie (Vesikel-assoziierte Membranproteine) beteiligt sind (52, 129).

Bei Vasopressin (Arginin Vasopressin AVP, antidiuretisches Hormon ADH, Adiuretin) handelt es sich um ein Peptidhormon, das in Nervenzellen (Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis) des Hypothalamus gebildet und in der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) ausgeschüttet wird. Ein Stimulus hierfür ist Hypertonie des Blutplasmas aufgrund von Wassermangel im Organismus. Dies wird durch Osmorezeptoren im Hypothalamus registriert. Des Weiteren führt der von den Barorezeptoren im rechten Atrium des Herzens und im Aortenbogen gemessene Volumenmangel zur Freisetzung von Vasopressin. Vasopressin bindet an  $V_1$ - Rezeptoren der Blutgefäße und  $V_2$ -Rezeptoren der Niere.  $V_1$ - Rezeptoren sind  $G_q$ -gekoppelt, wodurch Phospholipase C aktiviert und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) gebildet wird. Darauf folgt eine  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies führt über Calcium-Calmodulin zu einer Vasokonstriktion im glatten Muskel.  $V_2$ -Rezeptoren sind  $G_s$ -gekoppelt und führen zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC). Dadurch wird ATP zu cAMP umgewandelt und die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese sorgt für den Einbau von Aquaporin 2-Kanälen (AQP) in die apikale Membran der Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere. Dadurch wird die Reabsorption von Wasser gesteigert (16, 109, 113).

### 1.8.3 Furosemid

Furosemid zählt zu den Schleifendiuretika, die die potenteste Gruppe aller Diuretika darstellen. 15-25 % des glomerulär filtrierten  $\text{Na}^+$  wird aufgrund der Wirkung der Schleifendiuretika ausgeschieden. Weitere Vertreter der Schleifendiuretika sind Bumetanid, Piretanid, Torasemid und Etacrynsäure (144). Diese Arzneistoffe hemmen den NKCC2 in der luminalen Membran der tubulären Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife von der Lumenseite und blockieren so die Resorption von Natrium-, Kalium- und Chloridionen (19). Dies führt zu einer Reduktion der interstitiellen Hypertonizität im Mark und

der Fähigkeit der Niere zur Harnkonzentrierung. Darüber hinaus greifen die Schleifendiuretika vom Furosemid-Typ an NKCC2 der Macula densa-Zellen an. Auf diese Weise wird das tubulo-glomeruläre Feedback unterbrochen. Obwohl eine erhöhte Natriumionenkonzentration an der Macula densa vorliegt wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nicht erniedrigt. Die bei anderen Diuretika, wie beispielsweise bei den Thiaziden, auftretende physiologische Hemmung des Volumenverlustes ist aufgehoben. Schleifendiuretika zählen zu den sog. High-ceiling-Diuretika. Das bedeutet, dass diese Diuretika über einen weiten Dosisbereich eine annähernd lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweisen. Zudem steigert Furosemid die Ausscheidung von Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen und die Harnsäureretention. Der vasodilatatorische Effekt von Furosemid tritt vor dem diuretischen ein. Dadurch vermindert Furosemid die Vorlast (104). Vermutlich führt Furosemid zu Freisetzung von NO und dadurch zur Erweiterung venöser Blutgefäße (181). Das sympathikoadrenale- und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sind Gegenregulationsmechanismen, die durch die plötzliche Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens aktiviert werden. Die Ausscheidung von Natriumionen und Harn fällt nach dem initial sehr starken diuretischen Effekt von Furosemid unter den Kontrollwert vor der Gabe des Diuretikums ab. Diese „postdiuretische Natriumionenretention“ wird als Rebound-Effekt bezeichnet. Aufgrund der hohen Eiweißbindung von Furosemid bleibt eine Filtration im Glomerulus aus. Furosemid wird mittels eines Säurecarriers aktiv im proximalen Tubulus sezerniert und wirkt von der Lumenseite. Bis zu 50 % der verabreichten Dosis werden unverändert und in aktiver Form mit dem Urin ausgeschieden. Die Plasmahalbwertszeit von Furosemid liegt zwischen einer und drei Stunden. Der diuretische Effekt tritt schnell ein, hält jedoch nur vier bis sechs Stunden an. Daher zählt Furosemid zu den sog. „short-acting“ Schleifendiuretika. Eine maximal effektive Dosis eines Schleifendiuretikums ist in der Lage die Natriumreabsorption im TAL vollständig zu hemmen. Therapeutisch verwendet wird Furosemid beim akuten Lungenödem, bei Herz- und Niereninsuffizienz, zur forcierten Diurese bei Vergiftungen, bei akuter Hypercalcämie sowie bei Hypertonie mit eingeschränkter Nierenfunktion. Zu den unerwünschten Wirkungen zählen Hypovolämie, Hypotonie, erhöhte Thromboseneigung, Hypokaliämie, metabolische Alkalose aufgrund der  $H^+$ -Verluste, Hyperurikämie und reversibler Hörverlust (118, 128, 154).

## 1.9 Verwendete transgene Mäuse

Obwohl sich die Analyse von cGKI-knockout-Mäusen (cGKI-KO) sehr gut für die funktionelle Untersuchung der cGKI eignet, wurden in der vorliegenden Arbeit sogenannte cGKI $\alpha$ -SM22-rescue-Mäuse (im Folgenden als cGKI $\alpha$ -rescue bezeichnet), verwendet. Der Grund hierfür ist

der Tod von durchschnittlich 50 % der cGKI-knockout-Mäuse innerhalb der ersten 6 Wochen nach ihrer Geburt, der wahrscheinlich auf schwere vaskuläre und intestinale Defekte zurückzuführen ist (136). Durch stabiles Einbringen der kodierenden Sequenz der cGKI $\alpha$ -Isoform in den SM22-Locus der Maus (knockin), wurden cGKI $\alpha$ -SM22-rescue-Mäuse (bzw. cGKI $\beta$ -SM22-rescue-Mäuse) generiert. Auf diese Weise kam es zur Expression von cGKI $\alpha$  unter Kontrolle des SM22-Promotors (175). Nur in den glatten Muskelzellen (SM-Zellen) ist SM22 auffindbar (105, 156). Kreuzt man cGKI-knockin- mit cGKI-knockout-Tieren, werden Mäuse generiert, die durch eine spezifische Expression der cGKI $\alpha$ -Isoform im Glattmuskel gekennzeichnet sind (cGKI $\alpha$ -SM22-rescue-Mäuse). cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse exprimieren cGKI $\alpha$  nur unter Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen transgelin (SM22) Promotor in cGKI defizienten Hintergrund. Vergleicht man diese Mäuse mit den Total-knockout-Tieren, so ergibt sich eine viel höhere Widerstandsfähigkeit der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse, die sie lebensfähiger macht (175). Bei der immunhistochemischen Überprüfung ist festzustellen, dass die cGKI $\alpha$ -SM22-rescue-Mäuse cGKI nur in den renalen Arteriolen und nicht im juxtaglomerulären Apparat, Glomerulus und nicht im renalen Interstitium der Niere exprimieren (149). Aufgrund dieser Tatsache eignen sich die cGKI $\alpha$ -SM22-rescue-Mäuse zur Analyse der Funktion der cGKI in diesen Strukturen. Werden cGKI-knockout-Mäuse makroskopisch untersucht, so sind keine Unterschiede bzgl. Größe und Integrität der Nieren festzustellen (136). Auch ein offensichtlicher renaler Phänotyp lässt sich nicht erkennen (171). Es besteht keine Möglichkeit zwischen den beiden Isoformen funktionell zu differenzieren, was ein Nachteil der cGKI $\alpha$ -rescue-Linie ist. Durch eine Untersuchung Isoform spezifischer Substrate ist eine Umgehung dieses Problems möglich.

### **1.10 Ziele dieser Arbeit**

Schon seit den 1980er Jahren wird diskutiert, dass natriuretische/diuretische Effekte u. a. vom NO/cGMP-Signalweg vermittelt werden. Die Beeinflussung der Funktion der Nieren durch diesen Signalweg ist zweifellos bewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen NO/cGMP-Signalweg und der renalen Elektrolytausscheidung untersucht. Es ist bereits bekannt, dass cGMP die Oberflächenexpression des NKCC2 erniedrigt (4). Es ist allerdings noch unklar, über welchen Mechanismus dieser Vorgang vermittelt wird. Die Tatsache, dass die  $\alpha$ -Isoform der cGMP-abhängigen Proteinkinase im medullären Interstitium und im juxtaglomerulären Apparat der Niere exprimiert wird, könnte ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der cGKI bei der Regulation des Elektrolythaushalts sein. Schon Jin XH et al. vermuteten in einer 2001 veröffentlichten Studie, dass cGMP die Hemmung der Natrium Absorption im renalen Tubulusapparat direkt

vermittelt (86). Aufgrund kontroverser Diskussionen, ob und über welchen Mechanismus cGMP bei der Kontrolle des Natriumtransports in tubulären Zellen eine Rolle spielt, und ob cGMP die Natriumausscheidung *in vivo* beeinflusst, beschäftigte sich diese Arbeit mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) und ihrer Bedeutung in der renalen Natriurese und Diurese. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter. Frühere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass NO/cGMP an der Natriurese mitwirkt, die im frühen Stadium der Dehydratation zu beobachten ist. Die Exkretion von NO und cGMP im Urin und mRNA Level von drei Subtypen der NOS in der Medulla waren in Folge von Dehydratation erhöht (84). Des Weiteren steigerte Wasserentzug die cGKII mRNA und Protein Expression in der inneren Medulla (53). Dies führte uns zu der Frage, ob es möglicherweise eine Beteiligung des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs beim Mechanismus der Urinkonzentrierung im Rahmen der Dehydratation gibt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Mausmutanten

Die Haltung der Mäuse erfolgte im zentralen Tierlabor (ZTL) der Universität Regensburg in einem 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus mit ad libitum Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Alleinfutter für Ratten- und Mäuse-Haltung; ssniff, Soest, D). Zwei mindestens fünf Wochen alte Weibchen wurden für die Zucht mit einem mindestens sechs Wochen alten Männchen verpaart. Die Genotypisierung der Nachkommen, die nach vier Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt wurden, wurde mit Hilfe von Polymerasekettenreaktion (PCR) von Schwanzbiopsien durchgeführt. Für die Experimente wurden 8-14 Wochen alte Wildtyp (WT)-, cGKI $\alpha$ -rescue-, und cGKI-knockout-Mäuse herangezogen, die alle den genetischen Hintergrund 129/Sv aufwiesen. Die cGKI $\alpha$ -rescue-Mauslinie wurde von Silke Weber generiert (175).

Die Narkose der Tiere im Rahmen eines Tierversuchs wurde durch Inhalations-Anästhesie mit Isofluran (2,5 % Isofluran in Sauerstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) durchgeführt.

### 2.2 Puffer und Lösungen

Tab. 1: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotting Puffer A1	36,3 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting Puffer A2	3,6 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting Puffer K	3 g/l Tris; 5,8 g/l $\epsilon$ -Aminocaprinsäure; 20 % Methanol; pH 7,6
Dissektions-Puffer	0,3 M Sucrose, 25 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,2 + PI + PhosStop
Elektrophoresepuffer 10x	30 g/l Tris; 144g/l Glycin; 10 g/l SDS; pH 8,3
Fixierlösung Immunhistochemie	5,37 g/l NaCl; 3,42 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,38 g/l EGTA; 0,41 g/l $\text{MgCl}_2$ ; 34,2 g Glucose; 30 g/l Paraformaldehyd; pH 7,4
Laemmli Proben-Puffer 6x	1 g SDS; 0,93 g Dithiothreitol(DTT); 1,2 mg Bromphenol Blau; 7 ml Tris/SDS x4 pH 6,8; 3,6 ml Glycerin
Lubrol Puffer 2 %	20 mM Tris; 250 mM NaCl, 2 % Lubrol (Nonaethylenglycol-Monododecyl-Ether); pH 8
PBS	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4
Phosphataseinhibitor	PhosStop (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)

Bezeichnung	Zusammensetzung
Protease-Inhibitoren (PI)	Endkonzentrationen: Benzamidin: 1 mM; Leupeptin: 0,5 µg/µl; PMSF: 0,3 mM
TAE-Puffer 50x	242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure 100%; 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0); ad 1000 ml H <sub>2</sub> O dest.
TBS 10x	24,2 g/l Tris; 80 g/l NaCl; pH 7,6
TBST	TBS; 0,05 % Tween-20
Tris/EDTA	1,2 g/l Tris; 0,372 g/l EDTA; pH 8,5
Tris-HCl Puffer 0,6 M	60 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; ad 1000 ml MQ-H <sub>2</sub> O; pH 6,8
Tris-HCl Puffer 1,8 M	182 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; ad 1000 ml MQ-H <sub>2</sub> O; pH 8,8
Tris/SDS x4 Puffer	3,02 g Tris; 0,2g SDS; pH 6,8 ad 50 ml MQ-H <sub>2</sub> O; filtrieren

### 2.3 Antikörper für Western-Blots, Immunhisto- und Immunocytochemie

Tab. 2: Liste der verwendeten Antikörper: WB = Western-Blot; IH = Immunhistochemie

Antikörper gegen	Art	Tier	Verdünnung		Herkunft
			WB	IH	
β-Actin	primär	rabbit	1:2500		Abcam, Cambridge, UK
Na-K-ATPase	primär	mouse	1:3000		Santa Cruz, Heidelberg, D
Phospho VASP (Ser239)	primär	mouse	1:250		Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
Rab5A	primär	rabbit	1:250		Santa Cruz, Heidelberg, D
R5, phospho NKCC2	primär	rabbit	1:1000	1:100	Prof. Dr. B. Forbush, Yale University School of Medicine, USA
THP (Uromodulin)	primär	rat		1:55	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
T4 NKCC2 (supernatant)	primär	mouse		1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, USA
tNKCC2, anti-NKCC2	primär	rabbit	1:1000		StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Canada
VASP	primär	rabbit	1:2000		Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D

Antikörper gegen	Art	Tier	Verdünnung WB	IH	Herkunft
Mouse IgG HRP-conjugated	sekundär	donkey	1:20000		Dianova, Hamburg, D
Rabbit IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:50000		Dianova, Hamburg, D
Mouse IgG Alexa 488-conjugated	sekundär	donkey		1:200	Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Rabbit IgG Alexa 647-conjugated	sekundär	goat		1:200	Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Rat IgG Rhodamine (TRITC)-conjugated	sekundär	donkey		1:200	Dianova, Hamburg, D

**Tab. 3: Adsorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz-Farbstoffe**

	Adsorption [nm]	Emission [nm]
Alexa 647	647	666
Alexa 488	495, 492	519, 520
TRITC	550	573

Das Epitop, das von T4 erkannt wird, ist innerhalb der beiden Isoformen NKCC1 und NKCC2 gut konserviert. Für die vorliegende Arbeit musste, aufgrund der geringen Expression von NKCC1 in der Niere, kein Isoform-spezifischer Antikörper verwendet werden. T4 wurde in der Immunhistochemie und anti-NKCC2 (tNKCC2) (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Canada) für Western-Blot verwendet. Die phosphorylierte Form von NKCC2 wurde unter Verwendung des rabbit anti-R5 polyclonalen Antikörpers detektiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Forbush, Yale University, New Haven, CT, USA). R5 ist gegen die Phosphothreonine (Thr-184 und Thr-189; Hai NKCC1) gerichtet. Diese regulatorischen Threonine gehören zu einer Region, die die am höchsten konservierte Sequenz zwischen NKCC1 und NKCC2 und zwischen entfernt verwandten Tierspezies darstellt. Deshalb korrespondieren Hai Thr-184 und Thr-189 mit humanen Thr-100 und Thr-105 und mit Maus Thr-96 und Thr-101 im NKCC2 N-terminus (5, 46, 57).

## 2.4 Zellkulturmedium und Stimulantien

### Zellkulturmedium:

DMEM-F12 (Dulbeccos modified Eagles Medium/Nutrient Mixture F-12 HAM, mit 15 mM HEPES und Natrium Bicarbonat, ohne L-Glutamin, steril) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

### *Zusätze (Konz. im Medium):*

4 mM L-Glutamin (Invitrogen, Darmstadt, D)

100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)

5 % FCS (3302-P261414, Biotech GmbH, Aidenbach, D)

1 % nichtessentielle Aminosäuren (Invitrogen, Darmstadt, D)

### *Stimulantien:*

8-Br-cGMP (Bio Log, Bremen, D)

Isoproterenol (I 5627, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)

## 2.5 Primer (jeweils von mus musculus) für RT-PCR

### **cGKI common a:**

F: 5'-GGAGGATGTGAGAACAGCAAAT-3'

R: 5'-CAGCTCTACTCGTCCGAAACC-3'

### **cGKI common b:**

F: 5'-TCATTGACACCCTTGGAGT-3'

R: 5'-ATGTGGCGTTTCTTGAGG-3'

### **NKCC2:**

F: 5'-TAGCTATC GG CATCTA AAA C-3'

R: 5'-TTGCGGTAGTATTCAATCTTG G-3'

**HPRT:**

F: 5'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-3'

R: 5'-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACAA-3'

**18s-rRNA:**

F: 5'-AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC-3'

R: 5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCC AA-3'

**2.6 Chemikalien, Arzneistoffe und Verbrauchsmaterial**

Die Chemikalien, Arzneistoffe und Verbrauchsmaterialien wurden von nachstehend aufgeführten Firmen bezogen, falls nicht anders erwähnt:

AppliChem (Darmstadt, D), BD (Heidelberg, D), BioChrom AG (Berlin, D), BioLog (Bremen, D), Biometra (Göttingen, D), BioRad (München, D), Biotech GmbH (Aidenbach, D), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D), Brand GmbH & Co.KG (Melsungen, D), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, D), Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), Dianova (Hamburg, D), DiaSorin (Dietzenbach, D), Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, D), Eppendorf AG (Hamburg, D), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Fisher Scientific (Fair Lawn, New Jersey, USA), GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, USA), Intervet Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D), Invitrogen (Darmstadt, D), Janke&Kunkel KG, IKA Werke (Staufen, D), Merck (Darmstadt, D), MSD Animal Health (Unterschleißheim, D), PAA (Pasching, D), peqLab (Erlangen, D), Promega (Madison, USA), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), Roche (Mannheim, D), Saliter (Obergünzburg, D), Sarstedt (Nürnbrecht, D), Sherwood-Scientific Ltd (Cambridge, UK), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D), ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, D), Thermo Fisher Scientific (Life technologisches GmbH) (Darmstadt, D), USB Corporation (Cleveland, USA), Thermo Scientific (Rockford, USA), VWR International GmbH (Darmstadt, D), Whatman plc (Maidstone, UK). Das chirurgische Besteck stammt von Fine science Tools (Heidelberg, D).

**2.7 Densitometrie und Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung**

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots erfolgte mittels des Programms Image Lab Software Version 5.0 von BioRad. Dabei erhält man Volumenintensitäten der ausgewählten Banden. Abb. 5 zeigt die Formel, die zur Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung diente. „Behandelte Probe“ steht für Nieren, die Mäusen nach Injektion von

Furosemid entnommen wurden. Analog bezeichnet „unbehandelte Probe“ die Nieren der Kontrolltiere. Auf diese Weise wurde die Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2 bzw. von VASP ermittelt.

$$\begin{array}{r}
 \text{Zunahme der} \\
 \text{Phosphorylierung}
 \end{array}
 = \frac{\frac{\text{Wert behandelte Probe}}{\text{Wert unbehandelte Probe}} \quad \text{(Phospho-AK)}}{\frac{\text{Wert behandelte Probe}}{\text{Wert unbehandelte Probe}} \quad \text{(Gesamt-AK)}}$$

**Abb. 5: Bestimmung der Zunahme der Phosphorylierung**

## 2.8 Statistische Auswertung

Die Graphen wurden unter Verwendung von GraphPadPrism (Version 5.01) erstellt und ausgewertet.

Der Student's unpaired t-test diente zur Berechnung der statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Darstellung aller Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte in Form von Mittelwerten ( $\pm$  SEM). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten wird mit einem Stern (\*) dargestellt. Dabei wird  $p < 0,05$  als statistisch signifikant erachtet. Zwei Sterne (\*\*) zeigen hoch signifikante Unterschiede mit  $p < 0,01$  und drei Sterne (\*\*\*) höchst signifikante Unterschiede mit  $p < 0,001$  an. Es wird im Text darauf hingewiesen, falls ANOVA mit Bonferroni post-test verwendet wurde, um signifikante Unterschiede zwischen Gruppen zu berechnen. Die p-Werte sind wie oben beschrieben.

## 2.9 Stoffwechselversuche

Es wurden Metabolismus-Käfige der Firma Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpeißenberg, D) verwendet (Abb. 6). Diese Käfige ermöglichen eine Trennung von Urin und Faeces. Die Maus kann sich frei auf einem Gitternetz-Rost bewegen. Der von ihr abgegebene Urin wird unterhalb des Rostes nach Abfließen über einen konusförmigen Trichter in einem Auffanggefäß gesammelt. Die Mäuse wurden drei Tage lang an die Stoffwechselkäfige gewöhnt, wobei sie ad libitum Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter hatten. In dieser Zeit wurde kein Urin gesammelt. Für die Urin-Sammlung wurden die Käfige gereinigt, die Mäuse gewogen und das Gewicht des Futters bestimmt. Am Ende der Sammelperiode wurden die Mäuse und das Futter erneut gewogen. Für die Berechnung der Ionenkonzentration des Urins wurde der Mittelwert des Körpergewichts verwendet. Der aufgefangene Urin wurde mit Hilfe einer Pipette abgemessen, in Cups übergeführt, zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.9.1 Untersuchung des Effekts von Furosemid



Den Mäusen wurde i. p. (intraperitoneal) 200 mg/kg KG Furosemid injiziert. Dafür wurde eine Lösung mit 50 mg/ml Furosemid (Dimazon®) (MSD Animal Health, Unterschleißheim, D) verwendet. Der innerhalb der darauffolgenden zwei Stunden abgegebene Urin wurde gesammelt. Als Kontrolle diente der Urin von unbehandelten Mäusen, der innerhalb von 24 Stunden gewonnen wurde. Während der Sammelperiode hatten die Mäuse ad libitum Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter.

### 2.9.2 Versuche mit YC1

**Abb. 6: Stoffwechselkäfig**

Bei den Versuchen mit YC1 erfolgte eine i. p. Injektion von 25 mg/kg KG, und der innerhalb der darauffolgenden 10 Stunden abgegebene Urin wurde aufgefangen. Bei kombinierter Gabe von YC1 und Furosemid wurde den Mäusen zwei Stunden nach der YC1 Injektion (25 mg/kg KG), eine Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) i. p. verabreicht. Der Sammelzeitraum des Urins betrug hier zwei Stunden.

### **2.9.3 Wasserentzug**

Im Rahmen der Untersuchung einer möglichen Beteiligung von cGMP/cGKI an der Urinaufkonzentrierung wurden Dehydratationsversuche durchgeführt. Dafür wurden die Mäuse drei Tage in die Stoffwechsellkäfige eingewöhnt. Bei den Dehydratationsversuchen wurde den Mäusen 24 Stunden die Trinkflasche entzogen während sie ad libitum Zugang zu Standardfutter hatten. Zudem wurde über die Zeitspanne innerhalb von 24 Stunden nach der Periode des Wasserentzugs der Urin gesammelt. Während dieser Phase erhielten die Mäuse ad libitum Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Als Kontrolle dienten die Parameter, die unter basalen Bedingungen gewonnen wurden, das heißt 24 Stunden im Stoffwechsellkäfig mit ad libitum Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser.

### **2.10 Gewinnung von Serum**

Den anästhesierten Mäusen wurde unter Verwendung einer mit Heparin beschichteten Kapillare Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen. Zur Gerinnung lagerten die Blutproben 20 min auf Eis. Zur Trennung des Serums von den zellulären Bestandteilen des Blutes wurde 5 min 4.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Serumproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

### **2.11 Bestimmung des Hämatokritwertes**

Die Hämatokritkapillaren wurden bis zu 75 % mit Blut befüllt. Ein Ende der Kapillare wurde mit Kit verschlossen. Nun wurde 5 min bei 11.000 g zentrifugiert. Danach konnte mit Hilfe der Auswertscheibe der Hämatokritwert abgelesen werden.

### **2.12 Ermittlung der Elektrolytkonzentration im Blut und Urin**

#### **2.12.1 Natrium- und Kaliumionenkonzentration**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Natrium- und Kaliumionen im Urin und im Blut wurde ein Flammenphotometer (Gerät: M410 Flame Photometer, Sherwood-Scientific Ltd, Cambridge, UK) verwendet. Das dabei zu Grunde liegende Prinzip ist die Tatsache, dass thermisch angeregte Elektronen unter Emission charakteristischer Strahlung (Natriumionen: 589 nm, gelb; Kaliumionen: 766 nm, violett) in den Grundzustand zurückkehren. Die bei

diesem Übergang emittierte Lichtintensität ist direkt proportional zur Konzentration des jeweiligen Ions in der Probe.

Vor Beginn einer Messung erfolgte eine Eichung des Geräts mittels Lösungen bekannter Konzentrationen (1 ppm, 2 ppm, 5 ppm und 10 ppm Natrium bzw. Kalium). Diese wurden unter Verwendung einer Standardlösung (Flame Photometer Standard 140,0 mmol/l Na; 5,00 mmol/l K; 1,50 mmol/l Li; Sherwood-Scientific Ltd, Cambridge, UK) durch Verdünnung mit MQ-H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Proben wurden ebenfalls mit MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt (Tab. 4), um sie dem linearen Bereich der Standardverdünnungen anzupassen. Daraufhin wurden die verdünnten Proben in Doppelbestimmung vermessen. Eine erneute Kalibrierung wurde nach etwa acht Proben durchgeführt. Nach der Mittelung der Doppel-Werte erfolgten die Einberechnung des Verdünnungsfaktors und die Umrechnung der Einheit von ppm in mmol/l (mM). Dabei ist zu beachten, dass bei Natrium ein Massenanteil von 23 ppm und bei Kalium ein Massenanteil von 39 ppm annähernd einer 1 mM Konzentration entspricht.

**Tab. 4: Verdünnungen von Urin bzw. Serum für Flammenphotometer**

<b>Normal-Salz</b>	<b>Natrium</b>	<b>Kalium</b>
<b>Urin</b>	1:1000	1:2500 bzw. 1:5000
<b>Serum</b>	1:1000	1: 200

### **2.12.2 Chloridionenkonzentration**

Die Bestimmung der Chloridionenkonzentration im Urin erfolgte mit Hilfe des 9180 Elektrolyt-Analyzers der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D). Die Funktionsweise des Analyzers beruht auf dem Prinzip der ionenselektiven Elektrodenmessungen. Dabei wird ein unbekannter Messwert mit einem bekannten Messwert verglichen, auf diese Weise erhält man die Elektrolytwerte der Probe. Hierfür befindet sich im Gerät eine Referenzelektrode.

Durch eine ionenselektive Membran kommt es zur Auslösung einer bestimmten Reaktion mit dem jeweiligen Elektrolyt der Probe. Bei der Membran handelt es sich um einen Ionentauscher. Die elektrischen Veränderungen der Ionen führen zur Veränderung des Membranpotentials bzw. der Messspannung. Die Messspannung wird zwischen Elektrode und Probe aufgebaut. Innerhalb der Elektrode sorgt eine galvanische Messkette für die Bestimmung des Unterschieds zwischen zwei möglichen Werten auf beiden Seiten der Membran. Auf der einen Seite ist die galvanische Kette durch die Probe mit der

Referenzelektrode, dem Referenzelektrolyt und dem „offenen Anschluss“ abgeschlossen. Auf der anderen Seite erfolgt der Abschluss der Kette durch die Membran, das innere Elektrolyt und die innere Elektrode. Durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen zwischen dem inneren Elektrolyt und der Probe kommt es zur Bildung eines elektrochemischen Potentials auf der Membran der aktiven Elektrode. Die innere Elektrode leitet dieses Potential an den Eingang eines Vorverstärkers weiter. Die geerdete Referenzelektrode ist an den zweiten Eingang des Vorverstärkers angeschlossen.

Vor der Vermessung wurden die Proben im Verhältnis 1:3 mit einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten Verdünnungslösung verdünnt.

### **2.13 Bestimmung der Osmolalität von Urin und Serum**

Für die Ermittlung der Osmolalität in Serum und Urin von Mäusen wurde der Gefrierpunkt Osmometer OSMOMAT® 030 von Gonotec GmbH (Berlin, D) eingesetzt. Dieses Gerät dient zur Bestimmung der Gesamtosmolalität wässriger Lösungen. Dabei kommt die Messung der Gefrierpunktserniedrigung zur Anwendung. Die Gefrierpunktserniedrigung ist direkt proportional zu den gelösten Teilchen, daher wird mit dem OSMOMAT® 030 direkt die Osmolalität gemessen. Das der Bestimmung zu Grunde liegende Prinzip ist die Durchführung einer vergleichenden Messung der Gefrierpunkte von reinem Wasser und einer Lösung. Wasser weist einen Gefrierpunkt von 0 °C auf. Eine Lösung mit einer Salzkonzentration von 1 osmol/kg besitzt einen Gefrierpunkt von -1,858 °C.  $6,023 \times 10^{23}$  Teilchen gelöst in einem Kilogramm Wasser, das heißt ein Mol eines beliebigen nicht dissoziierten Stoffes erniedrigen den Gefrierpunkt einer Lösung um 1,858 °C. Die Osmolalität ermöglicht die Angabe der Konzentration aller osmotisch aktiven gelösten Teilchen in einem Lösungsmittel.

Bevor die Gesamtosmolalität einer Probelösung (50 µl) gemessen werden kann, ist eine Kalibrierung des OSMOMAT 030 mit destilliertem Wasser und einer Kalibrierlösung (300 mosmol/kg) notwendig.

### **2.14 Bestimmung von cGMP und Vasopressin im Urin**

Der Gehalt an cGMP im Urin und Nierengewebe von Mäusen wurde unter Verwendung des Cyclic GMP EIA Kits von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) ermittelt. Dabei wurden unterschiedliche Urinverdünnungen (zwischen 1:750 und 1:2.000) verwendet.

Die quantitative Bestimmung von Vasopressin im Urin erfolgte mittels des arg<sup>8</sup>-Vasopressin EIA kits von Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, D).

Dabei handelt es sich um sog. ELISA-Kits (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), die häufig eingesetzt werden, um second-messenger und Hormone zu analysieren. Das Vorgehen richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Diesen ELISAs liegt ein immunologisches Prinzip ähnlich dem des Immunoblots zugrunde. Dabei bindet ein primärer Antikörper an den Boden einer Mikrotiterplatte. Auf die Zugabe der entsprechend vorbereiteten Proben folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser ist mit einem sog. Detektionsenzym gekoppelt. Dieses geht mit dem anschließend hinzugefügten Substrat eine enzymatische Reaktion ein. Im Falle von cGMP EIA reagiert das im Ellman`s Reagenz enthaltene Substrat mit Acetylcholinesterase. Bei arg<sup>8</sup>-Vasopressin EIA reagiert p-Nitrophenylphosphat mit alkalischer Phosphatase. Vergleicht man nun die Intensität der dabei auftretenden Farbänderung mit derjenigen der entsprechenden Standardreihe, so ermöglicht dies eine quantitative Aussage.

## 2.15 Ermittlung der Reninkonzentration im Plasma

Die Bestimmung der Reninkonzentration wurde mit Hilfe des RENCKT Angiotensin I Radioimmunoassay Kits (DiaSorin, Dietzenbach, D) durchgeführt. Zur Blutentnahme wurde die Vena facialis punktiert. Dazu wurden die Mäuse durch Zwangsgriff im Nacken fixiert. Dies führte zu einer Anstauung der Vena facialis. Die Vene wurde mit einer 19G-Kanüle dorso-kaudal des Haarwirbels am Unterkiefer punktiert. Die Sammlung des Blutes erfolgte mittels EDTA beschichteter 75 µl Kunststoffkapillaren. Anschließend wurden Hämatokrit und Plasma durch Zentrifugation der Kapillaren voneinander getrennt. Das so erhaltene Plasma wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Plasmaproben wurden in 20-facher Verdünnung eingesetzt. Zunächst wurde das Plasma 1:10 mit Maleatpuffer (siehe unten) verdünnt. Das verdünnte Plasma wurde mit Renin-Substrat versetzt, das nach bilateraler Nephrektomie aus dem Blutplasma von Ratten gewonnen wurde. Das Renin-Substrat wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Hayo Castrop des Instituts für Physiologie der Universität Regensburg (Regensburg, D) zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde 3-24 Stunden bei 37 °C inkubiert („Warmwert“). Die Bestimmung der Plasma Renin Konzentrationen erfolgte als Generierung von AngiotensinI/ml/h. Ein analog zusammengesetzter Ansatz der Plasmaproben, der für den gleichen Zeitraum bei 4 °C inkubiert wurde („Kaltwert“), diente als Referenz und wurde als „0-Wert“ angesehen. Dazu wurden diese Angiotensin I-Werte von den Warmwerten der Plasmaproben subtrahiert (27).

Maleat-Puffer:

4,06 g Tris (33 mM)

5,80 g Maleinsäure (50 mM)

2,96 g EDTA (8 mM)

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

Mit NaOH auf pH = 6 einstellen

## **2.16 Immuncytochemie und Immunhistochemie**

Zum Nachweis der Lokalisation von Proteinen in Zellen (Immuncytochemie) und Gewebeschnitten (Immunhistologie) kamen immunhistochemische Techniken zur Anwendung. Die verwendeten spezifischen Antikörper (AK) sind bei dieser Detektion mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, radioaktiven Isotopen oder partikulärem Material gekoppelt. Diese Methode ist nur aussagekräftig, falls die verwendeten Antikörper spezifisch sind und die Stabilität der antigenen Determinante gewährleistet ist.

### **2.16.1 Immuncytochemie**

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Markierung angewendet. Nach der Bindung des primären, unkonjugierten Antikörpers an das entsprechende Antigen der fixierten Zellen erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Alexa 647, Alexa 488, TRITC) gekoppelt und gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist. Anschließend wird der Fluorophor mit Licht der jeweiligen Wellenlänge angeregt, sodass die Betrachtung des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes unter dem Mikroskop möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden MKTAL (mouse kidney thick ascending limb) Zellen verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Soline Bourgeois (Universität Paris, F) zur Verfügung gestellt (18). Um die MKTAL Zellen immuncytochemisch zu untersuchen, wurden 8.000 Zellen/well mit je 150 µl Medium in speziellen 8-well-Platten (BD-Falcon culture micro slide 8 well, 734-0089; Becton-Dickinson, Heidelberg, D) ausgesät. Daraufhin erfolgte eine Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 72 Stunden. Nach dieser Zeit waren die Zellen konfluent. Nun wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für zwei Stunden mit

FCS freiem Medium inkubiert. Dem schloss sich die Stimulation der Zellen an, wobei vier unterschiedliche Bedingungen gewählt wurden. Die ersten beiden nebeneinander liegenden Vertiefungen blieben unstimuliert und enthielten nur FCS freies Medium. In zwei weiteren Vertiefungen wurde mit 1 mM 8-Br-cGMP (eine Stunde), in den nächsten Vertiefungen mit 5  $\mu$ M Isoproterenol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) (30 Minuten) und in den verbleibenden zwei Vertiefungen mit 1 mM 8-Br-cGMP (BioLog, Bremen, D) (eine Stunde) dann 30 Minuten mit 5  $\mu$ M Isoproterenol und schließlich nochmals eine Stunde mit 1 mM 8-Br-cGMP stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Lösungen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung von 200  $\mu$ l 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS pro well für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Um das PFA zu entfernen, folgten nun drei Waschschrte für je fünf Minuten mit je 500  $\mu$ l PBS. Das daraufhin verwendete Detergens (0,2 % Triton-X100 in PBS, für 10 Minuten 250  $\mu$ l pro well) diente zur Permeabilisierung der Zellmembranen, um die Diffusion der Antikörper in das Cytosol der Zellen zu erleichtern. Die nun folgende Blockade (für ein bis zwei Stunden) bei Raumtemperatur am Feuchtkammerschüttler mit 250  $\mu$ l 10 % Horse Serum /1 % BSA in PBS diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Die Blockierlösung wurde abgesaugt und die Zellen mit den jeweiligen Primär-Antikörpern (in 2,5 % Horse Serum in 1 % BSA/PBS, 150  $\mu$ l/well) über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit je 500  $\mu$ l 1 % BSA/PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundär-Antikörper (in 150  $\mu$ l 1 % BSA/PBS) dazu pipettiert. Dieser band bei Raumtemperatur im Dunklen innerhalb von zwei Stunden an den Primär-Antikörper. Um ungebundene Antikörperreste zu beseitigen, wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Dem schloss sich die Konservierung der Zellen mit Glycergel (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, Hamburg, D) an. Zum Mikroskopieren wurde ein Axio-Observer Z1, Carl Zeiss (Jena, D) verwendet.

### **2.16.2 Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie detektiert man Antigene in Gewebeschnitten. Diese Technik weist große Ähnlichkeit mit der der Immuncytochemie auf. Ein Unterschied ist der mit der Immunhistochemie verbundene Aufwand, da das betreffende Gewebe perfundiert, fixiert, dehydriert und für Paraffin-Schnitte in Paraffin einbettet werden muss. Daran schließt sich das Schneiden und Aufziehen auf Objektträger an. Erst dann ist die Durchführung der eigentlichen Antigen-Antikörper-Reaktion möglich.

### Perfusion

Zunächst erfolgte eine Narkose der Mäuse mit Isoflurananästhesie. Anschließend wurde das Abdomen geöffnet und die Bauchaorta freipräpariert. Unterhalb der Abgänge der Arteriae renales wurde die Aorta abgeklemmt. Nun war durch einen kleinen Schnitt distal zur Klemme das Einführen des Perfusionskatheters möglich. Der Katheter wurde mittels einer weiteren Klemme fixiert. Anschließend wurde die Vena cava inferior angeschnitten, um das Abfließen der Perfusionslösung zu ermöglichen. Daraufhin wurde die proximale Aortenklemme entfernt und über den Katheter ca. 15 ml isotonische NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, D) mit 10 I.E./ml Heparin (Ratiopharm, Ulm, D) infundiert bzw. Paraformaldehyd-Lösung, welches einen gerinnungsfreien Blutaustrom ermöglichte. Die Paraformaldehyd-Lösung ermöglicht eine zusätzliche Fixierung der Proteinstruktur. Das Erhalten der Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand wird durch Quervernetzung, die autokatalytische Prozesse verhindert, gewährleistet. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, dass das Gewebe steifer wird und sich dadurch leichter schneiden lässt. Nun wurden die Nieren entnommen und bis zur weiteren Verwendung in 70 % Methanol gelagert.

### Dehydrierung und Paraffineinbettung

Zunächst wird eine schrittweise Dehydrierung der fixierten Niere (70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % und 100 % Methanol je 30 min) durchgeführt. Dem schloss sich eine dreimalige Spülung mit 100 % Isopropanol für je 30 min an. Das dritte Isopropanolbad erfolgte bei 45 °C im Wärmeschrank. Daraufhin wurden die Nieren in ein auf 55 °C temperiertes Isopropanol/Paraffin (1:1) – Gemisch gegeben, um die Diffusion des Paraffins in das Gewebe zu ermöglichen. Anschließend wurden die Nieren für mindestens 24 Stunden bei 60 °C in reinem Paraffin (Paraplast X-tra P3808, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) getränkt. Nun ließen sich die Gewebe in „Förmchen“ in flüssiges Paraffin einbetten. Für mindestens 24 Stunden wurde dem Paraffin bei 4 °C Zeit gegeben um auszuhärten, bis man die Nieren schneiden konnte.

### Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Ein Rotationsmikrotom (Microm HM355<sub>s</sub>; Thermo Scientific; Waltham, USA) diente zur Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten. Diese wurden in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger (Polysine<sup>TM</sup>; Meinel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Um die Schnitte nun färben zu können, wurden sie zweimal 10 Minuten in 100 % Xylol, dreimal 5 Minuten in 100 % Isopropanol und zuletzt

zweimal 5 Minuten in 100 % Methanol getaucht. Zuletzt wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht. Auf diese Weise wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert.

### Immunhistochemische Färbung

Die Methode des Färbens von Gewebeschnitten läuft ähnlich dem Färben von Zellen ab. Die entparaffinierten Schnitte wurden kurz in destilliertes Wasser getaucht und durch Kochen in Tris/EDTA (Zusammensetzung siehe Tab. 1) (für eine Stunde) demaskiert. Dadurch wird die Immunreaktivität der Proteine wieder hergestellt, da die durch die Fixierung erfolgte Quervernetzung der Proteine teilweise wieder rückgängig gemacht wird. Danach wurden die Schnitte ca. 15 Minuten abgekühlt, bis sie Raumtemperatur erreicht hatten. Nun wurden die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur in eine Blockierlösung (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol) getaucht. Dem schlossen sich zwei fünfminütige Waschschriffe in PBS an. Daraufhin wurde auf die mit einem Fettstift umrandeten Schnitte 10 % Horse Serum in 1 % BSA in PBS (für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur) gegeben, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Über Nacht erfolgte anschließend bei 4 °C im Feuchtkammerschüttler die Inkubation der Schnitte mit dem ausgewählten Primär-Antikörper (in 2,5 % Horse Serum in 1 % BSA in PBS). Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal je 5 Minuten mit 1 % BSA in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörper (in 1 % BSA in PBS verdünnt) unter Lichtausschluss für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit Glycerin (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, Hamburg, D) und Deckgläschen versiegelt. Mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.5 (Carl Zeiss, Jena, D) konnten Übersichtsbilder an dem Mikroskop Axio-Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, D) aufgenommen werden. Dabei wurden die einzelnen Bildquadrate mittels AxioVision zu einem großen Bild zusammengefügt. Darüber hinaus wurden Schnitte unter Verwendung der CLSM (confocal laser scanning microscopy) analysiert. Dabei wurde ein Axio-Vert 200 M Confocalmikroskop, das an ein Zeiss LSM 510 Scanning device (Carl Zeiss, Jena, D) gekoppelt war, eingesetzt. Die Bildaufnahme erfolgte mittels eines Plan-Neofluar 40x/1.30 Ölimmersionsobjektivs.

## 2.17 mRNA Bestimmung und reverse Transkriptase/Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

### Isolierung von TAL aus Nierengewebe

Corticaler und medullärer TAL wurden isoliert wie in (168) beschrieben. Anschließend wurden die TALs von unterschiedlichen Nieren von Wildtyp-Mäusen gepoolt. Die TALs wurden freundlicherweise von Frau Dr. Helga Vitzthum vom Lehrstuhl für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Hamburg, D) und Herrn Prof. Hayo Castrop des Instituts für Physiologie der Universität Regensburg (Regensburg, D) zur Verfügung gestellt.

### RNA-Extraktion

Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des PeqGOLD TriFast™ Reagenzes (PeqLab, Erlangen, D), welches auf der Phenol/Chloroform-Extraktion basiert, durchgeführt. Dazu wurden für eine ganze Niere 2 ml TriFast eingesetzt und die Niere auf Eis mittels des Ultra Turrax (Janke&Kunkel KG, IKA Werke, Staufen, D) homogenisiert. Dem schloss sich eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Für die RNA-Aufarbeitung wurden 200 µl Chloroform je ml TriFast dazu pipettiert, für 15 Sekunden heftig gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnte für 30 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert werden. Danach wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein 4 ml PP-Röhrchen mit spitzem Boden übergeführt. Nach der Zugabe von 500 µl Isopropanol je ml TriFast wurde gut gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde für 30 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgekippt, anzentrifugiert und die restliche Lösung abpipettiert. Das auf diese Weise erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol je ml TriFast gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 12.000 g bei 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, anzentrifugiert und die übrige Lösung abpipettiert. Das Pellet wurde kurz getrocknet und je nach Größe in ca. 150 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Als nächstes wurde die isolierte RNA zur Konzentrations- ( $A_{260}$ ) und Qualitätsbestimmung ( $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{260}/A_{230}$ ) mit dem Eppendorf BioPhotometer C43/EG (Eppendorf AG, Hamburg, D) UV-photometrisch vermessen. Dabei gibt das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis die Proteinverunreinigung an (Norm-Bereich liegt zwischen 1,6 und 2,0). Das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis gibt die Phenolverunreinigung wider (ideale Werte liegen zwischen 2,0 und 2,2).

### Reverse Transkription

Der dieser Methode zu Grunde liegende Vorgang (reverse Transkription) beruht auf der Synthese einer cDNA (complementary DNA) durch eine reverse Transkriptase (RT, RNA-abhängige DNA-Polymerase).

Zuerst wurden 2 µg RNA auf ein Gesamtvolumen von 9 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Diesem Gemisch wurde nun 1 µl oligo dT-Primer (0,5 µg/µl, Fermentas, St. Leon-Rot, D) zu gegeben. Während des sich daraufhin anschließenden Primer-Annealings, das bei 65 °C für 5 Minuten in einem T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) erfolgte, wurde der Mastermix hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzt (Angaben pro Probe):

**Tab. 5: Mastermix für reverse Transkription**

Bestandteil	Menge [µl]	Herkunft
dNTP (2,5 mM)	4,0	Fermentas, St. Leon-Rot, D
5 x first strand Puffer	4,0	Life Technologies, Darmstadt, D
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,5	Lehrstuhlinterne Herstellung
RNasin	0,5	Promega, Madison, USA
RT (M-MLV)	1,0	Life Technologies, Darmstadt, D

Es wurden 12 µl des Mastermixes (siehe Tab. 5) pro Probe eingesetzt, gut gemischt und kurz anzentrifugiert. Die Cups wurden in den T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) gestellt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dem schloss sich ein weiterer Schritt bei 95 °C für zwei Minuten an, bei dem das Enzym inaktiviert wurde. Die auf diese Weise erhaltene cDNA stellt eine Template für die nun folgende reverse Transkriptase und quantitative real time Polymerasekettenreaktion (PCR) dar und wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

12 µl cDNA Lösung wurde mit 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 25 pmol jeden Primers, 0,5 µl 10 mM dNTP Lösung und 1.25 U Taq Polymerase (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) zu einem Endvolumen von 25 µl für die PCR versetzt. Nun wurden die Proben in einem T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) zunächst bei 94 °C für drei Minuten denaturiert. Daran schlossen sich 37 Zyklen (95 °C/30 Sekunden, 61 °C/30 Sekunden, 72 °C/30 Sekunden) an. Ein letzter Schritt bei 72 °C für fünf Minuten beendete die PCR. Die PCR Produkte wurden mittels 3 % Agarosegele [4,5 g Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D) 150 ml TAE-Puffer x1, 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, D)], nach Größe getrennt. Für 25 µl PCR Ansatz wurden 5 µl 6xLoading

Dye (Thermo Fisher Scientific, Life technologies GmbH, Darmstadt, D) eingesetzt. Zum Nachweis der mRNA Expression von cGKI im TAL diente der cGKI common a Primer. HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) wurde als interner Standard verwendet.

### Quantitative real time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Der RT-PCR liegt das Vervielfältigungsprinzip der herkömmlichen PCR zu Grunde. Der Vorteil besteht in der Möglichkeit die gewonnene DNA mittels Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, zu quantifizieren. Die Fluoreszenz nimmt mit der Menge der PCR Produkte proportional zu. Durch Bindung des DNA-Farbstoffs SYBR Green (Absorptionswellenlänge: 498 nm, Emissionswellenlänge: 522 nm) an die doppelsträngige DNA wird die Reaktion eingeleitet. Gebundenes SYBR Green fluoresziert viel (ca. 1.000-fach) stärker als der freie Farbstoff. In der Elongationsphase wird die Messung durchgeführt. Auf diese Weise kann aus dem Verlauf der Emission über die Zyklenzahl auf die vorliegende Ausgangsmenge der verwendeten cDNA geschlossen werden. Die Verdopplung der DNA-Menge an spezifischem Produkt während der exponentiellen Phase erfolgt idealerweise mit jedem Zyklus. Anschließend kommt es zu einer Abflachung und Übergang in die Sättigung (Verbrauch der Nukleotide) der Kurve. Ct oder Cp dient zur Bezeichnung der Zyklenzahl, die nötig ist, bis ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann, das über dem Hintergrund liegt. Dabei darf nicht vorausgesetzt werden, dass eine absolute Korrelation der verwendeten RNA-Menge mit der erhaltenen cDNA-Menge vorliegt. Daher ist eine Normalisierung auf die stabile Expression eines Referenzgens nötig. Hier wurde 18s-rRNA als Housekeeping-Gen verwendet. Zur Detektion von cGKI wurde cGKI common b Primer verwendet.

Für die hier vorliegenden Arbeit wurde das Roche Lightcycler<sup>®</sup> 480 System mit dem Roche Lightcycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master (2x) (Roche, Mannheim, D) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes in einer 96-Loch-Multi-Platte (zum Roche-System zugehörig) lautet:

18 µl SYBR Green-Mastermix (mit PCR-grade H<sub>2</sub>O auf 1x verdünnt)

2 µl cDNA

je 1 µl der forward- bzw. reverse-Primer (in der Konzentration 5 µM) (siehe 2.5)

Real Time PCR:

10 min	95 °C	
15 sek	95 °C	} 45 Zyklen
15 sek	58 °C	
20 sek	72 °C	

Auswertung

Bei der Auswertung kam die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Anwendung.

Die Zyklenzahl, ab der das Signal, das von SYBR Green emittiert wird, einen gewissen Schwellenwert überschreitet, wird durch den Ct-Wert dargestellt. Dabei berechnet man den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer Probe durch Subtraktion des Ct-Wertes des Housekeeping-Gens (H) vom Ct-Wert des Zielgens (Z).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(Z) - \text{Ct}(H)$$

Den  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert erhält man, indem der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Kontrolle (K) vom  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Probe (P) subtrahiert wird.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(P) - \Delta\text{Ct}(K)$$

r gibt das Expressionsverhältnis an und errechnet sich aus der negativen Potenz des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes zur Basis 2.

$$r = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

## 2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (103). Die Proteine, an die das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet, werden durch Hitze denaturiert. Die Anlagerung der SDS-Moleküle verhält sich zahlenmäßig proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld.

#### *Probenvorbehandlung:*

Die Mäuse wurden getötet und die Nieren entnommen. Nach Entfernen der Kapsel wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Nieren wurden gewogen und nach Zugabe der vierfachen Menge an 2 % Lubrolpuffer, der mit Phosphataseinhibitor PhosStop (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) und Proteaseinhibitoren versetzt wurde, mit dem Ultraturrax (Janke&Kunkel KG, IKA Werke, Staufen, D) homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung mit Hilfe des Qubit-Photometer (Protein/DNA-Konzentrationsbestimmung, Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

#### *Durchführung:*

Die Herstellung der in der SDS-PAGE verwendeten Gele (Inhaltsangaben Tab. 6, die Angaben beziehen sich auf die für vier Gele benötigte Menge) wurde mit dem Mini-Protean-System (BioRad, München, D) durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. zwei cm unter den Rand gegossen und anschließend mit Ethanol überschichtet. Die Polymerisation des Trenngels dauerte ca. eine Stunde. Danach wurde die Oberfläche mit Wasser gespült, das Sammelgel (5 %) aufgegossen und der Kamm eingesetzt. Nach erfolgter Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die nun entstandenen Taschen konnten mit Wasser gespült werden. Das zwischen zwei Glasplatten befindliche Gel wurde daraufhin in Mini-Protean Tetra Cell-Kammern (BioRad, München, D) eingesetzt, um die Elektrophorese durchzuführen. Die Ansätze bestehend aus Probe (70 µg) ad 10 µl Wasser und 10 µl 2 x Laemmli wurden für 3 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Befüllung der Geltaschen. Neben den Proben wurde stets in einer Lane ca. 6,5 µl eines Protein-Größenmarkers (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford,

USA) aufgetragen. Daraufhin startete die Elektrophorese, die bei 150 Volt und einer Dauer von ca. 90 min ablief.

**Tab. 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (jeweils für vier Gele)**

Bestandteil	Trenngel 11,5 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
H <sub>2</sub> O	6,5 ml	5,9 ml	3,6 ml
30 % Acrylamid / 0,2 % Bisacrylamid	6,5 ml	7,1 ml	0,83 ml
Tris-HCl Puffer 1,8 M, pH 8,8	3,6 ml	3,6 ml	/
Tris-HCl Puffer 0,6 M, pH 6,8	/	/	0,5 ml
10 % SDS	167 µl	167 µl	50 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl

### Western-Blot

Sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse bestimmter Proteine eines Proteingemisches stellt der Western-Blot dar. Im Anschluss an die oben beschriebene Methode der SDS-PAGE, mit deren Hilfe die Proteine des Gemisches aufgetrennt werden, erfolgt der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid). Die nun auf der Membran befindlichen Proteine werden mit gegen sie gerichteten spezifischen primären Antikörpern nachgewiesen. Dafür werden mit Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Die Proteine werden letztendlich photochemisch detektiert.

#### *Durchführung:*

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran wurde mit Hilfe des Semidry-Verfahrens durchgeführt (102). Spezielle Filterpapiere (Whatman Chromatography Paper, Whatman, Maidstone, UK) und eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore GmbH, Darmstadt, D) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und mit den entsprechenden Lösungen getränkt. Daran schließt sich das luftblasenfreie Schichten der Papiere bzw. der Membran zwischen zwei Graphit-Platten in der Blotting Apparatur (semi DRY, SD 20 Semi Dry Maxi, 20 x 20 cm System) an (102). Die untere Platte der Blotting-Apparatur ist die Anode und die Deckplatte die Kathode, diese wurde beschwert. Die folgende Aufzählung gibt die Reihenfolge (von unten nach oben) der Filterpapiere usw. wieder (Zusammensetzung der Puffer siehe Tab. 1):

- 3 Filterpapiere in Blotting Puffer A 1 getränkt
- 2 Filterpapiere in Blotting Puffer A 2 getränkt
- PVDF-Membran in Methanol getränkt
- Gel
- 5 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt

Die Proteine wurden durch Anlegen einer Stromstärke von 60 mA ( $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ) pro Gel für die Dauer von ca. 60 min auf die Membran übertragen.

### Antikörper-Färbung und Detektion

Im Anschluss an das Blotten diente 5 % Magermilchpulver (Saliter, Obergünzburg, D) (in TBST-Puffer) oder 1 % BSA (in TBST-Puffer) zur ca. einstündigen Blockade von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran. Daraufhin wurde die Blockier-Lösung abgegossen und die Membran 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Die zur parallelen Detektion verschiedener Proteine in Streifen geschnittene Membran wurde über Nacht bei 4 °C am Schüttler mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert. Die Verdünnung (siehe Tab. 2) der hierbei verwendeten primären Antikörper erfolgte in einer Lösung aus 3 % BSA + 0,05 %  $\text{NaN}_3$  in TBST. Zur Entfernung ungebundener primärer Antikörper wurde am darauffolgenden Tag dreimal je 5 Minuten mit 1 % Magermilchpulver oder 0,2 % BSA in TBST gewaschen. In derselben Lösung erfolgte die Verdünnung der sekundären Antikörper (Verdünnung siehe Tab. 2) in der die Membran für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler verblieb.

Nun erfolgten drei Waschschrte in TBST-Puffer für je 5 min, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Dieser Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP = horse radish peroxidase) gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Luminols, mit dem die Membran für ca. drei Minuten inkubiert wird. Die bei dieser Chemilumineszenz-Reaktion entstehenden Photonen können mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Das für die Inkubation verwendete Luminolreagenz besteht aus Detection Reagent 1 (Peroxidlösung) und Detection Reagent 2 (Luminol Enhancer Solution) und stammt von BioRad (München, D). Von den beiden Lösungen werden ca. je 800  $\mu\text{l}$  verwendet. Nach Abtropfen des Luminolreagenzes wurde die Membran zwischen zwei Kopierfolien in eine lichtundurchlässige Kassette (Hypercassette<sup>TM</sup> von GE Healthcare Bio-Sciences Pittsburgh, USA) gelegt. Anschließend wird in der Dunkelkammer bei Rotlicht ein Chemolumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL High Performance Chemiluminescence film von GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) auf die Membran aufgelegt. Die jeweilige

Belichtungszeit beträgt je nach der Sensitivität des verwendeten Antikörpers, vorhandener Proteinmenge und gewünschter Bandendicke zwischen 4 Sekunden und 30 Minuten. Im Anschluss daran wurde der Film mit einer Entwicklermaschine (CAWOMAT 2000 IR Typ 9462/306; Cavo, Schrobenhausen, D) entwickelt. Es wurden auch einige Membranen nach Inkubation mit dem Luminolreagenz mit Hilfe des ChemiDoc™ Imaging Systems (BioRad, München, D) entwickelt. Die so erhaltenen Filme wurden mit Hilfe des Programms Image Lab (BioRad, München, D) densitometrisch ausgewertet.

## **2.19 Plasmamembranpräparation mittels differentieller Zentrifugation**

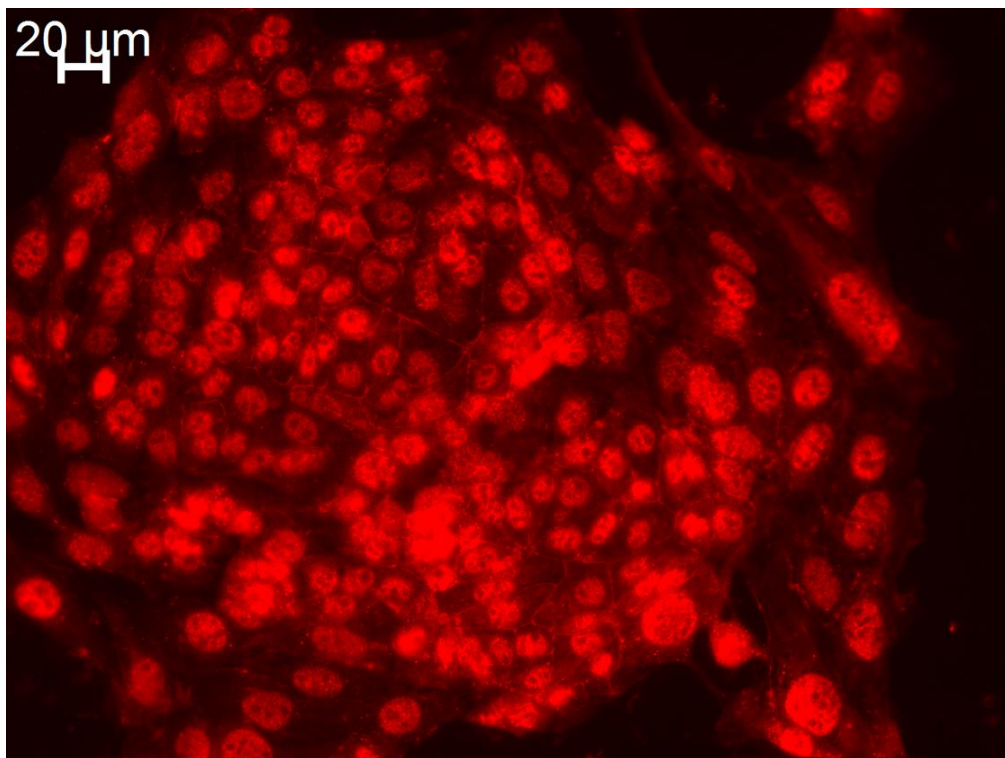
Im Folgenden sollte die Expression von phosphoryliertem NKCC2 (pNKCC2) in der Plasmamembran untersucht werden. Dies erfolgte durch Anreicherung der Plasmamembran mit Hilfe von differentieller Zentrifugation. Dabei wurde gleichzeitig die Membran von sonstigen Zellorganellen, insbesondere von endozytotischen Vesikeln, getrennt. Zwei Stunden nach i. p. Injektion von 200 mg/kg KG Furosemid wurden die Mäuse getötet, die Nieren entnommen und die Kapsel entfernt. Als Kontrolle wurden Nieren von unbehandelten Tieren verwendet. Das Gewebe wurde in 2-3 ml Dissektions-Puffer (Zusammensetzung siehe Tab. 1) unter Verwendung des Ultraturax (Janke&Kunkel KG, IKA Werke, Staufen, D) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat dreimal mit zunehmenden g-Zahlen jeweils bei 4 °C zentrifugiert [4.000 g, 15 min; 17.000 g, 30 min (Plasmamembran-Fraktion); 150.000 g, 70 min (Vesikel-Fraktion)]. Das beim zweiten Zentrifugationsschritt erhaltene Pellet (Plasmamembran-Fraktion) wurde in 40 µl und das Pellet des dritten Zentrifugationsschritts (Vesikel-Fraktion) wurde in 20 µl Dissektions-Puffer aufgenommen. Daraufhin wurde die Proteinkonzentration am Qubit bestimmt. Unter Einsatz von 40 µg Proteinlysate wurde eine SDS-PAGE unter Verwendung von 12,5 %igen Gelen und anschließendem Western-Blot durchgeführt (siehe 2.18).

### 3 Ergebnisse

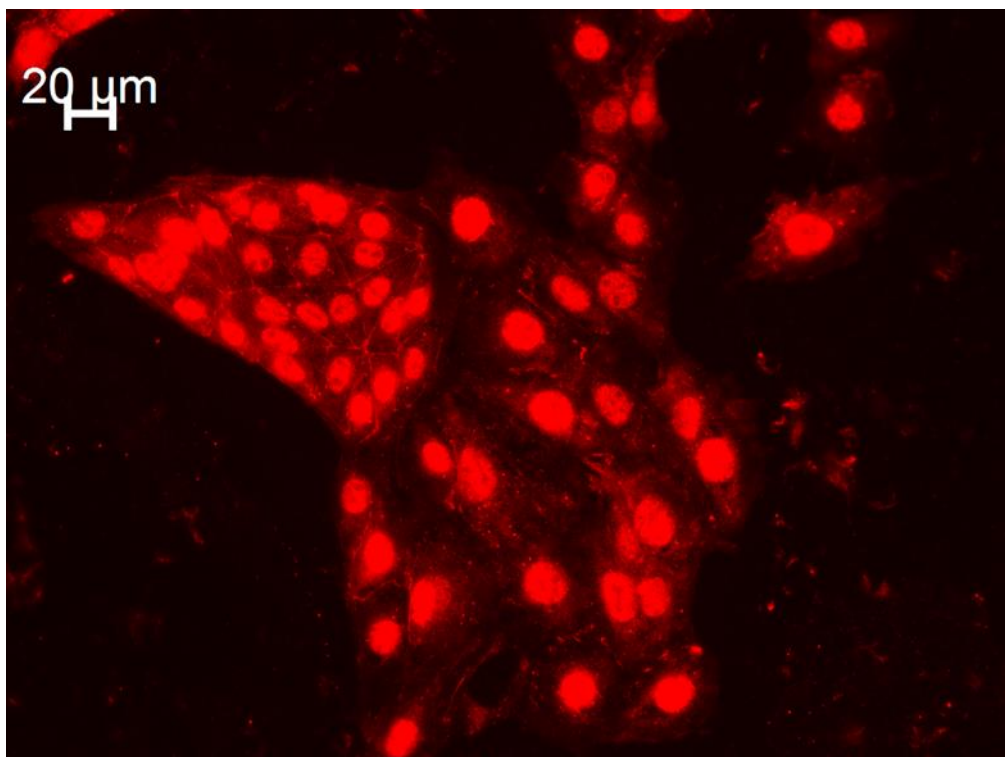
#### 3.1 Analyse von NKCC2 in MKTAL-Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob NKCC2 durch cGMP beeinflussbar ist. Dazu wurde mit MKTAL-Zellen (Mouse kidney thick ascending limb) gearbeitet. In diesen Zellen wurde u. a. die mRNA Expression von NKCC2 nachgewiesen (18). Haque et al. zeigten, dass Isoproterenol die Oberflächen Expression von NKCC2 in TAL erhöht. Sie verwendeten TAL Suspensionen von Spargue Dawley Ratten (68). Im Western-Blot konnte die Expression von pNKCC2 in MKTAL-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung der MKTAL-Zellen wurde untersucht, ob der second messenger cGMP und der  $\beta$ -Adrenozeptoragonist Isoproterenol einen Einfluss auf die Membranexpression von phosphoryliertem NKCC2 haben. Die Zellen wurden nach vorheriger Stimulation immunocytochemisch angefärbt. Abb. 7 A zeigt unstimulierte Zellen. Des Weiteren wurden die Zellen eine Stunde mit 1 mM 8-Br-cGMP (Abb. 7 B) oder 30 min mit 5  $\mu$ M Isoproterenol (Abb. 7 C) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen eine Stunde mit 1 mM 8-Br-cGMP dann 30min mit 5  $\mu$ M Isoproterenol und als letztes erneut eine Stunde mit 1 mM 8-Br-cGMP stimuliert (Abb. 7 D). Mittels Western Blot war cGKI $\alpha$  nicht in den MKTAL-Zellen nachweisbar. Wie Abb. 8 zeigt, führten die unterschiedlichen Bedingungen, denen die Zellen ausgesetzt wurden, zu keiner signifikanten Veränderung der Membranexpression von pNKCC2. Aus diesen Gründen wurde auf das weitere Arbeiten mit diesen Zellen verzichtet. Die folgenden Versuche wurden unter Verwendung des Mausmodels durchgeführt. Auf diese Weise konnte unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden.

A



B

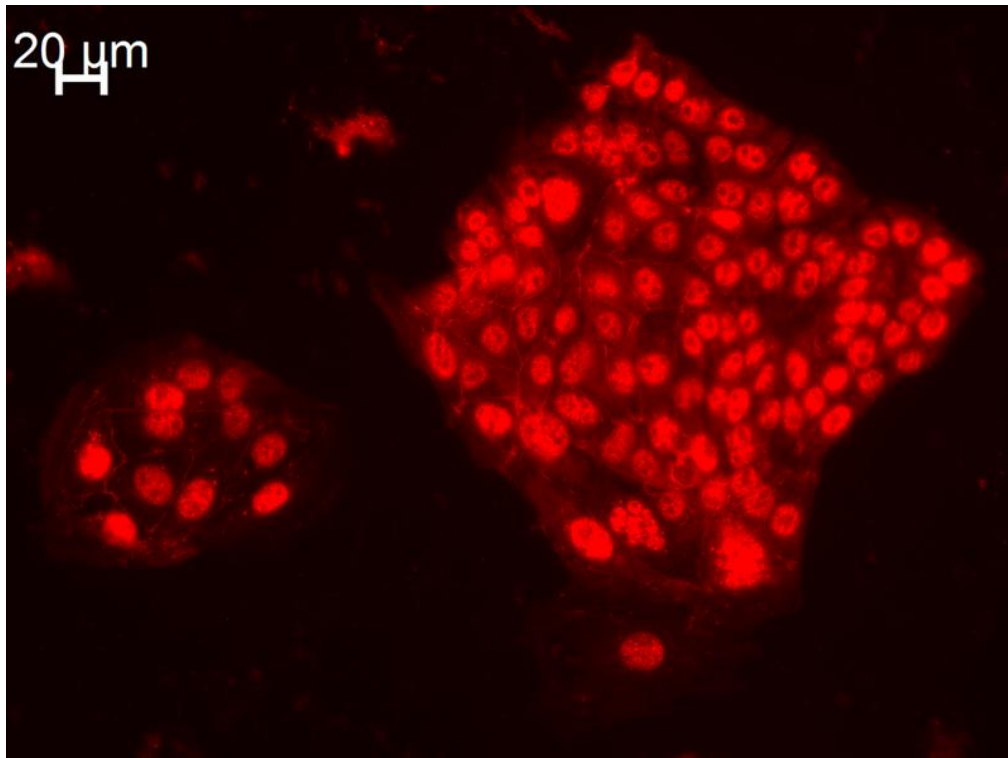


**Abb. 7: Immunocytochemische Aufnahmen von MKTAL-Zellen**

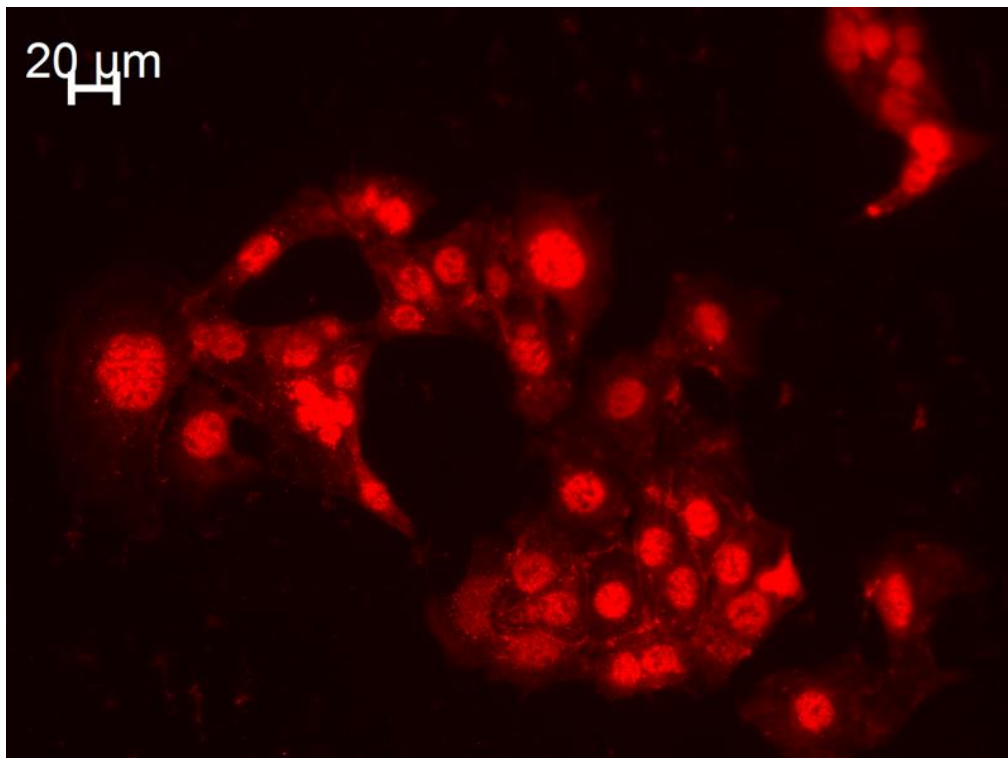
A: unstimulierte MKTAL-Zellen angefärbt mit R5 (pNKCC2), 40-fache Vergrößerung

B: eine Stunde 1 mM 8-Br-cGMP angefärbt mit R5 (pNKCC2), 40-fache Vergrößerung

C



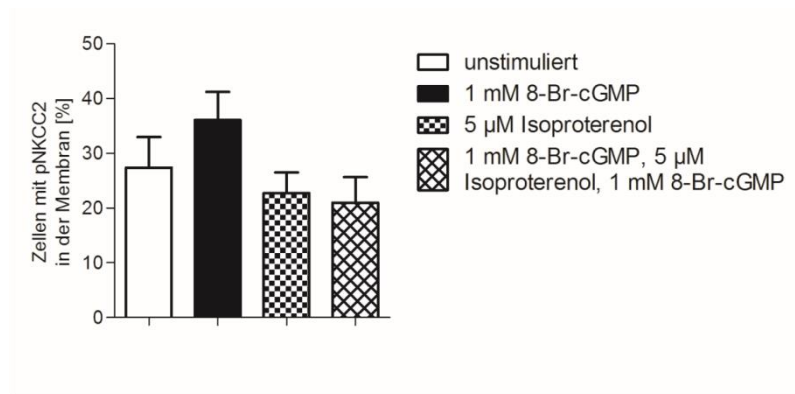
D



**Abb. 7: Immunocytochemische Aufnahmen von MKTAL-Zellen**

C: 30 min 5  $\mu$ M Isoproterenol angefärbt mit R5 (pNKCC2), 40-fache Vergrößerung

D: eine Stunde 1 mM 8-Br-cGMP anschließend 30 min 5  $\mu$ M Isoproterenol zuletzt eine Stunde 1 mM 8-Br-cGMP angefärbt mit R5 (pNKCC2), 40-fache Vergrößerung



**Abb. 8: Prozentualer Anteil an Zellen, die pNKCC2 in der Membran aufweisen**

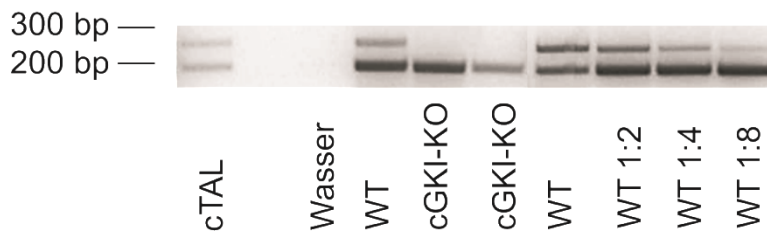
### 3.2 Untersuchung der Auswirkungen der Gabe von Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid ist ein potenter Inhibitor von NKCC2. Über die Mechanismen, die den Cotransporter regulieren, ist noch nicht viel bekannt. Die NKCC2 Aktivität wird von cAMP und cGMP reguliert (4). Flatman und Creanor zeigten geringe Effekte von PKA, PKC, PKG und Casein kinase II auf NKCC in Erythrocyten von Frettchen (45). Daher wurde Furosemid eingesetzt, um einen möglichen Zusammenhang von cGMP/cGKI und NKCC2 zu untersuchen.

#### 3.2.1 Nachweis der mRNA Expression von cGKI im TAL

Es war zunächst wichtig abzuklären, ob cGKI im TAL zu finden ist. Dafür wurde reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion angewendet. Wie Abb. 9 zeigt ist cGKI-mRNA sowohl im corticalen TAL (cTAL) als auch im medullären TAL (mTAL) detektierbar. Die untere Bande in Abb. 9 A ist der interne Standard Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und die obere Bande ist cGKI common. Im cTAL fanden wir nur eine geringe Expression von cGKI common mRNA, allerdings war der mRNA Gehalt des internen Standards HPRT ebenfalls niedrig. cGKI-knockout-Mäuse wurden verwendet, um die Spezifität des cGKI common Primers zu testen.

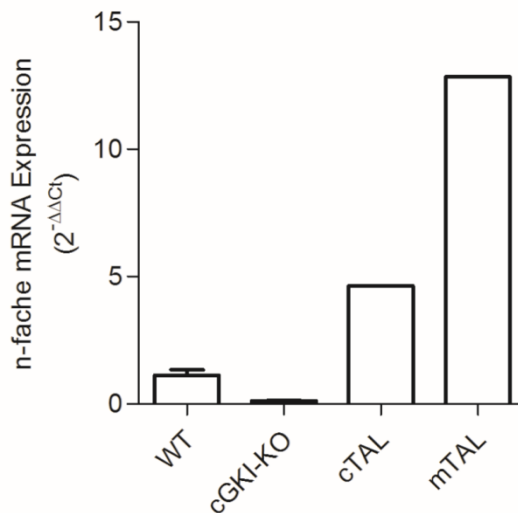
A



**Abb. 9: Expression von cGKI mRNA im TAL**

A: reverse Transkriptase PCR von isoliertem cTAL, Nieren von WT und cGKI-KO-Mäusen. Um die Konzentration von cTAL zu vergleichen wurde die cDNA der Niere einer WT Maus verdünnt, beginnend mit 910 ng cDNA. B: Analyse mittels quantitativer PCR am light cycler. mRNA Expression von cGKI im cTAL und mTAL sowie in WT- (N=6) und cGKI-KO- (N=6) Nieren.

B



### 3.2.2 Rolle von cGKI bei der Regulation des renalen NKCC2

Der NKCC2 ist für die Reabsorption von ca. 20 % des glomerulär filtrierten NaCl verantwortlich und trägt damit zu einem großen Teil zur Harnkonzentrierung bei. Die Aktivität von NKCC2 hängt von seiner Phosphorylierung ab. Die Ergebnisse früherer Arbeiten lassen einen möglichen Zusammenhang der Regulation von NKCC2 und cGMP/PKG-Signalweg vermuten. Bekanntermaßen stimuliert NO sGC und erhöht dadurch cGMP. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Phosphodiesterase (PDE II), wodurch der Abbau von cAMP gesteigert wird. Dies führt wiederum zu einer Abnahme der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Aktivität (130). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass NOS 1, cGMP und PKG an einem Mechanismus beteiligt sind, über den der  $\text{ET}_\text{B}$ -Rezeptor (Endothelin Rezeptor Typ B) die urinaire Natrium- und Wasserausscheidung vermittelt (121). Daher sollte im Folgenden evaluiert werden, ob cGKI an der Regulation der Funktion des renalen NKCC2 beteiligt ist. Hierfür wurde die Harnkonzentrierungs-Kapazität der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid, das ein potenter Inhibitor von NKCC2 ist, untersucht.

### 3.2.2.1 Ermittlung von Urinparametern

Den Mäusen wurde 200 mg/kg KG Furosemid i. p. verabreicht und der Urin, der innerhalb der darauffolgenden zwei Stunden ausgeschieden wurde, wurde gesammelt. Als Kontrolle diente der Urin, den die Mäuse innerhalb von 24 Stunden unter ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter abgaben. Folgende Parameter wurden in dem gesammelten Urin bestimmt: Urinvolumen, Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration und Osmolalität.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich wird, führte die Verabreichung von Furosemid entsprechend seiner diuretischen Wirkung sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg des ausgeschiedenen Urinvolumens und der Natrium-, Kalium- und Chloridionen. Die cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse ( $64,26 \pm 3,10$  [ $\mu$ l/g(KG)/2h]) schieden nach Furosemid-Gabe ein signifikant höheres Urinvolumen aus als die Wildtyp-Mäuse ( $51,30 \pm 2,88$  [ $\mu$ l/g(KG)/2h]) (Abb. 10 A). Auch bezüglich der Na<sup>+</sup>-Exkretion ergaben sich bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen ( $8,73 \pm 0,38$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) signifikant höhere Werte als bei den Wildtyp-Mäusen ( $6,60 \pm 0,36$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) (Abb. 10 B). In Bezug auf die K<sup>+</sup>-Exkretion wies der Urin der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse ( $2,49 \pm 0,29$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit dem Urin der Wildtyp-Mäuse ( $3,03 \pm 0,29$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) auf (Abb. 10 C). Die im Urin von cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen ( $11,52 \pm 0,47$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) gemessene Menge an Chloridionen war signifikant höher als die von Wildtyp-Mäusen ( $9,60 \pm 0,48$  [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]) (Abb. 10 D).

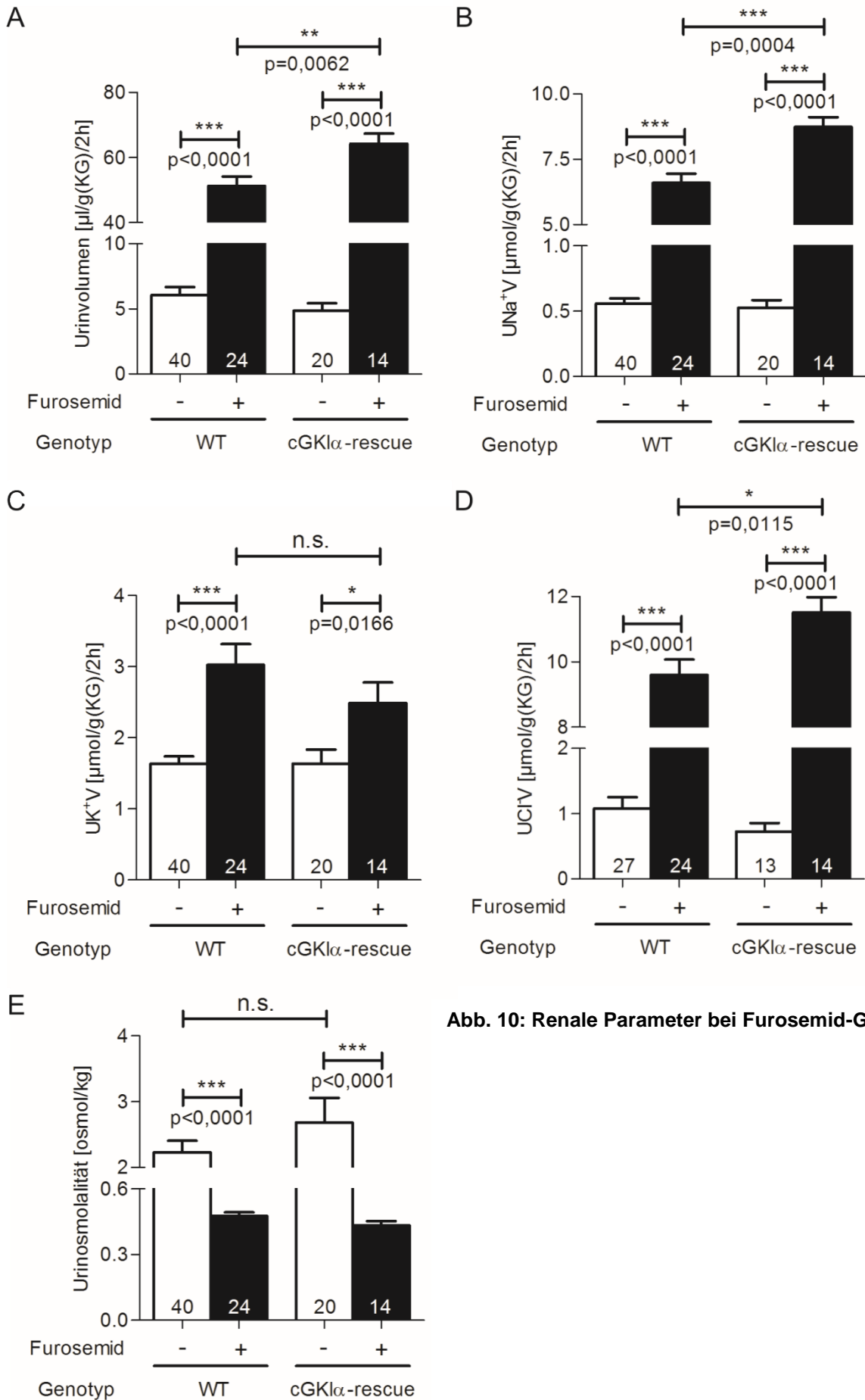


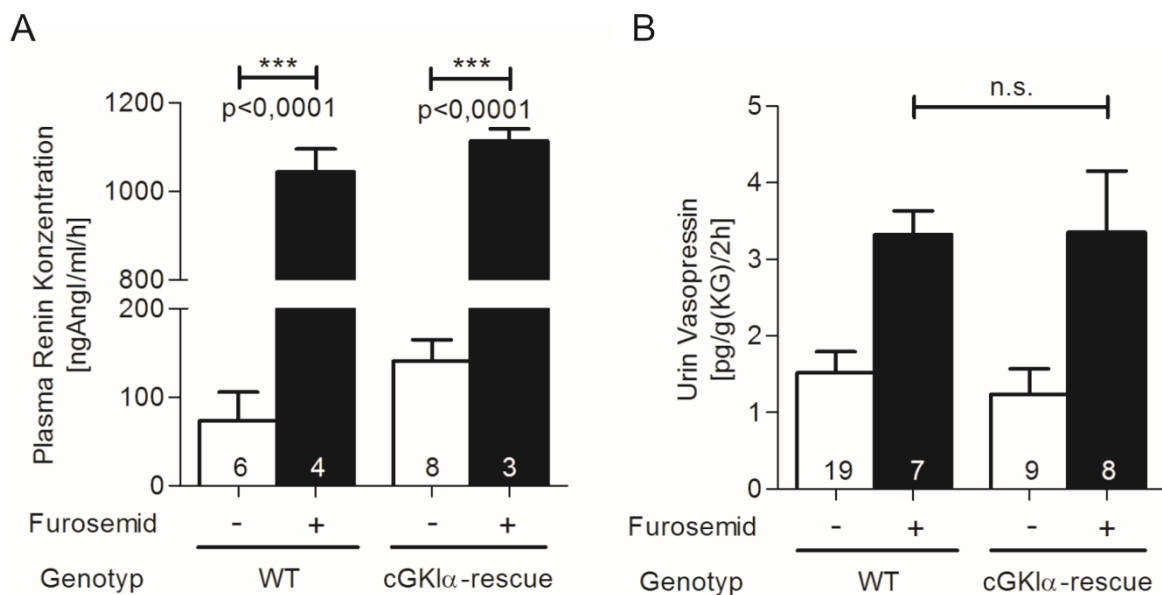
Abb. 10: Renale Parameter bei Furosemid-Gabe

Analyse des Urins, der innerhalb von zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) (schwarz) bzw. als Kontrolle innerhalb von 24 Stunden freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) gesammelt wurde. A: Urinvolumen mit N=24-40 für WT und N=14-20 für cGKI $\alpha$ -rescue, B: Natrium-Exkretion mit N=24-40 für WT und N=14-20 für cGKI $\alpha$ -rescue, C: Kalium-Exkretion mit N=24-40 für WT und N=14-20 für cGKI $\alpha$ -rescue, D: Chlorid-Exkretion mit N=24-27 für WT und N=13-14 für cGKI $\alpha$ -rescue, E: Urinosmolalität mit N=24-40 für WT und N=14-20 für cGKI $\alpha$ -rescue, wie in Säulen angegeben. UNa<sup>+</sup>V: urinäre Na<sup>+</sup>-Exkretion, UK<sup>+</sup>V: urinäre K<sup>+</sup>-Exkretion, UCl<sup>-</sup>V: urinäre Cl<sup>-</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich sinkt die Urinosmolalität sowohl bei Wildtyp- als auch bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen durch Furosemid-Gabe im Vergleich mit basalen Werten signifikant ab. Dies lässt sich durch den gesteigerten Flüssigkeitsverlust erklären.

### 3.2.2.2 Bestimmung der Konzentrationen von Renin im Plasma und von Vasopressin im Urin

Abb. 11 stellt die Plasma Renin Konzentration und den Gehalt an Vasopressin im Urin dar.



**Abb. 11: Plasma Renin Konzentration und Vasopressin Konzentration im Urin**

A: Analyse der Plasma Renin Konzentration (mit N=4-6 für WT und N=3-8 für cGKI $\alpha$ -rescue); B: Analyse von Vasopressin im Urin (mit N= 7-19 für WT und N=8-9 für cGKI $\alpha$ -rescue, wie in Säulen angegeben). Jeweils nach Gabe von Furosemid (schwarz) und unter Kontrollbedingungen (weiß).

Hypovolämie führt u. a. zur Ausschüttung von Renin aus den Epitheloidzellen der vas afferentia der Nieren. Da Furosemid zu einem erheblichen Flüssigkeitsverlust führt, wurde seine Auswirkung auf die Plasma Renin Konzentration untersucht. Die Renin Konzentration

im Plasma von Wildtyp-Mäusen war zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) ( $1044 \pm 51,50$  ngAngl/ml/h) signifikant höher als im Plasma von unbehandelten Mäusen ( $73,84 \pm 31,75$  ngAngl/ml/h). Auch die Plasma Renin Konzentration von cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen zeigte nach Furosemid-Gabe ( $1114 \pm 26,92$  ngAngl/ml/h) eine signifikante Zunahme im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ( $140,80 \pm 24,07$  ngAngl/ml/h) (vgl. Abb. 11 A).

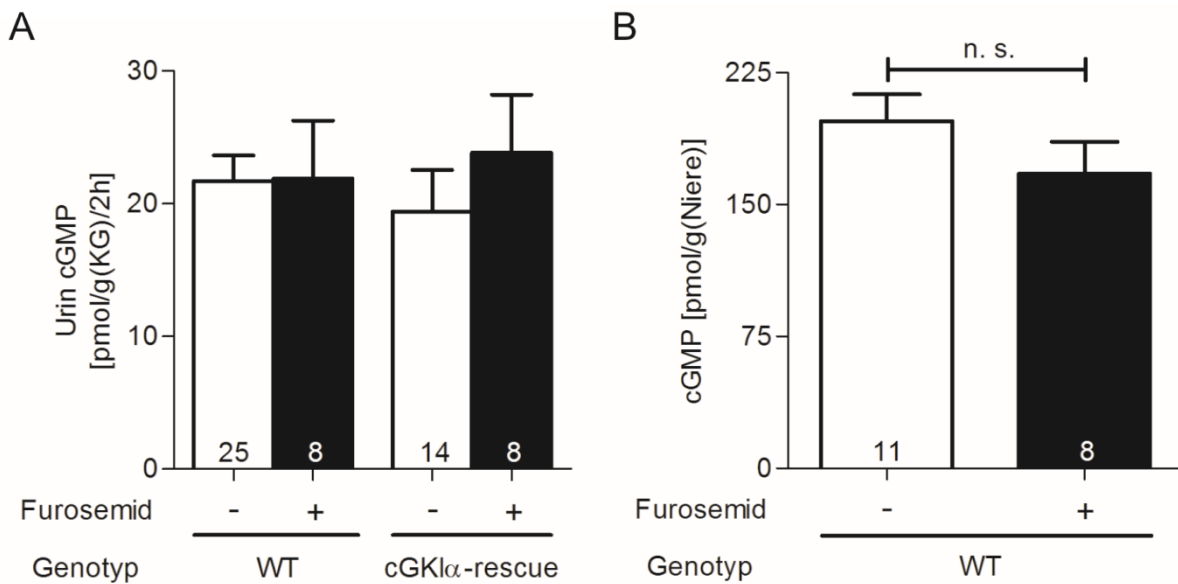
Der Hypothalamus reguliert durch Kontrolle der Flüssigkeitsaufnahme und Wasserausscheidung den Wasserhaushalt des Organismus. Osmorezeptoren im Hypothalamus registrieren Veränderungen der osmotischen Konzentration und lösen je nach Bedarf eine Hemmung oder Erhöhung der Vasopressinausschüttung aus. Da durch die Verabreichung von Furosemid in diesen Regelkreislauf eingegriffen wird, wurde die Vasopressin Konzentration des Urins bestimmt. Wie Abb. 11 B zeigt stieg die Vasopressin Konzentration sowohl im Urin der Wildtyp- ( $3,32 \pm 0,31$  [pg/g(KG)/2h]) als auch der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse ( $3,35 \pm 0,80$  [pg/g(KG)/2h]) nach Furosemid-Gabe im Vergleich zu den unbehandelten Tieren an (WT: ( $1,52 \pm 0,27$  [pg/g(KG)/2h]); cGKI $\alpha$ -rescue: ( $1,24 \pm 0,33$  [pg/g(KG)/2h])). Hierfür wurde der innerhalb von zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) gesammelte Urin analysiert. Als Kontrolle diente der Urin, der während 24 Stunden - ad libitum Zugang zu Wasser und Futter - abgegeben wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Furosemid-Gabe weder bezüglich der Plasma Renin Konzentration noch der Vasopressin-Konzentration im Urin zu einem Unterschied zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen führte.

### 3.2.2.3 Ermittlung des cGMP-Gehalts im Urin und im Nierengewebe

Da cGKI durch cGMP aktiviert wird, wurde analysiert, ob sich im Urin oder im Nierengewebe durch die Verabreichung von Furosemid der cGMP-Gehalt ändert. Die Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse zeigten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des cGMP-Gehalts im Urin weder unter Kontrollbedingungen (WT: ( $21,71 \pm 1,93$  [pmol/g(KG)/2h]); cGKI $\alpha$ -rescue: ( $19,41 \pm 3,13$  [pmol/g(KG)/2h])) noch nach Furosemid-Applikation (WT: ( $21,88 \pm 4,37$  [pmol/g(KG)/2h]); cGKI $\alpha$ -rescue: ( $23,84 \pm 4,38$  [pmol/g(KG)/2h])) (Abb. 12 A).

Die im Nierengewebe bestimmte Menge an cGMP wurde durch Gabe von Furosemid in Wildtyp-Mäusen ( $167,36 \pm 18,12$  [pmol/g(Niere)]) im Vergleich mit unbehandelten Mäusen ( $197 \pm 15,10$  [pmol/g(Niere)]) nicht verändert (Abb. 12 B).



**Abb. 12: Analyse des cGMP-Gehalts im Urin und im Nierengewebe**

A: Bestimmung des Gehalts von cGMP im Urin, der innerhalb von zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) (schwarz) bzw. als Kontrolle innerhalb von 24 Stunden ad libitum Zugangs zu Wasser und Standardfutter (weiß) gesammelt wurde. Mit N=8-25 für WT und N=8-14 für cGKI $\alpha$ -rescue, wie in Säulen angegeben. KG: Körpergewicht. B: cGMP-Gehalt im Nierengewebe von Wildtyp-Mäusen, die 24 Stunden freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) (N=11) hatten bzw. denen die Nieren zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg KG) (schwarz) entnommen wurden (N=8).

### 3.2.2.4 Analyse des Serums

Abb. 13 und Tab. 7 geben die Ergebnisse der Untersuchung des Serums wieder. Den Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen wurde i. p. 200 mg/kg KG Furosemid verabreicht. Nach zwei Stunden wurde ihnen unter Isoflurannarkose retrobulbär Blut abgenommen. Als Kontrolle diente das Serum von Mäusen, die ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter hatten. In der Abbildung sind die Ergebnisse graphisch dargestellt und in der Tabelle werden die Werte zusammengestellt. Der Na<sup>+</sup>-Gehalt des Serums zeigte weder zwischen den Mäusen der beiden Genotypen noch zwischen den unbehandelten und behandelten Mäusen signifikante Unterschiede. Dasselbe galt für den K<sup>+</sup>-Gehalt des Serums.

Tab. 7: Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration im Serum

	Na <sup>+</sup> Serum [mmol/l]	K <sup>+</sup> Serum [mmol/l]
<b>Wildtyp</b> Kontrolle	127,7 (± 4,0) N=11	5,30 (± 0,70) N=12
<b>Wildtyp</b> Furosemid	127,7 (± 8,8) N=5	6,40 (± 0,54) N=4
<b>cGKIα-rescue</b> Kontrolle	137,9 (± 5,4) N=7	6,36 (± 0,33) N=5
<b>cGKIα-rescue</b> Furosemid	134,4 (± 7,8) N=4	6,42 (± 0,34) N=3

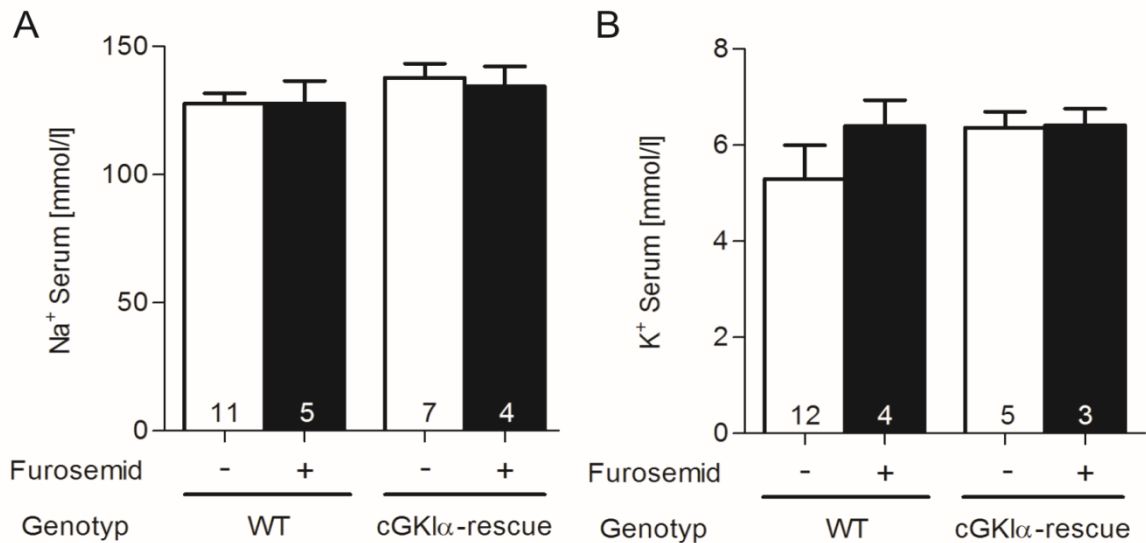


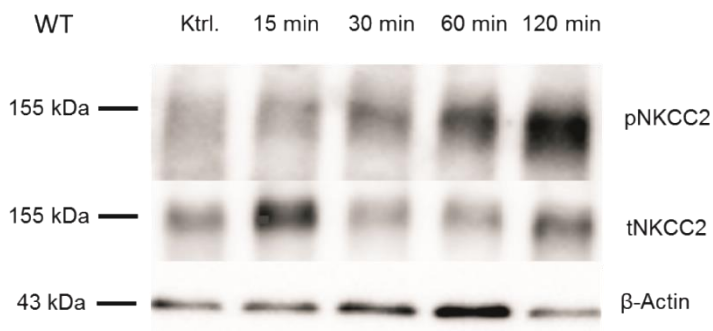
Abb. 13: Serumanalyse nach Furosemid-Gabe

Ermittlung der Na<sup>+</sup>-Konzentration und der K<sup>+</sup>-Konzentration im Serum von Wildtyp- und cGKIα-rescue-Mäusen zwei Stunden nach Behandlung mit Furosemid (schwarz) bzw. unter Kontrollbedingungen (weiß). A: Na<sup>+</sup>-Konzentration mit N=5-11 für WT und N=4-7 für cGKIα-rescue, B: K<sup>+</sup>-Konzentration mit N=4-12 für WT und N=3-5 für cGKIα-rescue, wie in Säulen angegeben.

### 3.2.2.5 Analyse der Phosphorylierungs-Kinetik von NKCC2

In Abb. 14 wird die Kinetik der Phosphorylierung von NKCC2 dargestellt.

A

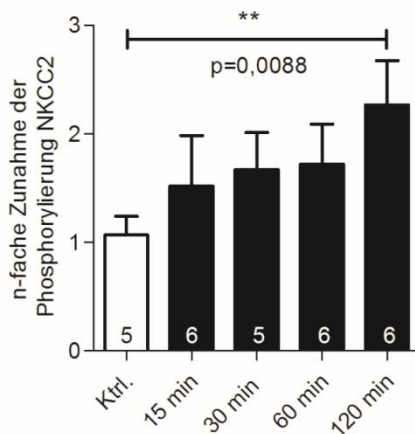


**Abb. 14: Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2 innerhalb von 120 min nach Furosemid Injektion**

A: Western-Blot von Gesamtnierenlysaten.

Verwendete Antikörper: R5 (pNKCC2), tNKCC2 und  $\beta$ -Actin (Ladungskontrolle).

B



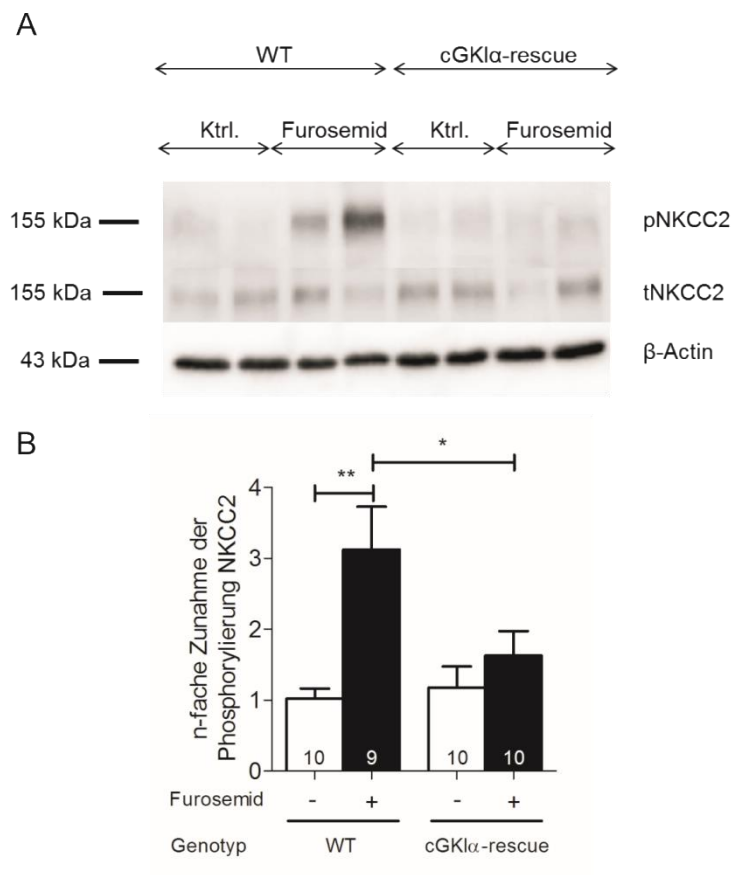
B: Densitometrische Analyse der Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2.

Die Untersuchung der Phosphorylierung von NKCC2 zu bestimmten Zeitpunkten nach der Furosemid Injektion ergab, dass die Phosphorylierung anstieg und nach 120 min den ca. 2,5-fachen Wert der Ausgangswerte erreichte (vgl. Abb. 14). Daher wurde im Folgenden die Zeitspanne von zwei Stunden zwischen der Furosemid Injektion und der Entnahme der Nieren gewählt.

### 3.2.2.6 Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 mittels Western-Blot

Da Furosemid zu signifikanten Veränderungen zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen in der Menge des ausgeschiedenen Urins, der Natrium- und Chloridionen geführt hatte, wurden im Folgenden die Phosphorylierung von NKCC2 mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Abb. 15 A veranschaulicht, dass durch Furosemid-Gabe in Wildtyp-Mäusen die Phosphorylierung von NKCC2 im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen zunahm. Eine eindeutigere Aussage ließ sich durch die in Abb. 15 B dargestellte densitometrische Auswertung treffen. Die Zunahme der Phosphorylierung wurde wie unter 2.7 beschrieben ermittelt. Die Phosphorylierung nimmt bei Wildtyp-Mäusen aufgrund der Gabe von Furosemid signifikant zu. Zwischen behandelten Wildtyp- und behandelten cGKI $\alpha$ -rescue-

Mäusen besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2.



### Abb. 15: Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 bei Furosemid-Gabe

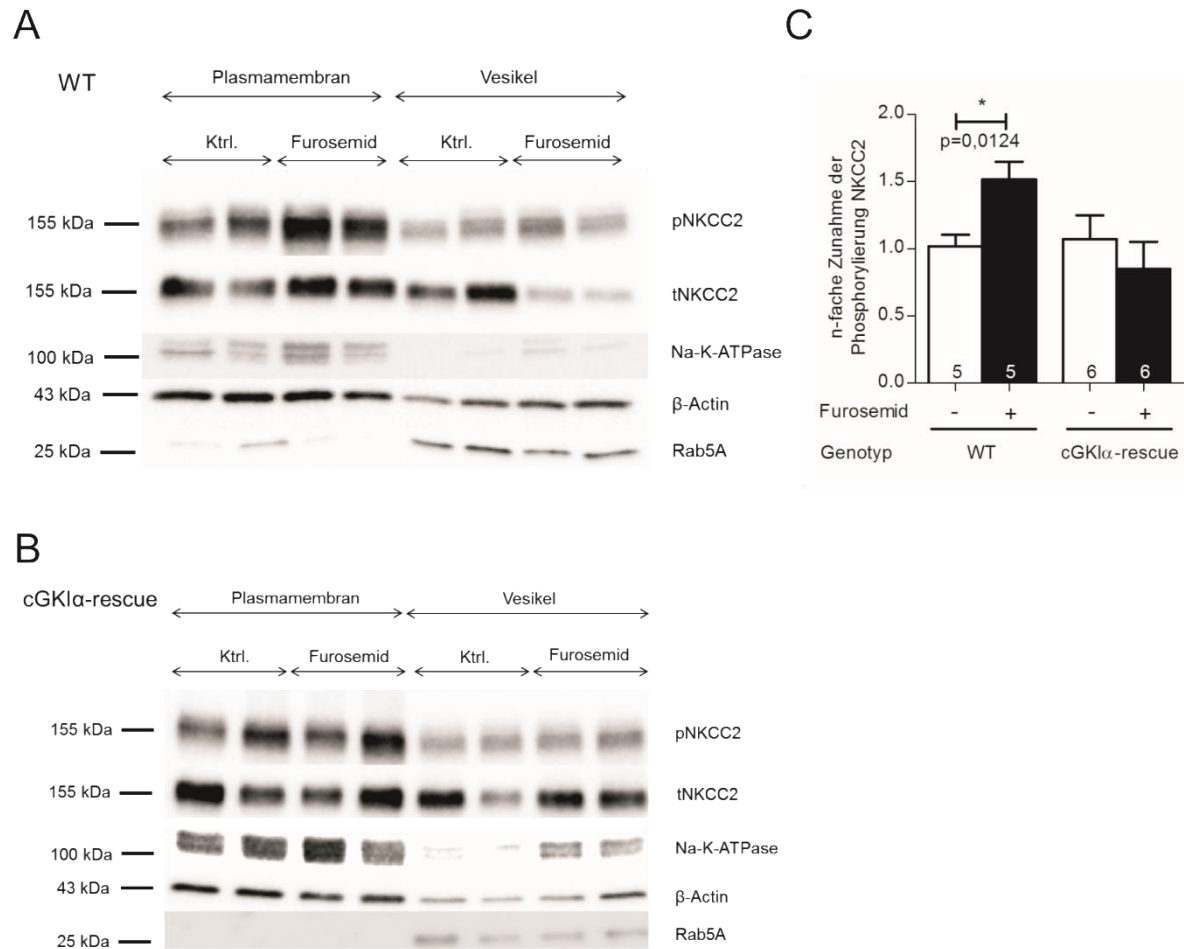
A: 11,5 %ige SDS-Gel-Analyse/Western-Blot mit je 70  $\mu$ g Gesamtprotein (je zwei unbehandelte Nieren und zwei Nieren, die zwei Stunden nach Furosemid Injektion entnommen wurden; lane 1-4 WT-Mäuse und lane 5-8 cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse). Verwendete Antikörper: R5 (pNKCC2), tNKCC2 und  $\beta$ -Actin (Ladungskontrolle).

B: Densitometrische Analyse der n-fachen Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2. Mit N=9-10 für WT-Mäuse und N=10 für cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse, wie in Säulen angegeben. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

#### 3.2.2.7 Analyse der Membranverteilung von pNKCC2

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde das Gesamtnierenlysat verwendet. Dabei wurden Unterschiede in der Expression von phosphoryliertem NKCC2 in Folge der Verabreichung von Furosemid zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen beobachtet. Im Folgenden wurde mittels Membranpräparation die Membranverteilung von phosphoryliertem NKCC2 untersucht. Als Marker für die Plasmamembranfraktion diente Na-K-ATPase und für die Vesikelfraktion Rab5A. Abb. 16 A zeigt, dass Furosemid-Gabe bei Wildtyp-Mäusen die Expression von pNKCC2 in der Plasmamembran im Vergleich zur Kontrolle erhöhte. Dies verdeutlicht die densitometrische Auswertung, die gemäß 2.7 durchgeführt wurde (Abb. 16 C). Die Phosphorylierung von NKCC2 nahm bei den Wildtyp-Mäusen durch Furosemid

Injektion signifikant zu ( $p=0,0124$ ). Diese Zunahme der Phosphorylierung bleibt bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen aus.



**Abb. 16: Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 durch Membranpräparation**

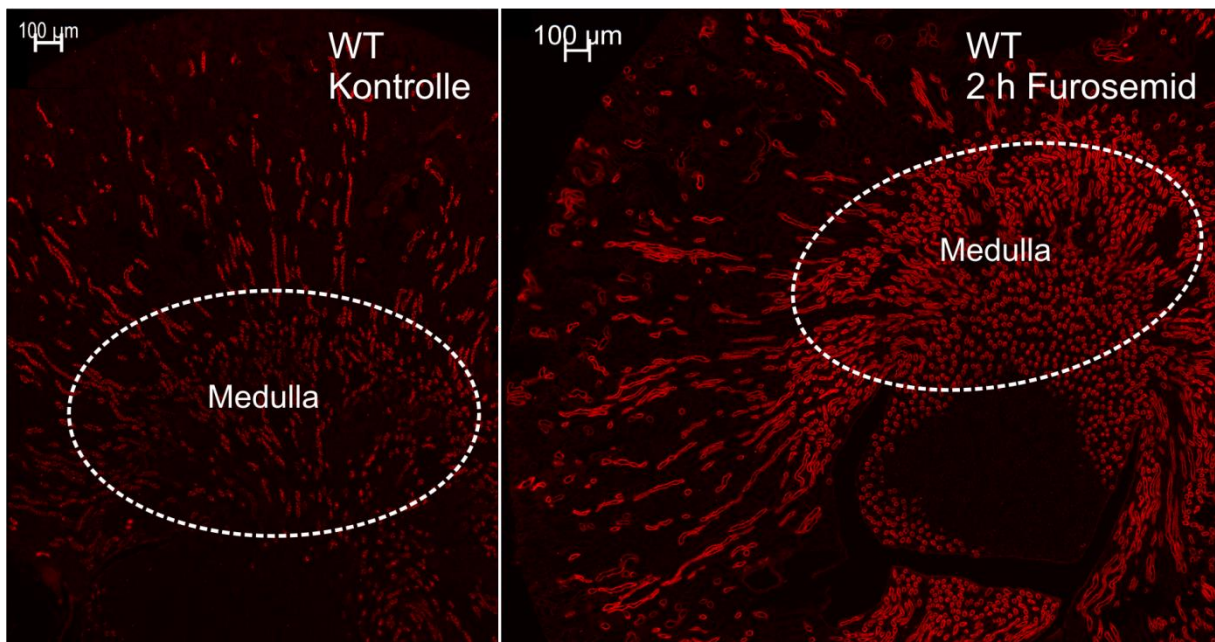
12,5 %ige SDS-Gel-Analyse/Western-Blot mit je 40  $\mu$ g Gesamtprotein (je zwei unbehandelte Nieren und zwei Nieren, die zwei Stunden nach Furosemid Injektion entnommen wurden; lane 1-4 Plasmamembranfraktion, lane 5-8 Vesikelfraktion). Verwendete Antikörper: R5 (pNKCC2), tNKCC2, Na-K-ATPase, Rab5A,  $\beta$ -Actin (Ladungskontrolle). A: Western-Blot von Wildtyp-Mäusen. B: Western-Blot von cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen. C: Densitometrische Analyse der n-fachen Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2. Mit N=5 für Wildtyp-Mäuse und N=6 für cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse, wie in Säulen angegeben.

### 3.2.2.8 Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 mittels Immunhistochemie

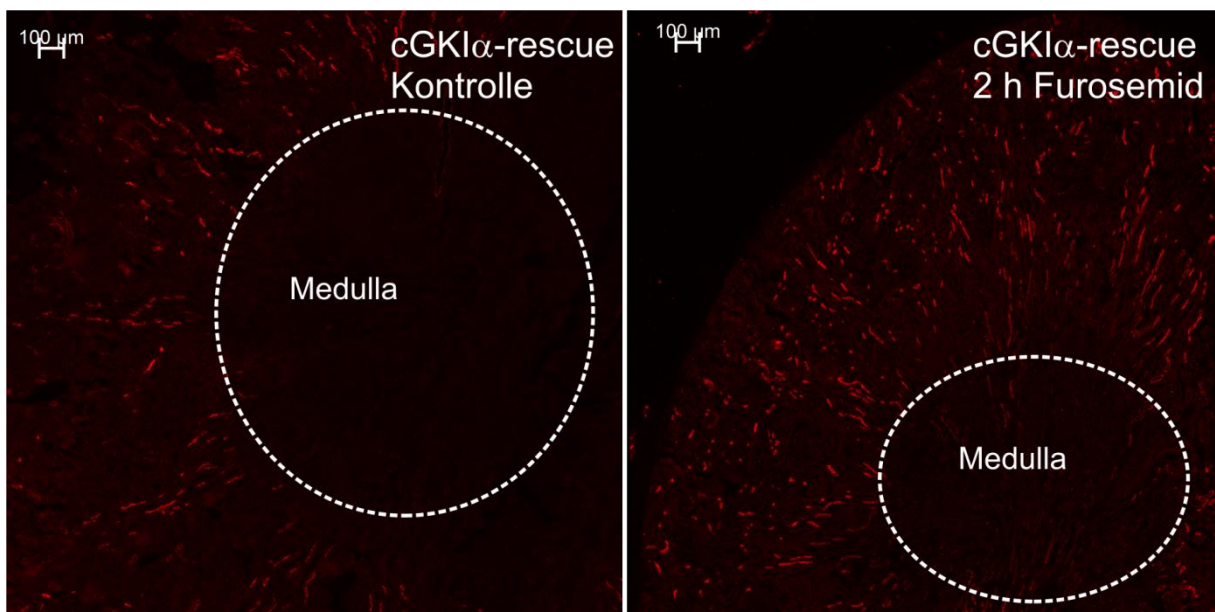
Mit Hilfe der Western-Blot Analyse ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen in der Phosphorylierung von NKCC2 in Folge von Furosemid-Verabreichung. Aus diesem Grund wurden im Folgenden immunhistochemische

Untersuchungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse hinsichtlich der Phosphorylierung von NKCC2 in der Medulla unterschieden. Signale für pNKCC2 in Medulla und Cortex wurde bei 89 % (N=9) der mit Furosemid behandelten und 83 % der unbehandelten Wildtyp-Mäuse (N=6) detektiert. Dagegen wiesen nur 33 % der mit Furosemid behandelten cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen (N=9) und 20 % der unbehandelten cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen (N=5) phosphoryliertes NKCC2 in der Medulla auf. Der Unterschied in der Phosphorylierung von NKCC2 zwischen den beiden Genotypen schien hauptsächlich in der Medulla lokalisiert zu sein. Diesen Sachverhalt veranschaulicht Abb. 17 A und B. Hier sind exemplarisch renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte dargestellt, die unter 20-facher Vergrößerung mikroskopiert wurden. In Abb. 17 C und D wird sichergestellt, dass die unter Verwendung des R5 Antikörpers detektierten Signale von phosphoryliertem NKCC2 und nicht von NKCC1 stammen. Als TAL Marker diente dabei THP (Tamm-Horsfall glycoprotein oder Uromodulin). In medullären Regionen colokalisierten THP, tNKCC2 und pNKCC2. Dies beweist, dass TAL Zellen detektiert wurden und nicht möglicherweise OMCD (outer medullary collecting duct) Zellen, die NKCC1 exprimieren. Bereits die Untersuchungen des Nierengewebes mittels Membranpräparation verdeutlichten, dass phosphoryliertes NKCC2 (pNKCC2) sich in der Plasmamembran anreichert. Dafür wurden immunhistochemische Schnitte mittels CLSM (confocal laser scanning microscopy) untersucht. Abb. 18 zeigt, dass durch Verabreichung von Furosemid (Abb. 18 B) bei Wildtyp-Mäusen das Signal von pNKCC2 im Vergleich mit unbehandelten Wildtyp-Mäusen (Abb. 18 A) verstärkt wird. Bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen wurde das Signal von pNKCC2 durch Furosemid-Gabe nicht erhöht (Abb. 18 C und D). Man sieht in allen CLSM-Aufnahmen die deutliche Lokalisation von pNKCC2 in der Membran.

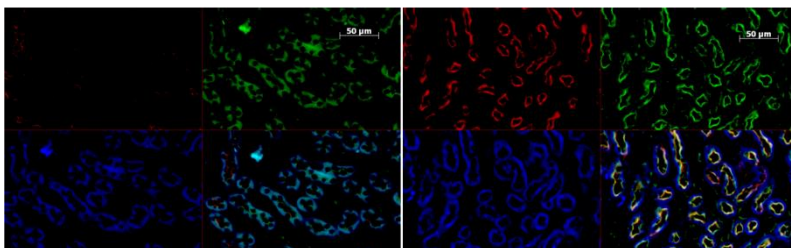
A



B



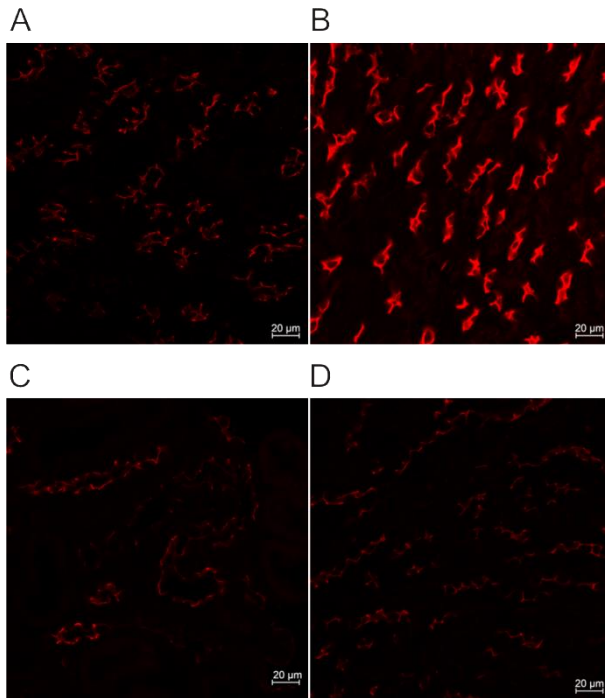
C



D

**Abb. 17: Immunhistochemische Analyse der renalen pNKCC2 Expression** A: Wildtyp (links: Ktrl., rechts: Furosemid Behandlung). B: cGKIα-rescue (links: Ktrl., rechts: Furosemid Behandlung). C:

Wildtyp (Kontrolle). D: Wildtyp (Furosemid Injektion); pNKCC2 (rot), tNKCC2 (grün), THP (blau); renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte; 20-fache Vergrößerung.

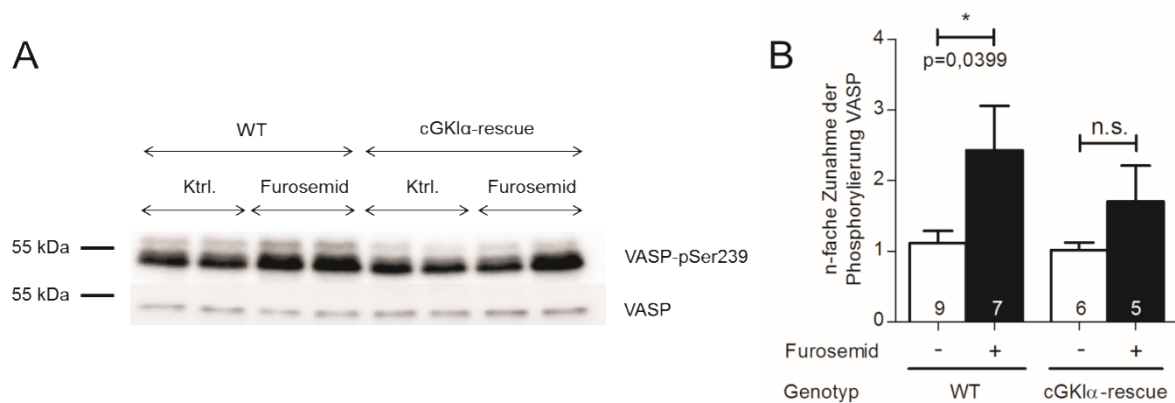


**Abb. 18: Immunhistochemische Analyse der Membranverteilung von pNKCC2**

A: Wildtyp (Kontrolle). B: Wildtyp (Furosemid-Gabe). C: cGKI $\alpha$ -rescue (Kontrolle). D: cGKI $\alpha$ -rescue (Furosemid-Gabe). pNKCC2 (rot); renale, PFA-fixierte Paraffinschnitte am CLSM mikroskopiert.

### 3.2.3 Untersuchung der Wirkung von Furosemid auf das cGMP-Kinase Substrat VASP

Da es sich bei VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) um ein Substrat der cGKI handelt, sollte im Folgenden ermittelt werden, ob die Gabe von Furosemid die cGKI Phosphorylierung an Ser239 verändert. Dazu wurden Gesamtnierenlysate mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. In Abb. 19 wird deutlich, dass die Phosphorylierung von VASP bei den Wildtyp-Mäusen durch Furosemid Injektion im Vergleich zur Kontrolle signifikant zunahm ( $p=0,0399$ ). Im Gegensatz dazu wurde die Phosphorylierung von VASP an Serin 239 bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen durch Furosemid nicht signifikant geändert.



**Abb. 19: Zunahme der Phosphorylierung von VASP**

A: 11,5 %ige SDS-Gel-Analyse/Western-Blot mit je 70  $\mu$ g Gesamtprotein (je zwei unbehandelte Nieren und zwei Nieren, die zwei Stunden nach Furosemid Injektion entnommen wurden; lane 1-4 WT, lane 5-8 cGKI $\alpha$ -rescue). Verwendete Antikörper: VASP-pSer239, VASP. B: Densitometrische Analyse der n-fachen Zunahme der Phosphorylierung von VASP. Mit N=7-9 für Wildtyp-Mäuse und N=5-6 für cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse, wie in Säulen angegeben.

### 3.2.4 Einfluss von NO/cGMP/cGK-beeinflussenden Pharmaka auf Urinparameter

Im Folgenden wurde untersucht, ob Substanzen, die die NO/cGMP/cGK-Signalkaskade beeinflussen, Auswirkungen auf die Urin- und Elektrolytausscheidung haben. Dazu wurde der sGC-Stimulator YC1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'furyl)-1-benzyl Imidazol] verwendet.

#### 3.2.4.1 Analyse der Urinparameter nach YC1-Behandlung

Abb. 20 und Tab. 8 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung des Urins nach Gabe von YC1.

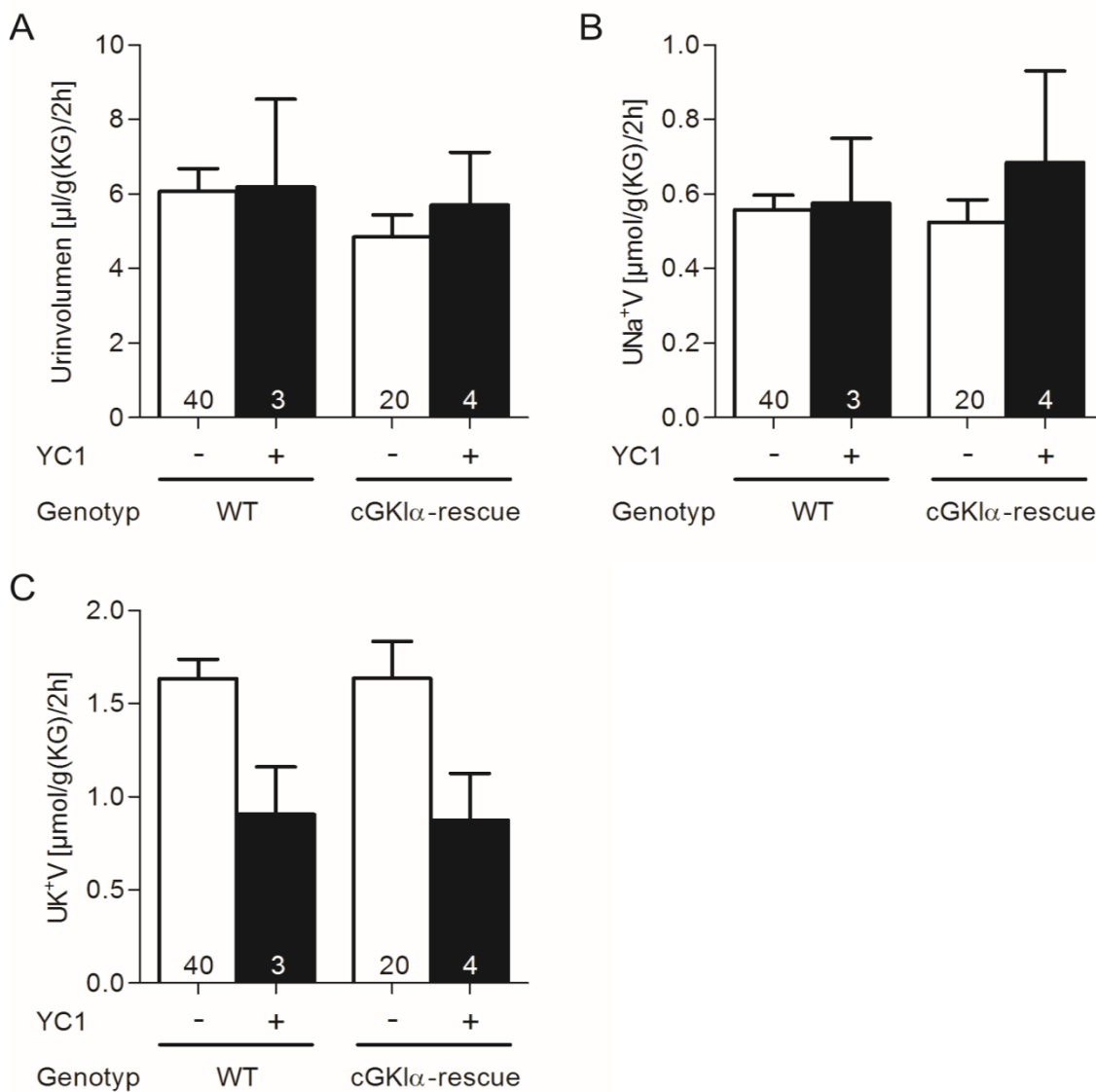


Abb. 20: Urinuntersuchung nach Gabe von YC1

Analyse des Urins, der innerhalb von 10 Stunden nach YC1 Injektion (25 mg/kg (KG)) (schwarz) bzw. als Kontrolle innerhalb von 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) gesammelt wurde. A: Urinvolumen. B: Natrium-Exkretion. C: Kalium-Exkretion. Mit N=40 für unbehandelte Wildtyp-Mäuse (weiß), mit N=3 für YC1 behandelte Wildtyp-Mäuse (schwarz), mit N=20 für unbehandelte cGKI $\alpha$ -rescue Mäuse (weiß) und mit N=4 für YC1 behandelte cGKI $\alpha$ -rescue Mäuse (schwarz), wie in Säulen angegeben. UNa<sup>+</sup>V: urinäres Na<sup>+</sup>-Exkretion, UK<sup>+</sup>V: urinäres K<sup>+</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht.

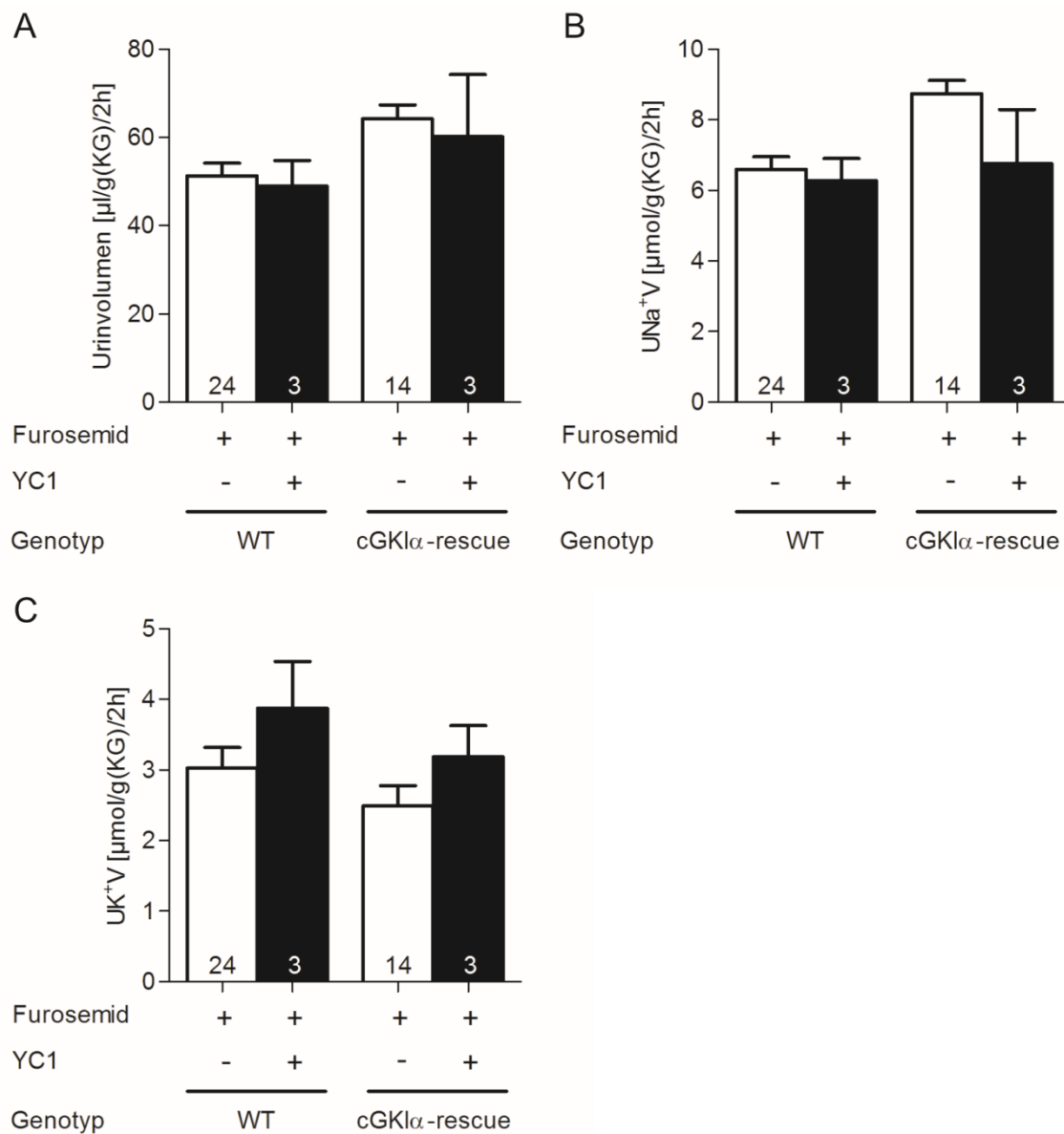
**Tab. 8: Urinvolumina, Natrium- und Kalium-Exkretion der unbehandelten (Ktrl.) und mit YC1 behandelten Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse**

	<b>Urinvolumen</b> [ $\mu$ l/g(KG)/2h]	<b>Na<sup>+</sup>-Exkretion</b> [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]	<b>K<sup>+</sup>-Exkretion</b> [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]
WT Ktrl.	6,07 ( $\pm$ 0,61) N=40	0,56 ( $\pm$ 0,04) N=40	1,63 ( $\pm$ 0,10) N=40
WT YC1	6,19 ( $\pm$ 2,35) N=3	0,58 ( $\pm$ 0,17) N=3	0,91 ( $\pm$ 0,26) N=3
cGKI $\alpha$ -rescue Ktrl.	4,85 ( $\pm$ 0,59) N=20	0,52 ( $\pm$ 0,06) N=20	1,64 ( $\pm$ 0,20) N=20
cGKI $\alpha$ -rescue YC1	5,71 ( $\pm$ 1,41) N=4	0,68 ( $\pm$ 0,25) N=4	0,87 ( $\pm$ 0,25) N=4

YC1 greift in die cGMP/cGKI-Signalkaskade stimulierend ein. Es wurde daher untersucht, ob die Gabe von YC1 Auswirkungen auf die Urin- und Elektrolytausscheidung hat. Der sGC-Stimulator YC1 rief bei der Urinausscheidung und Natriumionenausscheidung keine Effekte hervor im Vergleich zur Kontrolle. Die Kaliumionenausscheidung war bei YC1 Injektion von Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen tendenziell erniedrigt (vgl. Abb. 20).

### 3.2.4.2 Kombinierte Gabe von YC1 und Furosemid

In Abb. 21 und Tab. 9 werden die Ergebnisse nach Verabreichung von YC1 und Furosemid dargestellt.



**Abb. 21: Urinuntersuchung nach kombinierter Gabe von YC1 und Furosemid**

Analyse des Urins, der innerhalb von zwei Stunden nach YC1 Injektion (25 mg/kg (KG)) und darauffolgender Furosemid Injektion (200 mg/kg (KG)) (schwarz) bzw. als Kontrolle innerhalb von zwei Stunden nach Furosemid Injektion (200 mg/kg (KG)) (weiß) gesammelt wurde. A: Urinvolumen. B: Natrium-Exkretion. C: Kalium-Exkretion. Mit N=24 für mit Furosemid behandelte Wildtyp-Mäuse, mit N=3 für YC1 und Furosemid behandelte Wildtyp-Mäuse, mit N=14 für mit Furosemid behandelte cGKI $\alpha$ -rescue Mäuse und mit N=3 für YC1 und Furosemid behandelte cGKI $\alpha$ -rescue Mäuse, wie in Säulen angegeben. UNa<sup>+</sup>V: urinäre Na<sup>+</sup>-Exkretion. UK<sup>+</sup>V: urinäre K<sup>+</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht.

**Tab. 9: Urinvolumina, Natrium- und Kalium-Exkretion der mit Furosemid und mit YC1\_Furosemid behandelten Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse.**

	<b>Urinvolumen</b> [ $\mu$ l/g(KG)/2h]	<b>Na<sup>+</sup>-Exkretion</b> [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]	<b>K<sup>+</sup>-Exkretion</b> [ $\mu$ mol/g(KG)/2h]
WT Furosemid	51,30 ( $\pm$ 2,88) N=24	6,60 ( $\pm$ 0,36) N=24	3,03 ( $\pm$ 0,29) N=24
WT YC1_Furosemid	48,94 ( $\pm$ 5,80) N=3	6,28 ( $\pm$ 0,62) N=3	3,87 ( $\pm$ 0,66) N=3
cGKI $\alpha$ -rescue Furosemid	64,26 ( $\pm$ 3,10) N=14	8,73 ( $\pm$ 0,38) N=14	2,49 ( $\pm$ 0,29) N=14
cGKI $\alpha$ -rescue YC1_Furosemid	60,20 ( $\pm$ 14,07) N=3	6,76 ( $\pm$ 1,53) N=3	3,18 ( $\pm$ 0,44) N=3

Durch die Gabe von YC1 vor der Furosemid Injektion konnte bei beiden Genotypen keine Veränderung der Elektrolyt- und Wasserausscheidung im Vergleich zur alleinigen Gabe von Furosemid beobachtet werden (vgl. Abb. 21).

Abschließend kann man keine Beeinflussung der renalen Parameter durch die Gabe von YC1 feststellen.

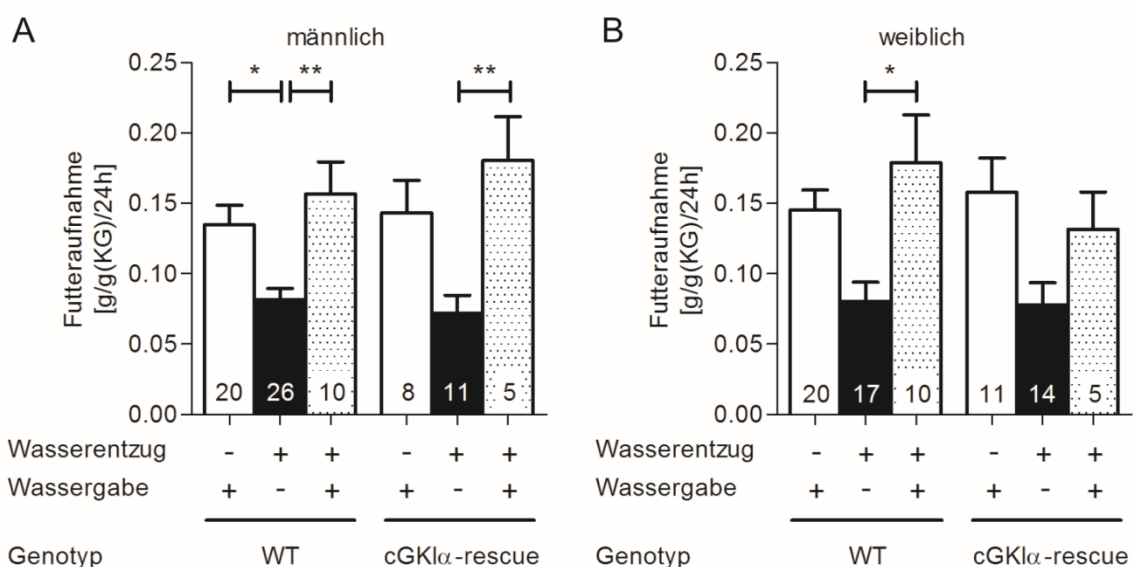
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der cGMP/cGKI-Signalweg nicht unter basalen Bedingungen, sondern nur unter der Einwirkung von Furosemid regulierend in die NKCC2 vermittelte Steuerung des Elektrolythaushalts eingreift. cGKI übt vermutlich auf die starke diuretische Wirkung des Schleifendiuretikums einen kompensatorischen Effekt aus.

### 3.3 Analyse eines Zusammenhangs von cGKI und Dehydratation

Im Folgenden steht die Überprüfung einer möglichen Beteiligung des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs beim Mechanismus der Urinkonzentrierung im Rahmen der Dehydratation im Vordergrund. Dehydratation kann u. a. durch Wasserentzug und durch Hitze erzeugt werden. Im frühen Stadium der Dehydratation tritt Natriurese auf. Es gibt Hinweise darauf, dass NO/cGMP in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. So konnte eine erhöhte Exkretion von NO und cGMP im Urin beobachtet werden. Zudem waren mRNA Level von drei Subtypen der NOS in der Medulla in Folge von Dehydratation erhöht (84). Es wurden verschiedene Parameter betrachtet. Dazu zählen die Futter- und Wasseraufnahme, Urinvolumina, Urinosmolalität, Natrium-, Kalium- und Chlorid-Exkretion, sowie Natrium- und Kalium-Konzentration im Serum.

#### 3.3.1 Wasser- und Futteraufnahme

Tendenziell nahmen sowohl männliche als auch weibliche Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse während des Wasserentzugs weniger Futter auf als bei ad libitum Zugang zu Wasser und Futter. Während der 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Futter, die auf die 24 Stunden Wasserentzug folgten, ergaben sich ähnliche Werte wie unter basalen Bedingungen (Abb. 22 und Tab. 10).



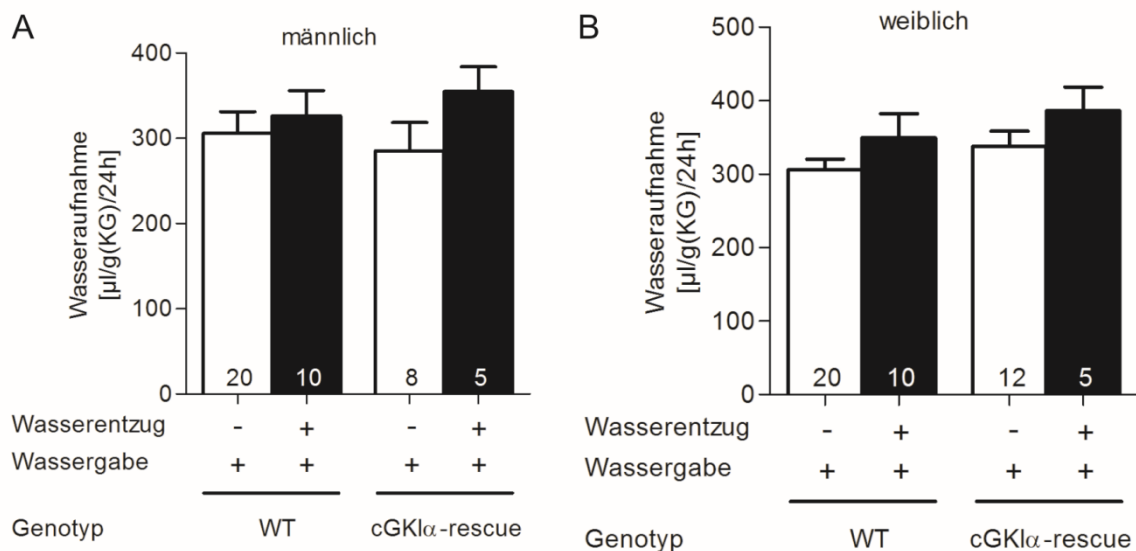
**Abb. 22: Futteraufnahme unter Wasserentzug und Kontrollbedingungen**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

**Tab. 10: Futteraufnahme**

	<b>Wildtyp</b> Futteraufnahme [g/g(KG)/24h]	<b>cGKI<math>\alpha</math>-rescue</b> Futteraufnahme [g/g(KG)/24h]
<b>männlich</b> Kontrolle	0,135 ( $\pm$ 0,014) N=20	0,143 ( $\pm$ 0,023) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug	0,082 ( $\pm$ 0,008) N=26	0,072 ( $\pm$ 0,013) N=11
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	0,157 ( $\pm$ 0,023) N=10	0,181 ( $\pm$ 0,031) N=5
<b>weiblich</b> Kontrolle	0,145 ( $\pm$ 0,014) N=20	0,158 ( $\pm$ 0,024) N=11
<b>weiblich</b> Wasserentzug	0,080 ( $\pm$ 0,014) N=17	0,078 ( $\pm$ 0,016) N=14
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	0,179 ( $\pm$ 0,034) N=10	0,132 ( $\pm$ 0,026) N=5

Im Folgenden wurde die Wasseraufnahme unter basalen Bedingungen und innerhalb 24 Stunden Wasserentzugs betrachtet. Abb. 23 und Tab. 11 veranschaulichen, dass sowohl unter den männlichen als auch weiblichen Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen bei der Menge des aufgenommenen Wassers bestand.



**Abb. 23: Wasseraufnahme bei ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter**

Bestimmung der Wasseraufnahme innerhalb von 24 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) bzw. nachdem 24 Stunden Wasserentzug vorausgegangen ist (schwarz). A:

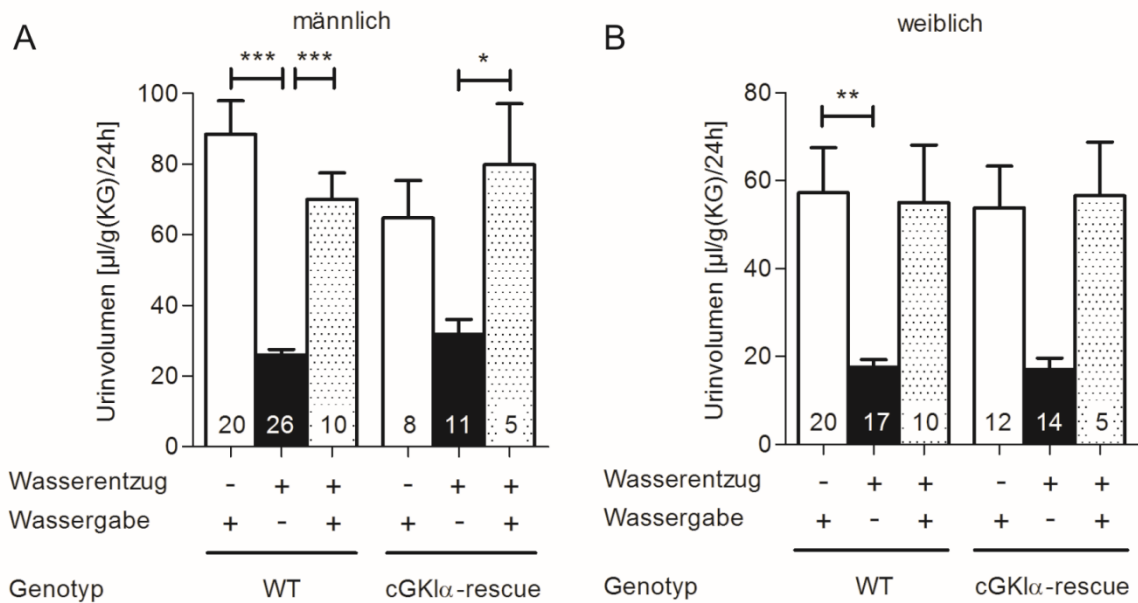
männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

**Tab. 11: Wasseraufnahme**

	<b>Wildtyp</b> Wasseraufnahme [ $\mu$ l/g(KG)/24h]	<b>cGKI<math>\alpha</math>-rescue</b> Wasseraufnahme [ $\mu$ l/g(KG)/24h]
<b>männlich</b> Wassergabe	305,9 ( $\pm$ 25,2) N=20	285,3 ( $\pm$ 33,2) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	326,0 ( $\pm$ 29,8) N=10	354,9 ( $\pm$ 29,1) N=5
<b>weiblich</b> Wassergabe	306,2 ( $\pm$ 14,5) N=20	337,9 ( $\pm$ 20,7) N=12
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	349,2 ( $\pm$ 33,0) N=10	386,2 ( $\pm$ 32,5) N=5

### 3.3.2 Renale Parameter

Im Folgenden wurde der Einfluss der Dehydratation auf unterschiedliche Parameter untersucht. Um die Urinkonzentrierungsfähigkeit der Mäuse zu untersuchen, wurde das während des Wasserentzugs ausgeschiedene Urinvolumen, die Menge an Natrium-, Kalium- und Chloridionen und die Urinosmolalität mit Hilfe von Stoffwechselläufigen untersucht. Sowohl innerhalb der Gruppe der männlichen als auch innerhalb der Gruppe der weiblichen Mäuse führte Wasserentzug zu einer signifikanten Abnahme des ausgeschiedenen Urinvolumens (Abb. 24). Das Urinvolumen innerhalb der 24 Stunden nach Wasserentzug war vergleichbar mit den basalen Werten. Die Werte der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse unterschieden sich nicht wesentlich von denen der Wildtyp-Mäuse.

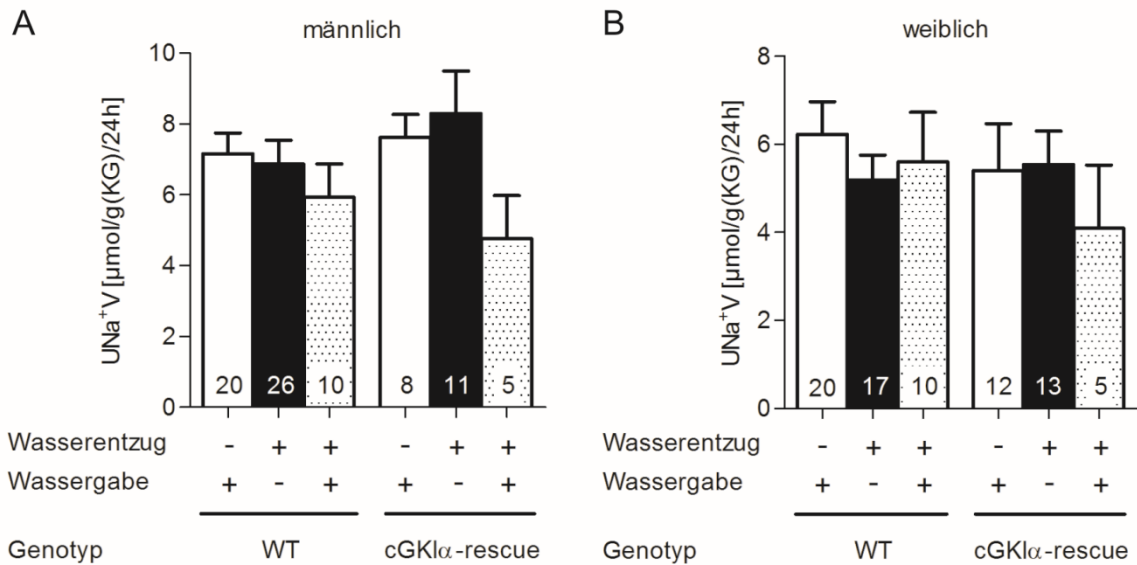


**Abb. 24: Urinvolumen bei Wasserentzug**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

**Tab. 12: Urinvolumen bei Wasserentzug**

	<b>Wildtyp</b> Urinvolumen [ $\mu\text{l/g(KG)/24h}$ ]	<b>cGKI<math>\alpha</math>-rescue</b> Urinvolumen [ $\mu\text{l/g(KG)/24h}$ ]
<b>männlich</b> Kontrolle	88,42 ( $\pm$ 9,56) N=20	64,77 ( $\pm$ 10,64) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug	26,06 ( $\pm$ 1,48) N=26	31,83 ( $\pm$ 4,23) N=11
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	70,04 ( $\pm$ 7,49) N=10	79,86 ( $\pm$ 17,28) N=5
<b>weiblich</b> Kontrolle	57,20 ( $\pm$ 10,28) N=20	53,81 ( $\pm$ 9,48) N=12
<b>weiblich</b> Wasserentzug	17,56 ( $\pm$ 1,77) N=17	17,03 ( $\pm$ 2,61) N=14
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	55,05 ( $\pm$ 13,04) N=10	56,54 ( $\pm$ 12,20) N=5



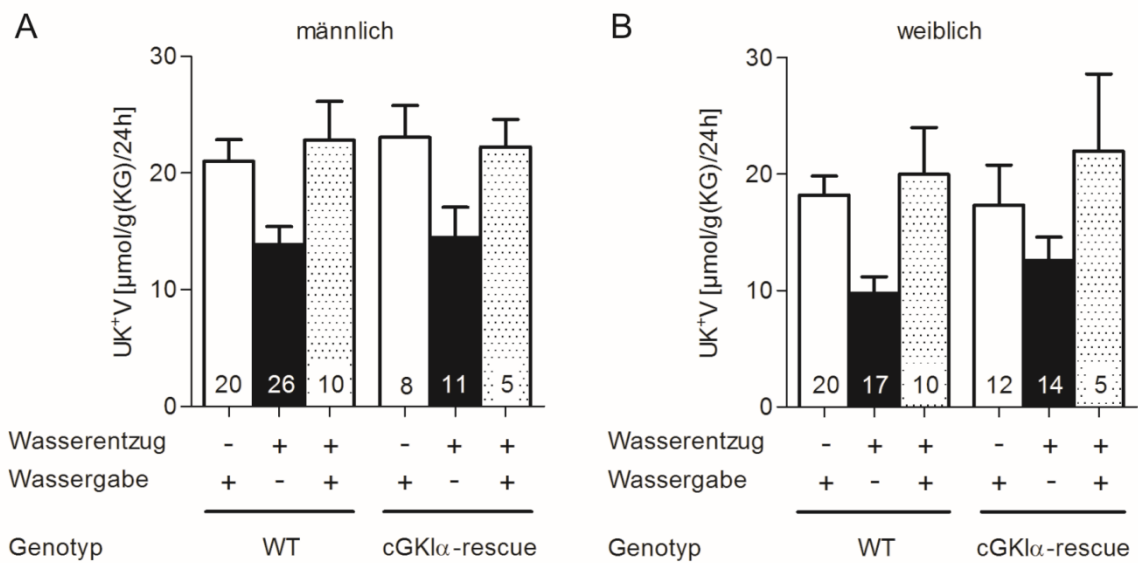
**Abb. 25: Renale Na<sup>+</sup>-Exkretion**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. UNa<sup>+</sup>V: urinaire Na<sup>+</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

Die Natriumausscheidung im Urin wurde weder innerhalb der Wildtyp- noch innerhalb der cGKIα-rescue-Mäuse infolge des Wasserentzugs verändert. Auch die Werte, die für die Zeit nach dem Wasserentzug gewonnen wurden, zeigten keine großen Abweichungen von den basalen und den Werten während Wasserentzug. Bezüglich der Natriumausscheidung ergaben sich weder zwischen den beiden Genotypen noch zwischen den einzelnen Bedingungen wesentliche Unterschiede (vgl. Abb. 25 und Tab. 13).

**Tab. 13: Renale Na<sup>+</sup>-Exkretion**

	Wildtyp Na <sup>+</sup> -Exkretion [μmol/g(KG)/24h]	cGKIα-rescue Na <sup>+</sup> -Exkretion [μmol/g(KG)/24h]
<b>männlich</b> Kontrolle	7,16 (± 0,58) N=20	7,63 (± 0,64) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug	6,87 (± 0,68) N=26	8,29 (± 1,20) N=11
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	5,93 (± 0,95) N=10	4,76 (± 1,22) N=5
<b>weiblich</b> Kontrolle	6,23 (± 0,74) N=20	5,41 (± 1,06) N=12
<b>weiblich</b> Wasserentzug	5,19 (± 0,57) N=17	5,54 (± 0,76) N=13
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	5,60 (± 1,23) N=10	4,10 (± 1,43) N=5



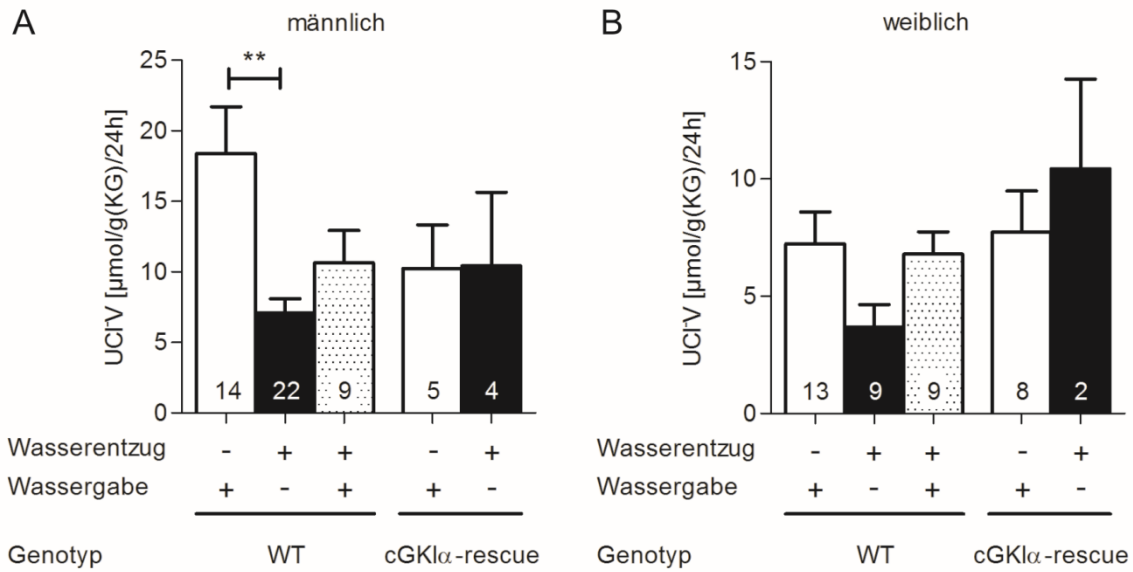
**Abb. 26: Renale K<sup>+</sup>-Exkretion**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. UK<sup>+</sup>V: urinaire K<sup>+</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

Im Folgenden wurde die Menge der ausgeschiedenen Kaliumionen im Urin untersucht (Abb. 26 und Tab. 14). Im Zuge des Wasserentzugs lag die Kaliumausscheidung tendenziell unter den Werten, die innerhalb 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Futter gemessen wurden. Die Ionenmenge im Urin, die in der Phase nach dem Wasserentzug ausgeschieden wurde, befand sich im Bereich der Kontrollwerte.

**Tab. 14: Renale K<sup>+</sup>-Exkretion**

	<b>Wildtyp</b> K <sup>+</sup> -Exkretion [μmol/g(KG)/24h]	<b>cGKIα-rescue</b> K <sup>+</sup> -Exkretion [μmol/g(KG)/24h]
<b>männlich</b> Kontrolle	21,01 (± 1,85) N=20	23,05 (± 2,74) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug	13,85 (± 1,56) N=26	14,46 (± 2,60) N=11
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	22,82 (± 3,31) N=10	22,25 (± 2,35) N=5
<b>weiblich</b> Kontrolle	18,22 (± 1,63) N=20	17,33 (± 3,45) N=12
<b>weiblich</b> Wasserentzug	9,75 (± 1,42) N=17	12,62 (± 1,97) N=14
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	19,98 (± 4,04) N=10	21,99 (± 6,63) N=5



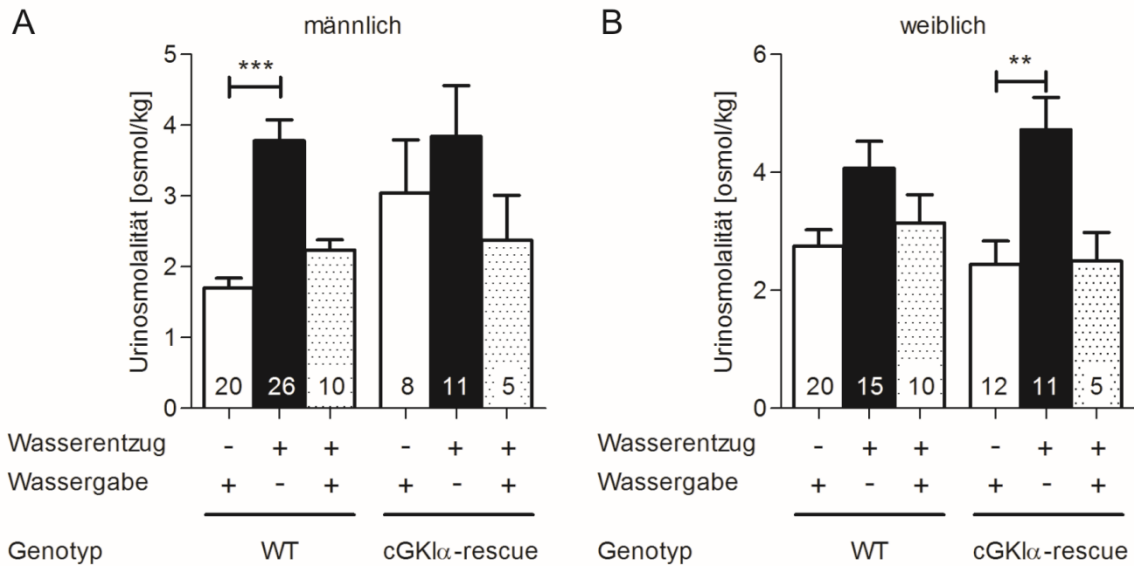
**Abb. 27: Renale Cl<sup>-</sup>-Exkretion**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. UCIV: urinäres Cl<sup>-</sup>-Exkretion. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

Die männlichen Wildtyp-Mäuse schieden infolge des Wasserentzugs signifikant weniger Chloridionen aus als unter basalen Bedingungen. Die Chloridausscheidung der weiblichen Mäuse war während Wasserentzugs niedriger verglichen mit der Ionenmenge im Urin, der innerhalb 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Futter gemessen wurde. Die Werte in der Phase nach dem Wasserentzug waren vergleichbar mit den Kontrollwerten. Innerhalb der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse führte der Wasserentzug zu keiner Veränderung der Chloridionen Ausscheidung (vgl. Abb. 27 und Tab. 15).

**Tab. 15: Renale Cl<sup>-</sup>-Exkretion**

	<b>Wildtyp</b> Cl <sup>-</sup> -Exkretion [ $\mu\text{mol/g(KG)/24h}$ ]	<b>cGKI<math>\alpha</math>-rescue</b> Cl <sup>-</sup> -Exkretion [ $\mu\text{mol/g(KG)/24h}$ ]
<b>männlich</b> Kontrolle	18,39 ( $\pm$ 3,30) N=14	10,24 ( $\pm$ 3,08) N=5
<b>männlich</b> Wasserentzug	7,07 ( $\pm$ 1,02) N=22	10,43 ( $\pm$ 5,20) N=4
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	10,63 ( $\pm$ 2,29) N=9	n.d.
<b>weiblich</b> Kontrolle	7,23 ( $\pm$ 1,37) N=13	7,73 ( $\pm$ 1,76) N=8
<b>weiblich</b> Wasserentzug	3,68 ( $\pm$ 0,97) N=9	10,44 ( $\pm$ 3,82) N=2
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	6,80 ( $\pm$ 0,95) N=9	n.d.



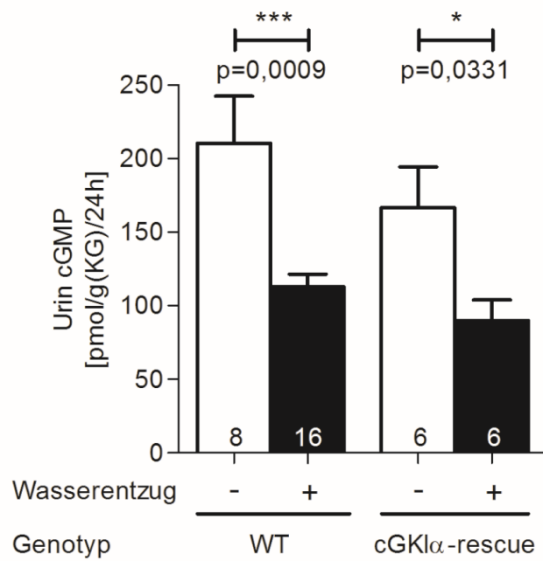
**Abb. 28: Urinosmolalität**

24 Stunden Wasserentzug mit ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß). Zusätzlich 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nach 24 Stunden Wasserentzug (gemustert). A: männlich, B: weiblich. N wie in Säulen angegeben. KG: Körpergewicht. ANOVA mit Bonferroni post-test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen.

Im Folgenden wurde die Urinosmolalität untersucht (vgl. Abb. 28 und Tab. 16). Bei den männlichen Wildtyp-Mäusen und den weiblichen cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen wurde die Urinosmolalität infolge des Wasserentzugs signifikant erhöht. Tendenziell stieg die Urinosmolalität während der Dehydratationsphase im Vergleich zur Kontrolle an. In der Zeitspanne, die auf den Wasserentzug folgte und in der die Mäuse ad libitum Zugang zu Wasser und Futter erhielten, ergaben sich ähnliche Werte für die Urinosmolalität wie in der Kontrollgruppe. Die Werte der Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue unterschieden sich dabei nicht deutlich voneinander.

**Tab. 16: Urinosmolalität**

	Wildtyp Urinosmolalität [osmol/kg]	cGKI $\alpha$ -rescue Urinosmolalität [osmol/kg]
<b>männlich</b> Kontrolle	1,70 ( $\pm$ 0,14) N=20	3,05 ( $\pm$ 0,75) N=8
<b>männlich</b> Wasserentzug	3,78 ( $\pm$ 0,30) N=26	3,84 ( $\pm$ 0,72) N=11
<b>männlich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	2,23 ( $\pm$ 0,15) N=10	2,38 ( $\pm$ 0,63) N=5
<b>weiblich</b> Kontrolle	2,75 ( $\pm$ 0,28) N=20	2,44 ( $\pm$ 0,39) N=12
<b>weiblich</b> Wasserentzug	4,07 ( $\pm$ 0,45) N=15	4,72 ( $\pm$ 0,55) N=11
<b>weiblich</b> Wasserentzug danach Wassergabe	3,14 ( $\pm$ 0,48) N=10	2,50 ( $\pm$ 0,48) N=5



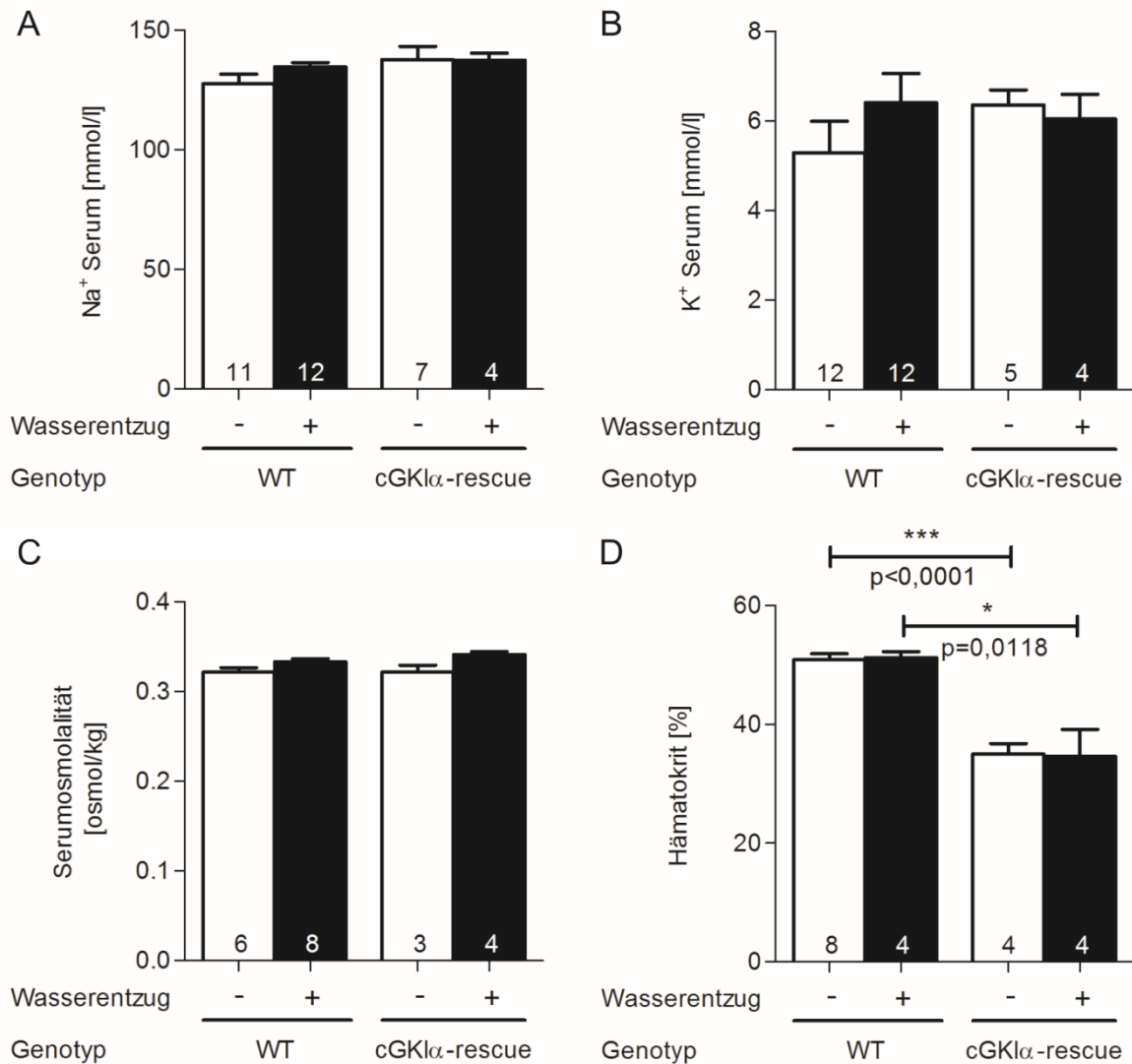
**Abb. 29: Analyse des cGMP-Gehalts im Urin**

cGMP Menge, die im Urin gemessen wurde, der innerhalb von 24 Stunden Wasserentzug und Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. als Kontrolle innerhalb von 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) gesammelt wurde. Mit N=8-16 für WT und N=6 für cGKIα-rescue, wie in Säulen angegeben.

In Abb. 29 ist die im Urin ausgeschiedene Menge an cGMP von Wildtyp- und cGKIα-rescue-Mäusen, die 24 Stunden ad libitum Zugang zu Standardfutter und Wasser hatten im Vergleich zu Mäusen, denen 24 Stunden lang der Zugang zu Wasser versagt wurde, dargestellt. Der cGMP-Gehalt wurde bei Wasserentzug in beiden Genotypen in gleicher Weise reduziert verglichen mit dem Gehalt unter basalen Bedingungen.

### 3.3.3 Blutuntersuchung

Abb. 30 zeigt die Ergebnisse der Analyse des Blutes bei Wasserentzug.



**Abb. 30: Serum Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration, Serumosmolalität und Hämatokrit**

Das Blut von Mäusen wurde nach 24 Stunden Wasserentzug und ad libitum Zugang zu Standardfutter (schwarz) bzw. ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter (weiß) retrobulbär entnommen. A: Na<sup>+</sup>-Konzentration im Serum mit N=11-12 für WT und N=4-7 für cGKI $\alpha$ -rescue. B: K<sup>+</sup>-Konzentration im Serum mit N=12 für WT und N=4-5 für cGKI $\alpha$ -rescue. C: Serumosmolalität mit N=6-8 für WT und N=3-4 für cGKI $\alpha$ -rescue. D: HKT mit N=4-8 für WT und N=4 für cGKI $\alpha$ -rescue, wie in Säulen angegeben.

Im Folgenden wurde das Blut von Mäusen nach 24 Stunden Wasserentzug bzw. als Kontrolle unter ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter untersucht. Sowohl die Na<sup>+</sup>- (Abb. 30 A, Tab. 17), die K<sup>+</sup>-Konzentration (Abb. 30 B, Tab. 17) als auch die Osmolalität (Abb. 30 C) im Serum war zwischen den unterschiedlichen Bedingungen und zwischen den beiden Genotypen ähnlich hoch. Zusätzlich wurde der Hämatokrit der Wildtyp- und der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse bestimmt. Die cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse zeigten einen signifikant niedrigeren Hämatokrit als die Wildtyp-Mäuse. Der Wasserentzug führte zu keinem Unterschied des Hämatokrits im Vergleich mit der Kontrolle.

Tab. 17: Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration im Serum

	Na <sup>+</sup> Serum [mmol/l]	K <sup>+</sup> Serum [mmol/l]
<b>Wildtyp</b> Kontrolle	127,7 (± 4,0) N=11	5,30 (± 0,70) N=12
<b>Wildtyp</b> Wasserentzug	134,7 (± 1,9) N=12	6,41 (± 0,65) N=12
<b>cGKIα-rescue</b> Kontrolle	137,9 (± 5,4) N=7	6,36 (± 0,33) N=5
<b>cGKIα-rescue</b> Wasserentzug	137,6 (± 2,8) N=4	6,05 (± 0,55) N=4

Weder die Urinausscheidung noch die renale Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Exkretion unterschieden sich zwischen Wildtyp- und cGKIα-rescue-Mäusen infolge von Wasserentzug. Lediglich die Cl<sup>-</sup>-Exkretion war aufgrund des Wasserentzugs zwischen Wildtyp- und cGKIα-rescue-Mäusen unterschiedlich. Auch der cGMP-Gehalt im Urin der beiden Genotypen war ähnlich hoch. Bei der Analyse des Serums wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien in Folge des Wasserentzugs festgestellt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Dehydratationsuntersuchungen darauf hin, dass cGKI an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts bei Wasserentzug vermutlich nicht beteiligt ist.

## 4 Diskussion

Es bestehen einige Hinweise darauf, dass cGMP bei der Regulation des NKCC2 eine Rolle spielt. cGMP spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der renalen Hämodynamik und dem tubulären Salztransport. Durch Verringerung der NKCC2-abhängigen  $\text{Na}^+$ -Aufnahme hemmt NO die NaCl Absorption im TAL (131). Neben NO hemmen auch Endothelin 1 (über  $\text{ET}_B$ -Rezeptor) (139) und ANP (7) die NaCl Absorption im TAL. Diese Faktoren stimulieren lösliche oder Rezeptor-assoziierte Guanylatcyclase. Dadurch wird cGMP erhöht und der NKCC2-abhängige  $\text{Na}^+$ -Eintritt gehemmt. NO stimuliert sGC, wodurch cGMP erhöht wird. Die cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDEII) wird durch cGMP aktiviert. Der Abbau von cAMP wird erhöht und dadurch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Aktivität verringert (130). cAMP stimuliert den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter und steigert seine Membranexpression (129). In TAL von Ratten erniedrigt cGMP die Oberflächenexpression von NKCC2. Der inhibitorische Effekt von cGMP auf die Oberflächenexpression von NKCC2 und die Netto Chloridabsorption wird durch PDEII vermittelt. NO oder andere cGMP erhöhende natriuretische Hormone hemmen die NaCl Absorption im TAL. Daran ist die Regulation des Transports von NKCC2 in oder aus der Plasmamembran beteiligt. cGMP reduziert die cAMP vermittelte Signalkaskade und dadurch die Oberflächenexpression von NKCC2. Möglicherweise erniedrigt cGMP den exozytotischen Einbau von NKCC2 in die Plasmamembran eher als es die Endozytose stimuliert (4). Die Rolle, die cGKI bei der Regulation von NKCC2 spielen könnte, ist bisher noch unklar und wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht.

### 4.1 Analyse von NKCC2 in MKTAL-Zellen

Da schon frühere Studien einen Zusammenhang zwischen cGMP und NKCC2 herausstellten (4), verwendeten wir MKTAL-Zellen, um dies näher zu untersuchen. Wir konnten im Western-Blot und in der Immunocytochemie die Expression von phosphoryliertem pNKCC2 in MKTAL-Zellen nachweisen. In dieser Arbeit wurde die Membranexpression von pNKCC2 in MKTAL-Zellen, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt wurden, verglichen. Die Stimulation von Ratten TAL mit dem  $\beta$ -Adrenozeptor Agonist Isoproterenol erhöhte Oberflächenlevel von NKCC2 (68). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führte weder die Stimulation mit 8-Br-cGMP noch mit Isoproterenol zu einer signifikanten Veränderung der Membranexpression von pNKCC2 verglichen mit den unstimulierten Zellen. Auch die kombinierte Behandlung mit 8-Br-cGMP und Isoproterenol führte im Vergleich mit den unstimulierten Zellen zu keinem Unterschied bezüglich des pNKCC2 in der Membran. In den MKTAL-Zellen konnte die Expression von cGKI $\alpha$  nicht

nachgewiesen werden. Daher schien es wenig Sinn zu machen, eine mögliche Beteiligung von cGMP und cGKI unter Verwendung der MKTAL-Zellen zu untersuchen.

## 4.2 Expression von cGKI mRNA im TAL

Im TAL von Ratten konnte die Expression von sGC nachgewiesen werden (130). In diesem Nephronabschnitt von Ratten werden auch GC-B und GC-A exprimiert (36, 162). Schon Hong und Garvin vermuteten die Expression von PKG im TAL (78, 79). Die Aktivierung von cGKI erfordert erhöhte cGMP Spiegel. In der vorliegenden Arbeit postulierten wir eine Aktivierung der cGKI nach Furosemid-Gabe. Allerdings war durch die Verabreichung von Furosemid keine Veränderung der cGMP Menge im Urin und Nierengewebe detektierbar. Die Heterogenität der Niere und die Hemmung oder Aktivierung der cGMP Synthese in einem bestimmten renalen Kompartiment ist eine mögliche Erklärung dafür. Hinzu kommen die unterschiedlichen renalen Effekte von cGMP. Eine cGMP Bestimmung im Urin und gesamten Organ ist daher nicht besonders aussagekräftig. Jedoch konnte mittels RT-PCR im Rahmen dieser Arbeit die mRNA Expression von cGKI im cTAL und mTAL nachgewiesen werden. Eine Colokalisation von cGKI und NKCC2 im TAL mittels Immunhistochemie war aufgrund der mangelnden Spezifität und Sensitivität des cGKI Antikörpers im TAL nicht möglich.

## 4.3 Untersuchung der Auswirkungen der Gabe von Furosemid

### 4.3.1 Einfluss von Furosemid auf renale Parameter

Jin XH et al. konnten bereits 2001 (86) eine Induktion der Natriurese durch renales NO über cGMP zeigen. Sie fanden heraus, dass eine Infusion des NOS Substrates L-Arginin und des NO Donors SNAP in den interstitiellen Raum eine Natriurese vermittelte. cGMP ruft *in vivo* einen Anstieg der renalen Natriumexkretion hervor. Dies wird über den Tubulusapparat vermittelt.

Des Weiteren bewiesen Jin XH et al. 2004 (85), dass cGMP, das im renalen Interstitium vermehrt vorliegt, die Druck-Natriurese über PKG verursacht. Die durch erhöhten renalen Perfusionsdruck (RPP, renal perfusion pressure) hervorgerufene Druck-Natriurese hängt mit der Hemmung der Na<sup>+</sup>-Reabsorption im renalen Tubulusapparat zusammen. Jin HX et al. kamen zusätzlich zu dem Ergebnis, dass cGMP, das im renalen Interstitium vorkommt, als Antwort auf hohen Blutdruck die Na<sup>+</sup> Reabsorption verringert und dass dies über den

proximalen Tubulus vermittelt wird. Ansteigender RPP ging einher mit einer Zunahme der Konzentration an cGMP in renalem Cortex und Medulla. Die Zellen des proximalen Tubulus wurden als das Ziel identifiziert, das für die Hemmung der Natriumreabsorption, die durch erhöhten RPP verursacht wird, verantwortlich ist. Allerdings konnte bislang nicht gezeigt werden, welche Aufgabe NO und cGMP im Nierenmark übernehmen. cGMP, das im renalen Interstitium vorkommt, hemmt die  $\text{Na}^+$ -Reabsorption, die im renalen Tubulus stattfindet. Diese Hemmung verläuft über die cGMP-abhängige Proteinkinase (85).

Da Furosemid ein potenter Inhibitor von NKCC2 ist, wurde dieses Schleifendiuretikum verwendet, um in die Natriurese und Diurese einzugreifen. Es wurde bereits gezeigt, dass durch einen direkten tubulären Mechanismus der über cGK vermittelt wird, renales interstitielles cGMP eine Natriurese hervorruft (86).

Als Kontrolle wurde der Urin vermessen, der innerhalb von 24 Stunden ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter gesammelt wurde. Auf diese Weise konnte die circadiane Rhythmik berücksichtigt werden (117).

Bekanntermaßen erhöht eine Verabreichung von Furosemid das ausgeschiedene Urinvolumen und die Natriumexkretion im Urin (80, 144). Auch bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte durch Gabe von Furosemid sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen eine signifikante Erhöhung des Urinvolumen, der Natrium-, Kalium- und Chloridionenausscheidung im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt werden (vgl. Abb. 10). Die cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse schieden nach Furosemid Injektion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sowohl ein signifikant höheres Urinvolumen als auch signifikant mehr Natrium- und Chloridionen im Urin aus. Natrium- und Chloridionen werden im TAL durch NKCC2 reabsorbiert. Bezüglich der Kaliumionenausscheidung unterschieden sich die beiden Genotypen nicht voneinander. Da das Schleifendiuretikum Furosemid ein potenter Inhibitor des NKCC2 ist, deuteten diese Ergebnisse daraufhin, dass es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen NKCC2 und dem cGMP/cGKI-Signalweg gibt. Allerdings trifft das nur im Rahmen der Furosemid-Applikation und nicht für die normale Nierenfunktion zu, da unter basalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bestehen.

Darüber hinaus wird diskutiert, dass cGMP die Oberflächenexpression von NKCC2 im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife erniedrigt (4). cGKI wird durch erhöhte cGMP Konzentrationen aktiviert. Es besteht die Möglichkeit, dass cGMP/cGKI die Natriurese über Aktivierung oder Hemmung von NKCC2 beeinflussen. In hypertensiven Ratten wurde beobachtet, dass eine erhöhte Phosphorylierung von NKCC2 zu einer Steigerung der Aktivität von NKCC2 führt (24) (siehe 4.3.5).

### 4.3.2 Plasma Renin Aktivität

Ein erhöhter Blutdruck führt zu einer Aktivierung von Barorezeptoren wodurch die Reninfreisetzung erniedrigt wird. Die stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von Renin aufgrund einer Reduktion des Blutdrucks ist allerdings viel stärker ausgeprägt. Das Renin-Angiotensin-System ist der Hauptregulator für den Salzhaushalt des Körpers. Die Gs- $\alpha$ /zyklisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A (Gsa/cAMP/PKA)-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Reninsekretion und der Reninexpression (92). Die Plasma Renin Aktivität steigt infolge von Furosemid-Gabe an (28, 125, 133). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass NO an der Kontrolle der Reninfreisetzung in der Macula densa und am Barorezeptormechanismus beteiligt ist (71). Eine Verabreichung von NOS-Inhibitoren sorgt für eine Aufhebung des durch Vorbehandlung mit Furosemid induzierten Anstiegs der Reninfreisetzung (11). cGMP hemmt eine Phosphodiesterase, dadurch wird der Abbau von cAMP unterbrochen (69) und die Gsa/cAMP/PKA-Signalkaskade, die zur Reninfreisetzung führt, kann ablaufen (30, 101). NO hemmt die cAMP abhängige Reninfreisetzung durch Aktivierung der cGK. Der PKA abhängige Mechanismus dominiert allerdings unter physiologischen Bedingungen (54). In unseren Untersuchungen konnten wir sowohl für die Wildtyp- als auch für die cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse eine Zunahme der Plasma Renin Konzentration als Antwort auf Furosemid Injektion im Vergleich zu basalen Werten feststellen (vgl. Abb. 11). Daraus schlossen wir, dass Renineffekte nicht für die in dieser Arbeit durch Verabreichung von Furosemid beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen verantwortlich waren. Obwohl vor kurzem gezeigt wurde, dass cGKI $\alpha$  mit Renin in Renin-bildenden Zellen colokalisiert ist (149), konnten wir keinen Unterschied in der Plasma Renin Konzentration zwischen Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse feststellen.

### 4.3.3 Vasopressin

Bekannterweise führt eine erhöhte Diurese zu einer Abnahme an Körperwasser. Dies wiederum bewirkt eine Zunahme der Osmolalität des Plasmas. Dadurch werden die Osmorezeptoren im Hypothalamus aktiviert, wodurch vermehrt Vasopressin aus der Neurohypophyse ausgeschieden wird. Durch die Verabreichung von Furosemid wird das RAAS aktiviert. Eine vermehrte Freisetzung von Renin führt zu einer gesteigerten Bildung von ATII (AngiotensinII). ATII verursacht eine osmotische Freisetzung von Vasopressin (152, 169). Dies erklärt möglicherweise die von uns beobachtete, vermehrte Freisetzung von Vasopressin in Mäusen, die mit Furosemid behandelt wurden. Da sich die beiden Genotypen

nicht in der Vasopressinausscheidung unterschieden, wurde die unterschiedliche Diurese zwischen den beiden Genotypen wahrscheinlich nicht durch Vasopressin verursacht.

Gimenez und Forbush zeigten, dass die Gabe des Vasopressinrezeptoragonisten dDAVP zu einer kurzzeitigen Aktivierung des NKCC2 in der Niere von Mäusen führte. In dem daran beteiligten Mechanismus spielte die Phosphorylierung von NKCC2 eine Rolle. Bei ihren Untersuchungen verwendeten sie den phosphospezifischen Antikörper R5, der gegen Thr-96 und Thr-101 gerichtet ist. Durch Stimulation mit dDAVP wird allerdings nur Thr-96 von NKCC2 phosphoryliert. Vasopressin abhängige Phosphorylierung von NKCC2 ging mit vesikulärem Transport von NKCC2 zur luminalen Membran einher (57, 61). Molony et al. fanden heraus, dass Vasopressin direkt den NKCC2 im TAL von Mäusen aktiviert (119). Die Aktivierung des transepithelialen Salztransports in murinem TAL erfolgt durch cAMP, das u.a. von Hormonen wie Vasopressin gebildet wird (8, 59). Vasopressin erhöht NKCC2 und damit den Salztransport via  $G\alpha_s$ -gekoppeltem V2 Rezeptor (V2R), cAMP Freisetzung und PKA Aktivierung v.a. im medullären TAL (116, 120). Adenylatzyklase 6 reguliert die basale Expression von NKCC2 und ist an der dDAVP-stimulierten Phosphorylierung von pSer-126 von NKCC2 in Mäusenieren beteiligt (145).

Bei der Analyse des Urins der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse ergaben sich allerdings signifikant höhere Werte in der Urin-, Natriumionen- und Chloridionenausscheidung. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass Natrium und Chlorid im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife durch NKCC2 reabsorbiert werden. Die unterschiedliche Ausscheidung zwischen den beiden Genotypen deutet daraufhin, dass dieser Teil des Nephrons durch cGKI beeinflusst wird. In der Kaliumionenausscheidung unterschieden sich die beiden Genotypen nicht voneinander. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Kalium in der Henle-Schleife durch NKCC2 reabsorbiert wird und anschließend durch ROMK (renal outer medullary potassium channel) sezerniert wird. Dies bedeutet, dass in diesem Nephronabschnitt die Kaliumausscheidung unverändert ist. Anders verhält es sich dagegen im distalen Tubulus, in dem ENaC (epithelial sodium channel) lokalisiert ist und durch Aldosteron aktiviert wird. Der dadurch erzeugte Natriumeinstrom in die Zelle erhöht die Triebkraft für die Kaliumsekretion via ROMK (135, 174). Frühere Studien konnten keinen Anstieg der Plasmaaldosteronkonzentration als Antwort auf Furosemid-Applikation nachweisen (165, 167). Wir konnten in den Wildtyp- und in den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen eine Zunahme der Vasopressin- und Kaliummenge durch Furosemid im Urin zeigen (vgl. Abb. 10 und 11). Vasopressin kann ENaC ebenfalls stimulieren (9). Dadurch wird die Kaliumsekretion vermittelt. Da sich die beiden Genotypen hinsichtlich der Kaliumausscheidung nicht voneinander unterschieden, schließen wir daraus, dass es sich um einen cGKI unabhängigen Signalweg handelt.

#### 4.3.4 Einfluss von Furosemid auf die Elektrolyte des Serums

Bei der Bestimmung der Natrium- und Kaliumionenkonzentration im Serum ergaben sich keine Unterschiede zwischen mit Furosemid behandelten und unbehandelten Mäusen. Zudem wurden bei den Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen annähernd gleiche Konzentrationen von Natrium- und Kaliumionen im Serum gemessen. Schleifendiuretika zählen zu den Hauptrisikofaktoren für Hypernatriämie und Hypokaliämie. Eine Erklärung für die Hypernatriämie ist der Mechanismus, über den die Schleifendiuretika wirken. Die Ausscheidung von Elektrolyt-freiem Wasser übersteigt die erhöhte Natriuresis (3, 107). Die Wahrscheinlichkeit einer Hypokaliämie ist recht gering. In den Abschnitten, die dem TAL nachgeschaltet sind, wird Kalium reabsorbiert und somit die reduzierte Kaliumreabsorption im TAL kompensiert (91). Normalerweise führt nur chronischer Missbrauch von Furosemid zu Hypokaliämie. Dies kann lebensbedrohlichen Herz-Kreislauf-Stillstand und Rhabdomyolyse zur Folge haben. Furosemid-induzierte Hypokaliämie wird auch als „Pseudo-Bartter-Syndrom“ bezeichnet. Sie wird von Hypernatriämie, Hypocalcämie, Hypomagnesiämie und hoher urinärer Natriumexkretion begleitet (146). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Furosemid-Gabe auf die Natrium- oder Kaliumionenkonzentration des Serums festgestellt werden. Möglicher Grund hierfür ist die akute und nicht chronische Verabreichung von Furosemid.

#### 4.3.5 Einfluss von Furosemid auf die Phosphorylierung von NKCC2

Bei der Untersuchung der Proteinexpression mittels Western-Blot wurde eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2 bei Furosemid Injektion im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen festgestellt. Auch bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen nimmt die Phosphorylierung von NKCC2 in Folge von Furosemid Behandlung leicht zu. Die Expression von totalem tNKCC2 ist zwischen den unterschiedlichen Behandlungen und den Genotypen annähernd gleich. Der sowohl bei Wildtyp- als auch bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen beobachtete Anstieg von pNKCC2 wird möglicherweise durch die Wirkung von Vasopressin hervorgerufen. In dieser Arbeit wurde eine vermehrte Ausscheidung von Vasopressin im Urin von mit Furosemid behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren gemessen. Die beiden Genotypen unterschieden sich jedoch nicht in der Vasopressinausscheidung. Das signifikant stärkere Signal von pNKCC2 bei Nieren von Wildtyp-Mäusen, denen Furosemid verabreicht wurde, im Vergleich mit Nieren von unbehandelten Wildtyp-Mäusen könnte auf die Aktivität von cGKI zurückzuführen sein. Dies wird bekräftigt durch die Tatsache, dass bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen diese signifikante Zunahme des pNKCC2 Signals bei Furosemid-Gabe nicht zu beobachten war. Bei der Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 mittels

Immunhistochemie zeigte sich, dass bei einem Großteil der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse kein pNKCC2 Signal in der Medulla zu detektieren war. Die Nierenschnitte von Wildtyp-Mäusen zeigten sowohl im Cortex als auch in der Medulla ein eindeutiges pNKCC2 Signal. Daraus lässt sich schließen, dass der im Western-Blot gefundene Unterschied in der Phosphorylierung von NKCC2 größtenteils in der Medulla begründet ist.

Die Phosphatase Calcineurin reguliert die NKCC2 Phosphorylierung. NKCC2 wird durch Calcineurin dephosphoryliert und somit deaktiviert (Abb. 31). An der Calcineurin-abhängigen Modulation von NKCC2 ist SORLA (Sorting-related receptor with A-type repeats) beteiligt. Calcineurin A $\beta$  zeigte eine erhöhte Häufigkeit in SORLA-knockout-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Dies erklärt den erniedrigten Level an NKCC2 Phosphorylierung in SORLA-knockout-Mäusen (17). NO/cGMP-abhängige Aktivierung von cGKI hemmt den Calcineurin-NFAT Signalweg in Kardiomyozyten. Dabei wird in Ca<sup>2+</sup> abhängige Schritte eingegriffen (43). Der Verlust der Inhibition der Phosphatase Calcineurin führt möglicherweise in cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen zu einer höheren Aktivität der Phosphatase. Dies könnte eine Erklärung für die verminderte NKCC2 Phosphorylierung in cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen sein.

Ursache für die Akkumulation von Proteinen an der Oberfläche ist die Stimulation der Exozytose oder die Abnahme der Endozytose. Ein Gleichgewicht aus Exozytose, Endozytose und Recycling hält die NKCC2 Oberflächenexpression in der apikalen Membran aufrecht (Abb. 31). Via PKA stimuliert cAMP die Exozytose von NKCC2. Dies führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression von NKCC2 (22). Im TAL werden viele SNARE Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) exprimiert. Dazu zählt VAMP 2 (vesicle associated membrane protein) (129). NKCC2 co-immunopräzipitiert mit VAMP 2 in TAL von Ratten. Die cAMP stimulierte Exozytose und Oberflächenexpression von NKCC2 in TAL wird über VAMP 2 vermittelt (23). Ziele des cGMP/PKG Signalwegs könnten auch regulatorische Proteine sein, die an der Modulation der SNARE Funktion beteiligt sind. Mögliche Mechanismen von PKG, die die vesikuläre Fusion in Leukozyten regulieren, wurden von Nanamori et al. untersucht. SNARE und Munc 18 (mammalian uncoordinated 18), ein SNARE Bindungsprotein, werden direkt von PKG phosphoryliert (122). Auch Kissmehl et al. und Yokoyama et al. diskutierten eine Beteiligung von cGMP/PKG an der Membranverschiebung über Interaktionen mit SNARE Proteinen. In TAL Zellen wurde dies allerdings noch nicht erforscht (94, 182). Nach Furosemid-Gabe ist die Expression von pNKCC2 in der Membran bei Wildtyp-Mäusen höher als bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um eine Beteiligung von cGMP und PKG an der Membranverschiebung festzustellen.

Endozytose ist ein zusätzlicher Mechanismus, der die Membranverschiebung reguliert. Dafür ist das Aktinzytoskelett wichtig. An der Organisation des Zytoskeletts ist RhoA, ein Mitglied

der Rho-GTPase-Familie beteiligt. Das Ergebnis einer Hemmung von RhoA ist verminderte Endocytose und Membranakkumulation (106). Eine Phosphorylierung von RhoA durch cGKI auf Leucinzipper abhängige Weise führt zur Hemmung von RhoA (88). Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von Rho/ROCK bei der Regulation von Transportprozessen im TAL (143). Die erhöhte Membranakkumulation von pNKCC2 in Wildtyp-Mäusen könnte Folge einer durch cGKI induzierten Hemmung von RhoA sein, die zu einer verringerten Endozytose in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen führt (Abb. 31).

#### **4.3.6 Einfluss von Furosemid auf die Aktivierung der cGKI mittels Analyse des cGKI Substrats VASP**

VASP ist ein Substrat der cGKI (112). Furosemid-Gabe führte bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zu einer signifikanten Zunahme von phosphoryliertem VASP (VASP-pSer239). Da bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen keine signifikante Zunahme von phosphoryliertem VASP (VASP-pSer239) nachzuweisen war, deutet dies auf eine Aktivierung des cGMP/cGKI-Signalwegs durch Furosemid-Gabe hin. Der Nachweis einer direkten Phosphorylierung von NKCC2 durch cGKI unter Verwendung von *in vitro* Kinase Assays ist nicht möglich gewesen (Daten nicht gezeigt).

In gezüchteten, bovinen endothelialen Aortenzellen stimuliert Furosemid die Bildung von cGMP. Diese ist vermutlich Folge einer erhöhten Produktion von NO. Furosemid steigert die Synthese und Freisetzung von Kininen aus dem Endothel (181). Kinine vermitteln die Freisetzung von NO (110). Ein möglicher Mechanismus, über den Furosemid die Synthese und Freisetzung von Kininen hervorruft, ist die Erniedrigung des intrazellulären pHs in Endothelzellen. In peripheren und kardialen Blutgefäßen wurde unter sauren Bedingungen erhöhte Freisetzung von Kininen beobachtet (124).

Das stellt eine Möglichkeit dar, wie Furosemid über NO und cGMP zu einer Aktivierung von cGKI führen könnte.

#### **4.3.7 NO/cGMP/cGK-beeinflussende Pharmaka**

Bei der Gabe des sGC Stimulators YC1 oder der Verabreichung von YC1 vor Furosemid Injektion wurde weder zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren noch zwischen den beiden Genotypen Unterschiede in der Urin-, Natrium- und Kaliumionenausscheidung festgestellt. Die Tatsache, dass cGKI der vermehrten Wasser-, Natrium- und Chloridionenausscheidung entgegenwirkt, tritt vermutlich nur bei Furosemid-Gabe und nicht

unter basalen Bedingungen auf. cGKI scheint an einem Mechanismus beteiligt zu sein, der den Schleifendiuretika induzierten Wasser- und Elektrolytverlust kompensiert.

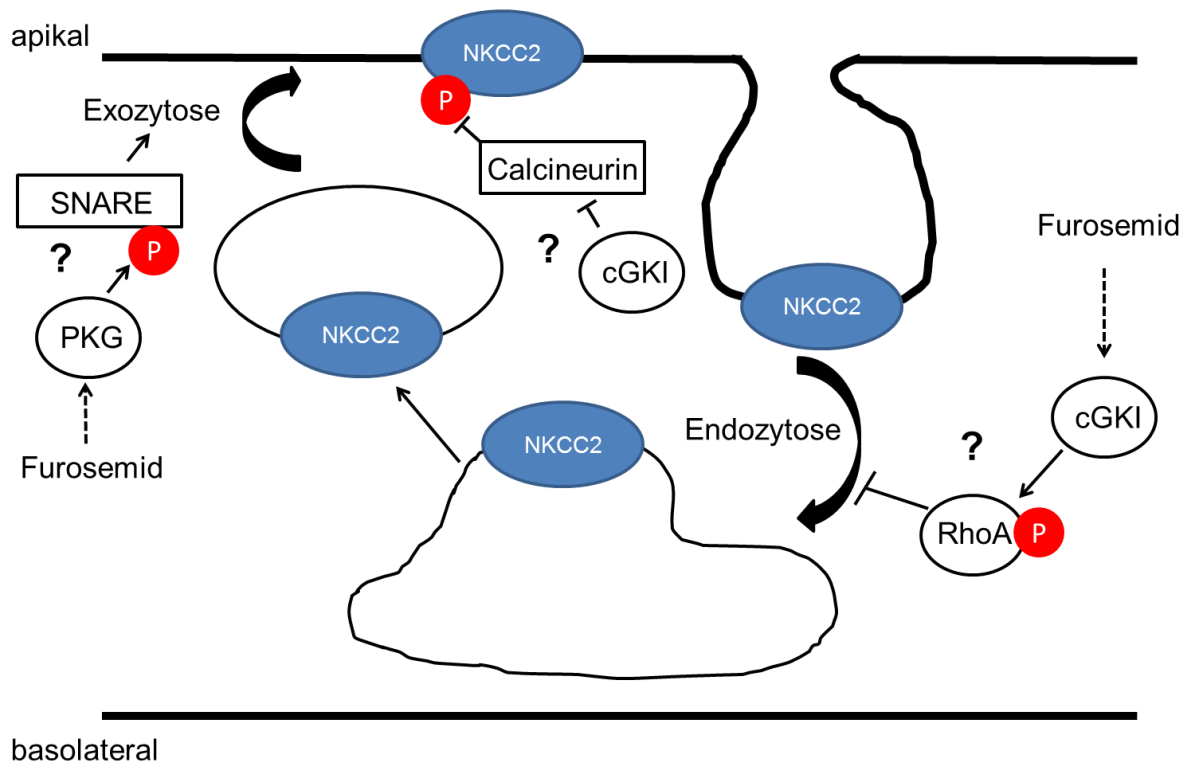


Abb. 31: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen, über die NO/cGMP die Regulation von NKCC2 beeinflussen könnte

#### 4.4 Beteiligung von cGKI bei der Dehydratation

Wasser wird v.a. durch Trinken dem Organismus zugeführt und das renale System ist für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts mitverantwortlich. Weitere physiologische Systeme wie das kardiovaskuläre System sind an der Regulation des Wasserhaushalts beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen ist die Osmolalität aller Flüssigkeitskompartimente gleich. Dehydratation kann zu einer Dysfunktion in diesen Kreisläufen führen. Uns stellte sich die Frage, ob der NO/cGMP/cGKI-Signalweg an den im Rahmen der Dehydratation ablaufenden Mechanismen beteiligt ist.

#### 4.4.1 Wasser- und Futteraufnahme

Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse unterschieden sich bei ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter nicht in der Futteraufnahme. Bei Wasserentzug für 24 Stunden, nahmen beide Genotypen signifikant weniger Futter auf verglichen mit basalen Bedingungen. Männliche und weibliche Mäuse unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Der reduzierte Nahrungsbedarf lässt sich durch verminderte Aktivität, erniedrigte Stoffwechselrate und effektivere Futtermittelverwertung erklären. Wasserentzug führt zu verminderter Speichelsekretion. Daher könnte die Fähigkeit der Mäuse zu schlucken beeinträchtigt sein. Dies ist eine mögliche Erklärung für die reduzierte Futteraufnahme der Mäuse bei Wasserentzug (82).

Die Wasseraufnahme ist bei beiden Genotypen innerhalb der 24 Stunden nach dem Wasserentzug nicht wesentlich unterschiedlich verglichen mit den basalen Werten. Dies bedeutet, dass die Mäuse den Wasserentzug vermutlich gut kompensieren können, d. h. auch in den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen laufen die für den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt verantwortlichen Kontrollsysteme ab. An der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase sind Mechanismen beteiligt, die sich auf Natriumaufnahme und die renale Exkretion von Flüssigkeit und Natrium auswirken. Diese Kontrollsysteme werden durch Veränderungen im Volumen oder Elektrolytgehalt der extrazellulären Flüssigkeit stimuliert (159). Mit Dehydratation gehen erhöhte Tonizität des Plasmas und erniedrigtes Plasmavolumen einher. Dies führt zur Freisetzung des antidiuretischen Hormons Vasopressin aus der Neurohypophyse. Erhöhte Wasserreabsorption in der Niere, ein konzentrierter Urin und niedriges Urinvolumen sind die Folge (134). Die Wasseraufnahme der Mäuse ist trotz vorangegangenen Wasserentzugs vermutlich nicht erhöht, da sogar im Zustand der Dehydratation und erhöhter Plasmatonizität zentrale Volumenexpansion Durst abmildern kann (158, 170).

#### 4.4.2 Beeinflussung renaler und hämatologischer Parameter durch Wasserentzug

Ein akuter Anstieg der urinären Natriumexkretion ist die physiologische Antwort auf Dehydratation. Dies trägt dazu bei, den weiteren Anstieg der Natriumkonzentration im Plasma und der extrazellulären Tonizität vorzubeugen. Die NO und cGMP Exkretion im Urin sind bei dieser sog. Dehydration Natriurese erhöht. Es wird diskutiert, dass der NOS/NO/cGMP-Signalweg an der natriuretischen Antwort des Wasserentzugs beteiligt ist (84). Es wurde bereits gezeigt, dass cGMP via Src und cGKI abhängiger Signalwege für die

Hemmung der renalen  $\text{Na}^+$ -Reabsorption verantwortlich ist und an der sog. Druck-Natriuresis beteiligt ist (33). Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob cGKI an der Dehydration Natriuresis beteiligt ist.

Die Nieren regulieren die Salz- und Wasserausscheidung. Auf diese Weise werden Volumen und Osmolalität des Extrazellulärraums konstant gehalten. 24 Stunden Wasserentzug führte im Vergleich zu basalen Bedingungen sowohl bei Wildtyp- als auch bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen zu einer signifikanten Abnahme des Urinvolumens. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die mangelnde Flüssigkeitszufuhr durch vermehrte renale Retention von Wasser kompensiert wird. Das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen wird vermindert und die Plasmaosmolalität nimmt zu. Die dadurch hervorgerufene Vasopressin-Ausschüttung führt zu einer gesteigerten Rückresorption von Wasser in den distalen Tubuli und den Sammelrohren. Das Ergebnis ist eine Konzentrierung des Urins mit verringertem Urinvolumen und erhöhter Urinosmolalität (134). Bei der Analyse der ausgeschiedenen Natriumionen ergaben sich durch 24 Stunden Wasserentzug verglichen mit basalen Bedingungen keine Unterschiede. Auch die Werte der Wildtyp-Mäuse unterschieden sich nicht von denen der cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse. Die weiblichen Mäuse beider Genotypen schieden generell weniger Natriumionen aus als die männlichen Mäuse.

Die Menge der ausgeschiedenen Kaliumionen nahm bei beiden Genotypen und Geschlechtern infolge des 24 Stunden Wasserentzugs im Vergleich zu basalen Bedingungen tendenziell ab.

Die Chloridionenexkretion nahm bei männlichen Wildtyp-Mäusen als Folge des Wasserentzugs verglichen mit Wassergabe signifikant ab. Diese Abnahme konnte bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre ein cGMP-aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Kanal in der apikalen Membran des renalen proximalen Tubulus (34). Dieser  $\text{Cl}^-$ -Kanal wird durch cGMP aktiviert und führt zu einem Anstieg des Chloridausstoms aus der Zelle. Da die cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse keine Abnahme der Chloridausscheidung in Folge von Wasserentzug aufweisen könnte dies ein Hinweis auf die Beteiligung der cGKI an der Regulation dieses cGMP-aktivierten  $\text{Cl}^-$ -Kanal sein. Dies müsste allerdings näher untersucht werden.

Wasserentzug führte zu einer Abnahme der cGMP-Menge im Urin. Allerdings ist dabei zu bedenken, dass sich darauf nicht automatisch auf die cGMP-Konzentration schließen lässt, die in einem bestimmten Teil des tubulären Systems während des Wasserentzugs vorhanden ist. Aus diesem Grund ist die Messung der cGMP-Menge im Urin eher ungeeignet, um Aussagen über tatsächliche cGMP-Mengen in bestimmten Abschnitten der Niere zu treffen. In einer Arbeit von Jia et al. führte 24 Stunden Wasserentzug bei Wildtyp-

Mäusen zu einem Anstieg der urinären Natrium- und cGMP-Exkretion (84). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Eine erhöhte cGMP-Konzentration im Urin infolge von Wasserentzug würde die These der Dehydration Natriurese stützen, da cGMP die Oberflächenexpression von NKCC2 erniedrigen soll. Dies würde eine erhöhte Ausscheidung von Natriumionen erklären (4). Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass ANP unter Beteiligung von cGMP und PKG die Expression von AQP2 in der Membran von IMCD (inner medullary collecting duct) Zellen erniedrigt und auf diese Weise diuretisch wirkt (95). Bei Wasserentzug nimmt die Urinausscheidung ab. Folglich würde man, wie von uns gemessen, eine erniedrigte cGMP-Menge im Urin erwarten. Eine eindeutige Aussage über die cGMP-Ausscheidung im Rahmen von Wasserentzug lässt sich daher schwer treffen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit deuten nicht auf eine Beteiligung von cGKI an der Regulation der Dehydration Natriurese hin.

Natrium- und Kaliumionenkonzentration und die Osmolalität des Serums wurde durch 24 Stunden Wasserentzug im Vergleich zu basalen Bedingungen sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen nicht verändert. Man würde erwarten, dass Dehydratation zu einer Hämatokrit- und Natriumerhöhung im Serum führt. Bei Menschen wurden allerdings bei „Exsikkose“ vermehrt Hyponatriämien beobachtet (77). Dies bedeutet, dass die Mäuse mit voll funktionsfähigem endokrinem System den 24 Stunden andauernden Wasserentzug anscheinend gut kompensieren konnten. Sie verfügen über verschiedene Regulationsmechanismen, mit deren Hilfe sie Wassermangel über gewisse Zeit tolerieren können. Die im Zuge von Dehydratation ablaufenden Mechanismen lassen sich in intra- und extrazellulär unterteilen. Zunächst nehmen die Flüssigkeitsreserven durch Respiration und Urinausscheidung ab. Es wurde gezeigt, dass bei *Mus musculus* Wildtyp die extrazelluläre Flüssigkeit speziell das Plasma initial bei Wasserentzug eingeengt und später wieder regeneriert wird (62). McKenna und Haines zeigten, dass bei Reduktion der Wasseraufnahme um die Hälfte an den ersten beiden Tagen eine Natriurese und Kaliurese zu beobachten war. Zudem verdoppelte sich die Aldosteronexkretion, verringerte sich die Futteraufnahme und das Urinvolumen stieg leicht an. Am Tag drei und vier kam es zu Antidiurese und Antinatriurese während die Kaliurese aufhörte und Aldosteronexkretion abnahm, aber immer noch über dem normalen Wert lag. Die fraktionelle intestinale Absorption von Natrium- und Kaliumionen setzte im Laufe dieser Zeit ein. Sie erklärten die anfängliche Kaliurese mit der Freisetzung von Vasopressin (ADH), die als Antwort auf die erhöhte Plasmaosmolalität und erniedrigtes Blutvolumen auftritt. Die Aldosteronfreisetzung führten sie auf die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zurück (114). Vasopressin steigt im Plasma bereits bei einer Zunahme der Plasmaosmolalität von 1 % an (40). Die Osmolalität des extrazellulären Kompartiments nimmt zu, wodurch Wasser aus

dem intrazellulären Raum entzogen wird und Osmorezeptoren aktiviert werden. Es wird vermehrt Vasopressin aus der Neurohypophyse freigesetzt, wodurch Reabsorption von Wasser in der Niere stimuliert und Wasserverlust reduziert wird (161). Die Abnahme des Perfusionsdrucks wird von Volumen- und Druckrezeptoren im juxtamedullären Apparat der Nieren registriert. Dies führt zu einer Freisetzung von Renin (155). Das aus AngiotensinI gebildete AngiotensinII hat unterschiedliche Wirkungen. Es führt zu Vasokonstriktion, stimuliert Durstzentren im Gehirn und die Freisetzung des Mineralocorticoidhormons Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Letztendlich wird ein verringertes Volumen von konzentriertem Urin ausgeschieden. Aldosteron sorgt für Natriumregulation durch Erhöhung der Natriumabsorption in der Niere und durch Stimulation der Suche und der Aufnahme von Natrium (Steigerung des Natriumappetits) (55). Es ist möglich, dass zwar die  $\text{Na}^+$ -Konzentration der interstitiellen Flüssigkeit, aber nicht die im Serum, erhöht sein kann (65). Deshalb konnten wir möglicherweise trotz Dehydratation keinen veränderten  $\text{Na}^+$ -Gehalt im Serum feststellen.

Der Hämatokrit war bei den cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen sowohl bei Wasserentzug als auch unter basalen Bedingungen signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen. Dies konnte zumindest unter basalen Bedingungen schon von Föller et al. für cGKI-knockout-Mäuse (cGKI-KO) gezeigt werden. cGKI-KO-Mäuse leiden an Anämie, die durch einen Verlust von Erythrozyten aufgrund einer verringerten Lebenserwartung der Erythrozyten verursacht werden kann. Die verringerte Lebenserwartung von Erythrozyten lässt sich durch eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erklären. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Exposition von Phosphatidylserin (PS) an den Erythrozyten ist ein Kennzeichen von Apoptose. Vermutlich sind reife Erythrozyten von cGKI-knockouts anfälliger für Eryptose (47). Neuere Untersuchungen geben einen Hinweis auf eine Eisenmangelanämie in den cGKI-KO, die durch intestinale Blutungen verursacht wird (1) (Angermeier et al., *BMC Pharmacology and Toxicology* 2015, 16 (Suppl 1):A35). Früher wurde der Hydratationszustand v. a. anhand des Hämatokritwertes beurteilt. In der vorliegenden Arbeit führte eine Dehydratation nicht zu einer Veränderung des Hämatokritwertes. Dies steht im Einklang mit dem derzeitigen Kenntnisstand, laut dem der Hämatokritwert v. a. bei älteren Patienten diesbezüglich wenig valide ist (77).

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der cGKI in der Niere untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass cGKs an der renalen Hämodynamik und der Fibrose beteiligt sind. Wir analysierten insbesondere die Rolle der cGKI bei der Elektrolytausscheidung, Diurese sowie der Dehydratation. cGKI wird vor allem im renalen Interstitium, in Mesangialzellen des Glomerulus und im juxtaglomerulären Apparat exprimiert. Für die Durchführung der Versuche wurden cGKI-KO- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse verwendet. In cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen wird nach Total-knockout der cGKI die  $\alpha$ -Isoform der cGKI unter Kontrolle eines Glattmuskel-Promotors exprimiert. Bei der cGKI $\alpha$ -rescue-Linie findet man keine Expression der cGKI $\alpha$  in renalen Strukturen, sondern lediglich in Arteriolen.

Vorhergehende Studien postulierten eine Beteiligung von NO/cGMP an der sog. Dehydration Natriurese. Es sollte daher abgeklärt werden, ob cGKI dabei eine Rolle spielt. Die Versuche, bei denen den Mäusen Wasser entzogen wurde, ergaben weder bei der Analyse des Urins noch des Blutes Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Daraus lässt sich schließen, dass der NO/cGMP/cGKI-Signalweg bei der Regulation des Elektrolythaushalts während Wasserentzug vermutlich keine Rolle spielt.

Frühere Arbeiten wiesen auf einen Einfluss von NO/cGMP auf die Regulation der Aktivität des NKCC2 hin. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung des cGMP/cGKI-Signalwegs an der Regulation des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Cotransporters gezeigt werden. Dabei war der Nachweis der mRNA Expression von cGKI im corticalen und medullären TAL ein entscheidender Aspekt. Die Verabreichung von Furosemid führte bei Wildtyp- jedoch nicht bei cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen zur Zunahme der Phosphorylierung und Membrantranslokation von NKCC2. cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse schieden zudem nach Injektion des Diuretikums signifikant erhöhtes Urinvolumen, Natrium- und Chloridionen aus. Unter basalen Bedingungen unterschieden sich die Urinparameter der beiden Genotypen nicht voneinander. Die Verabreichung von Furosemid erhöhte die Vasopressinkonzentration in Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäusen auf gleiche Weise. Da sich aber die Phosphorylierung von NKCC2 zwischen den Genotypen unterschied, wird die unterschiedliche Diurese nicht durch unterschiedliche Sekretion von Vasopressin verursacht. Auch Renin konnte als Grund für die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ausgeschlossen werden. Vermutlich vermittelt cGKI einen kompensatorischen Effekt als Antwort auf die Furosemid-Gabe.

In weiterführenden Studien könnte nun untersucht werden, über welchen Mechanismus cGKI die Aktivität von NKCC2 beeinflusst. Ein möglicher Anhaltspunkt wäre die Regulation der Phosphatase Calcineurin, die NKCC2 dephosphoryliert. Des Weiteren würde eine

Beteiligung von RhoA bei der Endozytose in Frage kommen. Auch die Bedeutung von SNARE Proteinen bei der Exozytose von NKCC2 stellt einen Angriffspunkt der cGKI dar. Es wäre zudem interessant, auf welche Weise Furosemid zu einer Aktivierung von cGKI führt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abstracts from the 7th International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. *BMC pharmacology & toxicology* 16 Suppl 1: A1-A104, 2015.
2. **Arai SR, Butzlaff A, Stotts NA, and Puntillo KA.** Quench the thirst: lessons from clinical thirst trials. *Biological research for nursing* 16: 456-466, 2014.
3. **Arampatzis S, Funk GC, Leichtle AB, Fiedler GM, Schwarz C, Zimmermann H, Exadaktylos AK, and Lindner G.** Impact of diuretic therapy-associated electrolyte disorders present on admission to the emergency department: a cross-sectional analysis. *BMC medicine* 11: 83, 2013.
4. **Ares GR, Caceres P, Alvarez-Leefmans FJ, and Ortiz PA.** cGMP decreases surface NKCC2 levels in the thick ascending limb: role of phosphodiesterase 2 (PDE2). In: *American journal of physiology* 2008, p. F877-887.
5. **Ares GR, Caceres PS, and Ortiz PA.** Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *American journal of physiology* 301: F1143-1159, 2011.
6. **Atherton JC.** Renal physiology. *British journal of anaesthesia* 44: 236-245, 1972.
7. **Bailly C.** Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. *J Am Soc Nephrol* 11: 1791-1797, 2000.
8. **Bailly C.** Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int Suppl* 65: S29-35, 1998.
9. **Bankir L, Bichet DG, and Bouby N.** Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *American journal of physiology* 299: F917-928, 2010.
10. **Barajas L.** Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *The American journal of physiology* 237: F333-343, 1979.
11. **Beierwaltes WH.** Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *The American journal of physiology* 269: F134-139, 1995.
12. **Bender AT, and Beavo JA.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* 58: 488-520, 2006.
13. **Benton D.** Dehydration influences mood and cognition: a plausible hypothesis? *Nutrients* 3: 555-573, 2011.
14. **Biel M, and Michalakakis S.** Cyclic nucleotide-gated channels. *Handbook of experimental pharmacology* 111-136, 2009.
15. **Bonventre JV, and Yang L.** Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 121: 4210-4221, 2011.
16. **Boone M, and Deen PM.** Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch* 456: 1005-1024, 2008.
17. **Borschewski A, Himmerkus N, Boldt C, Blankenstein KI, McCormick JA, Lazelle R, Willnow TE, Jankowski V, Plain A, Bleich M, Ellison DH, Bachmann S, and Mutig K.** Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter. *J Am Soc Nephrol* 2015.
18. **Bourgeois S, Rossignol P, Grelac F, Chalumeau C, Klein C, Laghmani K, Chambrey R, Bruneval P, Duong JP, Poggioli J, Houillier P, Paillard M, Kellermann O, and Froissart M.** Differentiated thick ascending limb (TAL) cultured cells derived from SV40 transgenic mice express functional apical NHE2 isoform: effect of nitric oxide. *Pflugers Arch* 446: 672-683, 2003.
19. **Brater DC.** Diuretic therapy. *The New England journal of medicine* 339: 387-395, 1998.
20. **Busch JL, Bessay EP, Francis SH, and Corbin JD.** A conserved serine juxtaposed to the pseudosubstrate site of type I cGMP-dependent protein kinase contributes strongly to autoinhibition and lower cGMP affinity. *The Journal of biological chemistry* 277: 34048-34054, 2002.

21. **Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, and Walter U.** cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry* 269: 14509-14517, 1994.
22. **Caceres PS, Ares GR, and Ortiz PA.** cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* 284: 24965-24971, 2009.
23. **Caceres PS, Mendez M, and Ortiz PA.** Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) but Not VAMP3 mediates cAMP-stimulated trafficking of the renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> co-transporter NKCC2 in thick ascending limbs. *The Journal of biological chemistry* 289: 23951-23962, 2014.
24. **Carmosino M, Rizzo F, Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Bianchi G, Svelto M, and Valenti G.** NKCC2 is activated in Milan hypertensive rats contributing to the maintenance of salt-sensitive hypertension. *Pflugers Arch* 462: 281-291, 2011.
25. **Caroe Nordgaard J, Kruse LS, Gammeltoft S, and Kruuse CR.** Role of Ser102 and Ser104 as regulators of cGMP hydrolysis by PDE5A. *PLoS one* 9: e107627, 2014.
26. **Casteel DE, Smith-Nguyen EV, Sankaran B, Roh SH, Pilz RB, and Kim C.** A crystal structure of the cyclic GMP-dependent protein kinase I $\beta$  dimerization/docking domain reveals molecular details of isoform-specific anchoring. *The Journal of biological chemistry* 285: 32684-32688, 2010.
27. **Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, and Schnermann J.** Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 114: 634-642, 2004.
28. **Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, and Schnermann J.** Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *American journal of physiology* 286: F848-857, 2004.
29. **Chen L, Daum G, Chitaley K, Coats SA, Bowen-Pope DF, Eigenthaler M, Thumati NR, Walter U, and Clowes AW.** Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 1403-1408, 2004.
30. **Chiu T, and Reid IA.** Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278: 793-799, 1996.
31. **Chu DM, Corbin JD, Grimes KA, and Francis SH.** Activation by cyclic GMP binding causes an apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 272: 31922-31928, 1997.
32. **Cieza JA, Hinostroza J, Huapaya JA, and Leon CP.** Sodium chloride 0.9% versus Lactated Ringer in the management of severely dehydrated patients with choleric diarrhoea. *Journal of infection in developing countries* 7: 528-532, 2013.
33. **Citterio L, Ferrandi M, Delli Carpini S, Simonini M, Kuznetsova T, Molinari I, Dell'Antonio G, Lanzani C, Merlino L, Brioni E, Staessen JA, Bianchi G, and Manunta P.** cGMP-dependent protein kinase 1 polymorphisms underlie renal sodium handling impairment. *Hypertension* 62: 1027-1033, 2013.
34. **Darvish N, Winaver J, and Dagan D.** A novel cGMP-activated Cl<sup>-</sup> channel in renal proximal tubules. *The American journal of physiology* 268: F323-329, 1995.
35. **Dasgupta A, Bowman L, D'Arsigny C, and Archer S.** Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clinical pharmacology and therapeutics* 97: 88-102, 2015.
36. **Dean AD, Vehaskari VM, Ritter D, and Greenwald JE.** Distribution and regulation of guanylyl cyclase type B in the rat nephron. *The American journal of physiology* 270: F311-318, 1996.
37. **Deevi RK, Koney-Dash M, Kissenpfennig A, Johnston JA, Schuh K, Walter U, and Dib K.** Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of beta2 integrins in neutrophils. *J Immunol* 184: 6575-6584, 2010.

38. **Di Nicolantonio R, and Mendelsohn FA.** Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. *The American journal of physiology* 250: R898-901, 1986.
39. **Dousa TP.** Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney international* 55: 29-62, 1999.
40. **Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, and Robertson GL.** The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *The Journal of clinical investigation* 52: 3212-3219, 1973.
41. **El-Sharkawy AM, Sahota O, and Lobo DN.** Acute and chronic effects of hydration status on health. *Nutrition reviews* 73 Suppl 2: 97-109, 2015.
42. **Fenton RA, and Knepper MA.** Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiological reviews* 87: 1083-1112, 2007.
43. **Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, and Wollert KC.** Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11363-11368, 2002.
44. **Flatman PW.** Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochimica et biophysica acta* 1566: 140-151, 2002.
45. **Flatman PW, and Creanor J.** Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport by protein phosphorylation in ferret erythrocytes. *The Journal of physiology* 517 ( Pt 3): 699-708, 1999.
46. **Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF, Darman RB, and Forbush B.** Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *The Journal of biological chemistry* 277: 37551-37558, 2002.
47. **Foller M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F, and Feil R.** Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6771-6776, 2008.
48. **Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F.** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochemical pharmacology* 42: 1849-1857, 1991.
49. **Forstermann U, and Sessa WC.** Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33: 829-837, 837a-837d, 2012.
50. **Friebe A, and Koesling D.** Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research* 93: 96-105, 2003.
51. **Furchgott RF, and Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3: 2007-2018, 1989.
52. **Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, and Hebert SC.** Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *The Journal of biological chemistry* 269: 17713-17722, 1994.
53. **Gambaryan S, Hausler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A, and Lohmann SM.** Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *The Journal of clinical investigation* 98: 662-670, 1996.
54. **Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, and Lohmann SM.** Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9003-9008, 1998.
55. **Geerling JC, and Loewy AD.** Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1338-1348, 2007.
56. **Gimenez I, and Forbush B.** Regulatory phosphorylation sites in the NH2 terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). *American journal of physiology* 289: F1341-1345, 2005.

57. **Gimenez I, and Forbush B.** Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. *The Journal of biological chemistry* 278: 26946-26951, 2003.
58. **Gimenez I, Isenring P, and Forbush B.** Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *The Journal of biological chemistry* 277: 8767-8770, 2002.
59. **Greger R.** Physiology of renal sodium transport. *The American journal of the medical sciences* 319: 51-62, 2000.
60. **Griffith OW, and Stuehr DJ.** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual review of physiology* 57: 707-736, 1995.
61. **Gunaratne R, Braucht DW, Rinschen MM, Chou CL, Hoffert JD, Pisitkun T, and Knepper MA.** Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 15653-15658, 2010.
62. **Haines H, McKenna TM, and Melton JE.** Body fluid distribution in wild *Mus musculus* acclimated to water restriction. *The American journal of physiology* 235: R237-242, 1978.
63. **Halbrugge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, and Walter U.** Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *The Journal of biological chemistry* 265: 3088-3093, 1990.
64. **Halbrugge M, and Walter U.** Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *European journal of biochemistry / FEBS* 185: 41-50, 1989.
65. **Haljamae H, Linde A, and Amundson B.** Comparative analyses of capsular fluid and interstitial fluid. *The American journal of physiology* 227: 1199-1205, 1974.
66. **Hammelmann V, Zong X, Hofmann F, Michalakakis S, and Biel M.** The cGMP-dependent protein kinase II is an inhibitory modulator of the hyperpolarization-activated HCN2 channel. *PloS one* 6: e17078, 2011.
67. **Hannemann A, and Flatman PW.** Phosphorylation and transport in the Na-K-2Cl cotransporters, NKCC1 and NKCC2A, compared in HEK-293 cells. *PloS one* 6: e17992, 2011.
68. **Haque MZ, Caceres PS, and Ortiz PA.** beta-Adrenergic receptor stimulation increases surface NKCC2 expression in rat thick ascending limbs in a process inhibited by phosphodiesterase 4. *American journal of physiology* 303: F1307-1314, 2012.
69. **Harrison SA, Reifsnnyder DH, Gallis B, Cadd GG, and Beavo JA.** Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotoxic drugs. *Molecular pharmacology* 29: 506-514, 1986.
70. **Hauser W, Knobeloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, and Zimmer M.** Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8120-8125, 1999.
71. **He XR, Greenberg SG, Briggs JP, and Schnermann JB.** Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. *The American journal of physiology* 268: F953-959, 1995.
72. **Heer M, Baisch F, Kropp J, Gerzer R, and Drummer C.** High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. *American journal of physiology* 278: F585-595, 2000.
73. **Hofmann F.** The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 280: 1-4, 2005.
74. **Hofmann F, Ammendola A, and Schlossmann J.** Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science* 113 ( Pt 10): 1671-1676, 2000.
75. **Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, and Schlossmann J.** Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews* 86: 1-23, 2006.

76. **Hofmann F, and Wegener JW.** cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 1020: 17-50, 2013.
77. **Hofmann W.** [The pitfall "dehydration" and hyponatremia]. *Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie* 45: 155-163; quiz 164-155, 2012.
78. **Hong NJ, and Garvin JL.** Endogenous flow-induced nitric oxide reduces superoxide-stimulated Na/H exchange activity via PKG in thick ascending limbs. *American journal of physiology* ajrenal 00583 02014, 2014.
79. **Hong NJ, and Garvin JL.** Nitric oxide reduces flow-induced superoxide production via cGMP-dependent protein kinase in thick ascending limbs. *American journal of physiology* 296: F1061-1066, 2009.
80. **Hori Y, Takusagawa F, Ikadai H, Uechi M, Hoshi F, and Higuchi S.** Effects of oral administration of furosemide and torsemide in healthy dogs. *American journal of veterinary research* 68: 1058-1063, 2007.
81. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 9265-9269, 1987.
82. **Ito K, Morikawa M, and Inenaga K.** The effect of food consistency and dehydration on reflex parotid and submandibular salivary secretion in conscious rats. *Archives of oral biology* 46: 353-363, 2001.
83. **Jarchau T, Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM, and Walter U.** Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9426-9430, 1994.
84. **Jia Z, Liu G, Sun Y, Kakizoe Y, Guan G, Zhang A, Zhou SF, and Yang T.** mPGES-1-derived PGE2 mediates dehydration natriuresis. *American journal of physiology* 304: F214-221, 2013.
85. **Jin XH, McGrath HE, Gildea JJ, Siragy HM, Felder RA, and Carey RM.** Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. *Hypertension* 43: 1133-1139, 2004.
86. **Jin XH, Siragy HM, and Carey RM.** Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension* 38: 309-316, 2001.
87. **Karet FE.** Disorders of water and acid-base homeostasis. *Nephron* 118: p28-34, 2011.
88. **Kato M, Blanton R, Wang GR, Judson TJ, Abe Y, Myoishi M, Karas RH, and Mendelsohn ME.** Direct binding and regulation of RhoA protein by cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. *The Journal of biological chemistry* 287: 41342-41351, 2012.
89. **Kavouras SA.** Assessing hydration status. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 5: 519-524, 2002.
90. **Kim JJ, Casteel DE, Huang G, Kwon TH, Ren RK, Zwart P, Headd JJ, Brown NG, Chow DC, Palzkill T, and Kim C.** Co-crystal structures of PKG Ibeta (92-227) with cGMP and cAMP reveal the molecular details of cyclic-nucleotide binding. *PLoS one* 6: e18413, 2011.
91. **Kim N, Cheema-Dhadli S, Hare GM, Chong CK, Halperin ML, Kamel KS, and Mazer CD.** Non-natriuretic doses of furosemide: potential use for decreasing the workload of the renal outer medulla with minimal magnesium wasting in the rat. *Nephron* 122: 7-12, 2013.
92. **Kim SM, Briggs JP, and Schnermann J.** Convergence of major physiological stimuli for renin release on the Gs-alpha/cyclic adenosine monophosphate signaling pathway. *Clinical and experimental nephrology* 16: 17-24, 2012.
93. **Kim SW.** Hyponatremia : successful treatment. *Electrolyte Blood Press* 4: 66-71, 2006.
94. **Kissmehl R, Kruger TP, Treptau T, Froissard M, and Plattner H.** Multigene family encoding 3',5'-cyclic-GMP-dependent protein kinases in Paramecium tetraurelia cells. *Eukaryotic cell* 5: 77-91, 2006.

95. **Klokkers J, Langehanenberg P, Kemper B, Kosmeier S, von Bally G, Riethmuller C, Wunder F, Sindic A, Pavenstadt H, Schlatter E, and Edemir B.** Atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling antagonizes vasopressin-mediated water permeability in inner medullary collecting duct cells. *American journal of physiology* 297: F693-703, 2009.
96. **Kramer BK, Bergler T, Stoelcker B, and Waldegger S.** Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels ClCKA and ClCKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nature clinical practice* 4: 38-46, 2008.
97. **Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, and Gertler FB.** Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 19: 541-564, 2003.
98. **Kriz W, and Bankir L.** A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney international* 33: 1-7, 1988.
99. **Krumenacker JS, Hanafy KA, and Murad F.** Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain research bulletin* 62: 505-515, 2004.
100. **Kuhn M.** Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research* 93: 700-709, 2003.
101. **Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, and Wagner C.** Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *The American journal of physiology* 274: F709-717, 1998.
102. **Kyhse-Andersen J.** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10: 203-209, 1984.
103. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
104. **Levy PD, and Bellou A.** Acute Heart Failure Treatment. *Current emergency and hospital medicine reports* 1: doi: 10.1007/s40138-013-0012-8, 2013.
105. **Li L, Miano JM, Cserjesi P, and Olson EN.** SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circulation research* 78: 188-195, 1996.
106. **Li W, Zhang Y, Bouley R, Chen Y, Matsuzaki T, Nunes P, Hasler U, Brown D, and Lu HA.** Simvastatin enhances aquaporin-2 surface expression and urinary concentration in vasopressin-deficient Brattleboro rats through modulation of Rho GTPase. *American journal of physiology* 301: F309-318, 2011.
107. **Liamis G, Rodenburg EM, Hofman A, Zietse R, Stricker BH, and Hoorn EJ.** Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors. *The American journal of medicine* 126: 256-263, 2013.
108. **Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, and De Jonge HR.** Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences* 22: 307-312, 1997.
109. **Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, and Brownstein MJ.** Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357: 336-339, 1992.
110. **Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, and Busse R.** Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *British journal of pharmacology* 95: 189-196, 1988.
111. **Madsen KM, and Tisher CC.** Structural-functional relationships along the distal nephron. *The American journal of physiology* 250: F1-15, 1986.
112. **Major TC, Handa H, Brisbois EJ, Reynolds MM, Annich GM, Meyerhoff ME, and Bartlett RH.** The mediation of platelet quiescence by NO-releasing polymers via cGMP-induced serine 239 phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Biomaterials* 34: 8086-8096, 2013.
113. **Marunaka Y.** Hormonal and osmotic regulation of NaCl transport in renal distal nephron epithelium. *The Japanese journal of physiology* 47: 499-511, 1997.

114. **McKenna TM, and Haines H.** Sodium metabolism during acclimation to water restriction by wild mice, *Mus musculus*. *The American journal of physiology* 240: R319-326, 1981.
115. **McKinley MJ, Cairns MJ, Denton DA, Egan G, Mathai ML, Uschakov A, Wade JD, Weisinger RS, and Oldfield BJ.** Physiological and pathophysiological influences on thirst. *Physiology & behavior* 81: 795-803, 2004.
116. **Meade P, Hoover RS, Plata C, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G, and Hebert SC.** cAMP-dependent activation of the renal-specific Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking. *American journal of physiology* 284: F1145-1154, 2003.
117. **Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, and Schnermann J.** Renal physiology of the mouse. *American journal of physiology* 278: F339-351, 2000.
118. **Miyata M, Sasaki T, Ikeda Y, Shinsato T, Kubozono T, Furusho Y, Kusumoto A, Hamasaki S, and Tei C.** Comparative study of therapeutic effects of short- and long-acting loop diuretics in outpatients with chronic heart failure (COLD-CHF). *Journal of cardiology* 59: 352-358, 2012.
119. **Molony DA, Reeves WB, Hebert SC, and Andreoli TE.** ADH increases apical Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *The American journal of physiology* 252: F177-187, 1987.
120. **Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jons T, Muller-Esterl W, and Bachmann S.** Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *American journal of physiology* 293: F1166-1177, 2007.
121. **Nakano D, Pollock JS, and Pollock DM.** Renal medullary ETB receptors produce diuresis and natriuresis via NOS1. *American journal of physiology* 294: F1205-1211, 2008.
122. **Nanamori M, Chen J, Du X, and Ye RD.** Regulation of leukocyte degranulation by cGMP-dependent protein kinase and phosphoinositide 3-kinase: potential roles in phosphorylation of target membrane SNARE complex proteins in rat mast cells. *J Immunol* 178: 416-427, 2007.
123. **Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, and Knepper MA.** Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiological reviews* 82: 205-244, 2002.
124. **Noda K, Sasaguri M, Ideishi M, Ikeda M, and Arakawa K.** Role of locally formed angiotensin II and bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs. *Cardiovascular research* 27: 334-340, 1993.
125. **Noda Y, Fukiyama K, Kumamoto K, Takishita S, Eto T, Kawasaki T, and Omae T.** Renin response to furosemide differs with the routes of administration in health men. *Japanese circulation journal* 46: 552-558, 1982.
126. **Obermuller N, Kunchaparty S, Ellison DH, and Bachmann S.** Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *The Journal of clinical investigation* 98: 635-640, 1996.
127. **Oh MS, Uribarri J, Barrido D, Landman E, Choi KC, and Carroll HJ.** Danger of central pontine myelinolysis in hypotonic dehydration and recommendation for treatment. *The American journal of the medical sciences* 298: 41-43, 1989.
128. **Oh SW, and Han SY.** Loop Diuretics in Clinical Practice. *Electrolyte Blood Press* 13: 17-21, 2015.
129. **Ortiz PA.** cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *American journal of physiology* 290: F608-616, 2006.
130. **Ortiz PA, and Garvin JL.** NO Inhibits NaCl absorption by rat thick ascending limb through activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase. *Hypertension* 37: 467-471, 2001.
131. **Ortiz PA, Hong NJ, and Garvin JL.** NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-2Cl<sup>(-)</sup> cotransporter activity. *American journal of physiology* 281: F819-825, 2001.
132. **Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
133. **Patel A, and Smith FG.** Dose-dependent cardiovascular, renal, and endocrine effects of furosemide in conscious lambs. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75: 1101-1107, 1997.

134. **Patel S.** Sodium balance-an integrated physiological model and novel approach. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 20: 560-569, 2009.
135. **Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, and Kohan DE.** Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014.
136. **Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, and Hofmann F.** Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal* 17: 3045-3051, 1998.
137. **Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, and Hofmann F.** Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 135: 105-149, 1999.
138. **Plata C, Meade P, Hall A, Welch RC, Vazquez N, Hebert SC, and Gamba G.** Alternatively spliced isoform of apical Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na(+)-Cl(-)cotransporter. *American journal of physiology* 280: F574-582, 2001.
139. **Plato CF, Pollock DM, and Garvin JL.** Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET(B) receptor-mediated NO release. *American journal of physiology* 279: F326-333, 2000.
140. **Pollak MR, Quaggin SE, Hoening MP, and Dworkin LD.** The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014.
141. **Poulos TL.** Soluble guanylate cyclase. *Current opinion in structural biology* 16: 736-743, 2006.
142. **Ramsay DJ, Rolls BJ, and Wood RJ.** Body fluid changes which influence drinking in the water deprived rat. *The Journal of physiology* 266: 453-469, 1977.
143. **Ramseyer VD, Hong NJ, and Garvin JL.** Tumor necrosis factor alpha decreases nitric oxide synthase type 3 expression primarily via Rho/Rho kinase in the thick ascending limb. *Hypertension* 59: 1145-1150, 2012.
144. **Reyes AJ.** Effects of diuretics on renal excretory function. *European heart journal* 13 Suppl G: 15-21, 1992.
145. **Rieg T, Tang T, Uchida S, Hammond HK, Fenton RA, and Vallon V.** Adenylyl cyclase 6 enhances NKCC2 expression and mediates vasopressin-induced phosphorylation of NKCC2 and NCC. *The American journal of pathology* 182: 96-106, 2013.
146. **Ruisz W, Stollberger C, Finsterer J, and Weidinger F.** Furosemide-induced severe hypokalemia with rhabdomyolysis without cardiac arrest. *BMC women's health* 13: 30, 2013.
147. **Sands JM.** The thick ascending limb and water channels: half-full or half-empty. *American journal of physiology* 303: F619-620, 2012.
148. **Sands JM, and Layton HE.** The physiology of urinary concentration: an update. *Seminars in nephrology* 29: 178-195, 2009.
149. **Schinner E, Schramm A, Kees F, Hofmann F, and Schlossmann J.** The cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha suppresses kidney fibrosis. *Kidney international* 84: 1198-1206, 2013.
150. **Schlatter E, Salomonsson M, Persson AE, and Greger R.** Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na+2Cl-K+ cotransport. *Pflugers Arch* 414: 286-290, 1989.
151. **Schnermann J, Ploth DW, and Hermle M.** Activation of tubulo-glomerular feedback by chloride transport. *Pflugers Arch* 362: 229-240, 1976.
152. **Schrier RW, Berl T, and Anderson RJ.** Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *The American journal of physiology* 236: F321-332, 1979.
153. **Serafini-Cessi F, Malagolini N, and Cavallone D.** Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 42: 658-676, 2003.
154. **Shankar SS, and Brater DC.** Loop diuretics: from the Na-K-2Cl transporter to clinical use. *American journal of physiology* 284: F11-21, 2003.
155. **Skinner SL, McCubbin JW, and Page IH.** Control of Renin Secretion. *Circulation research* 15: 64-76, 1964.

156. **Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, and Parmacek MS.** Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *The Journal of biological chemistry* 270: 13460-13469, 1995.
157. **Sonnenburg WK, and Beavo JA.** Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif* 26: 87-114, 1994.
158. **Stachenfeld NS, DiPietro L, Nadel ER, and Mack GW.** Mechanism of attenuated thirst in aging: role of central volume receptors. *The American journal of physiology* 272: R148-157, 1997.
159. **Stanhewicz AE, and Larry Kenney W.** Determinants of water and sodium intake and output. *Nutrition reviews* 73 Suppl 2: 73-82, 2015.
160. **Surks HK, and Mendelsohn ME.** Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1alpha and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cellular signalling* 15: 937-944, 2003.
161. **Swaminathan S.** Osmoreceptors or sodium receptors: an investigation into ADH release in the rhesus monkey. *The Journal of physiology* 307: 71-83, 1980.
162. **Terada Y, Moriyama T, Martin BM, Knepper MA, and Garcia-Perez A.** RT-PCR microlocalization of mRNA for guanylyl cyclase-coupled ANF receptor in rat kidney. *The American journal of physiology* 261: F1080-1087, 1991.
163. **Thornton SN.** Thirst and hydration: physiology and consequences of dysfunction. *Physiology & behavior* 100: 15-21, 2010.
164. **Titze J.** Water-free sodium accumulation. *Seminars in dialysis* 22: 253-255, 2009.
165. **Uechi M, Matsuoka M, Kuwajima E, Kaneko T, Yamashita K, Fukushima U, and Ishikawa Y.** The effects of the loop diuretics furosemide and torasemide on diuresis in dogs and cats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 65: 1057-1061, 2003.
166. **Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, and de Jonge HR.** N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *The Journal of biological chemistry* 271: 7025-7029, 1996.
167. **Veeraveedu PT, Watanabe K, Ma M, Thandavarayan RA, Palaniyandi SS, Yamaguchi K, Suzuki K, Kodama M, and Aizawa Y.** Comparative effects of torasemide and furosemide in rats with heart failure. *Biochemical pharmacology* 75: 649-659, 2008.
168. **Vitzthum H, Castrop H, Meier-Meitinger M, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK, and Wolf K.** Nephron specific regulation of chloride channel CLC-K2 mRNA in the rat. *Kidney international* 61: 547-554, 2002.
169. **von Dossow V, Spies C, Schenk H, Schlesinger S, and von Heymann C.** Secondary pulmonary hypertension: haemodynamic effects of torasemide versus furosemide. *Clinical drug investigation* 28: 17-26, 2008.
170. **Wada F, Sagawa S, Miki K, Nagaya K, Nakamitsu S, Shiraki K, and Greenleaf JE.** Mechanism of thirst attenuation during head-out water immersion in men. *The American journal of physiology* 268: R583-589, 1995.
171. **Wagner C, and Kurtz A.** Regulation of renal renin release. *Current opinion in nephrology and hypertension* 7: 437-441, 1998.
172. **Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, and Illenberger S.** The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS letters* 529: 275-280, 2002.
173. **Waldman SA, and Murad F.** Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *Journal of cardiovascular pharmacology* 12 Suppl 5: S115-118, 1988.
174. **Wang WH, and Giebisch G.** Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch* 458: 157-168, 2009.
175. **Weber S, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P, Worner R, Wegener JW, Valtcheva N, Feil S, Schlossmann J, Hofmann F, and Feil R.** Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circulation research* 101: 1096-1103, 2007.
176. **Weinstein AM, and Krahn TA.** A mathematical model of rat ascending Henle limb. II. Epithelial function. *American journal of physiology* 298: F525-542, 1998.

177. **Weitzman RE, and Kleeman CR.** The clinical physiology of water metabolism. Part I: The physiologic regulation of arginine vasopressin secretion and thirst. *The Western journal of medicine* 131: 373-400, 1979.
178. **Weitzman RE, and Kleeman CR.** The clinical physiology of water metabolism. Part II: Renal mechanisms for urinary concentration; diabetes insipidus. *The Western journal of medicine* 131: 486-515, 1979.
179. **Weitzman RE, and Kleeman CR.** The clinical physiology of water metabolism. Part III: The water depletion (hyperosmolar) and water excess (hyposmolar) syndromes. *The Western journal of medicine* 132: 16-38, 1980.
180. **Wernet W, Flockerzi V, and Hofmann F.** The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS letters* 251: 191-196, 1989.
181. **Wiemer G, Fink E, Linz W, Hropot M, Scholkens BE, and Wohlfart P.** Furosemide enhances the release of endothelial kinins, nitric oxide and prostacyclin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271: 1611-1615, 1994.
182. **Yokoyama CT, Sheng ZH, and Catterall WA.** Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci* 17: 6929-6938, 1997.
183. **Zdolsek J, Li Y, and Hahn RG.** Detection of dehydration by using volume kinetics. *Anesthesia and analgesia* 115: 814-822, 2012.

#### Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen:

##### Publikationen

**Limmer F, Schinner E, Castrop H, Vitzthum H, Hofmann F, and Schlossmann J.** Regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter by cGMP/cGMP-dependent protein kinase I after furosemide administration. *The FEBS journal* 2015. 2015 Oct; 282(19):3786-98. doi: 10.1111/febs.13376. Epub 2015 Jul 30.

##### Poster

Diverse Poster-Beiträge auf Kongressen (Summer School „Medical Chemistry“; International Symposium Molecular Targets in Renal Disease)

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro 10 <sup>-6</sup>
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym, Angiotensin-Converting-Enzyme
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid, atrial natriuretic peptide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BA	Bisacrylamid
BNP	brain-type natriuretic peptide
bp	base pair, Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSC	bumetanide-sensitive sodium-(potassium)-chloride cotransporter 2
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cc	coiled-coil
CCC	cation-chloride-cotransporter
CFTR	zystische Fibrose Transmembran Leitfähigkeitsregulator
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase, cG-Kinase
cGK1α bzw. cGK1β	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ 1α bzw. Typ 1β
cGK1c	cGK1 common
cGMP	Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNG	cyclic nucleotide gated
CNP	C-type natriuretic peptide
cTAL	corticaler dicker aufsteigender Ast
CTEPH	chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie
D	Deutschland
DAG	Diacylglycerol
dDAVP	Deamino-Cys-D-Arg vasopressin
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylcarbonat-Wasser, Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET <sub>B</sub> -Rezeptor	Endothlin Rezeptor Typ B
EtOH	Ethanol
EVH	Ena (enabled)/VASP homology domain
F	forward; Frankreich
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante

GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GKAP	G-Kinase Anker Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
GTPase	GTP-hydrolysierendes Enzym
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKT	Hämatokrit
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IH	Immunhistochemie
IMCD	inner medullary collecting duct
i. p.	intraperitoneal
IP	Immunpräzipitation
ISMN	Isosorbidmononitrat
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
k	kilo 10 <sup>3</sup>
KCC	Na <sup>+</sup> - unabhängiger K <sup>+</sup> - Cl <sup>-</sup> Cotransporter
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
Ktrl.	Kontrolle
KO	knockout
l	Liter
L-NAME	N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli 10 <sup>-3</sup> bzw. Meter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MQ-H <sub>2</sub> O	Milli-Q-Wasser, Reinstwasser; Verwendung einer Arium Anlage von Sartorius
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTAL	medullärer dicker aufsteigender Ast
Munc 18	mammalian uncoordinated 18
n	Nano 10 <sup>-9</sup>
N	Anzahl
NANC-Neurone	Nicht-adrenerge, nicht-cholinerge-Neurone
NCC	K <sup>+</sup> - unabhängiger Na <sup>+</sup> - Cl <sup>-</sup> -Cotransporter
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
ng	Nanogramm
NKCC	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OMCD	outer medullary collecting duct
p	Piko 10 <sup>-12</sup>
p	p-Wert; Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerasechainreaction

PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
pH	pH-Wert
PI	Proteaseinhibitor
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNKCC2	phosphorylierter NKCC2
PPI	Proteinphosphataseinhibitor
ppm	Parts per million
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	reverse
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RGS	regulator of G-Protein signalling
Rho	Ras homolog gene family
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RNase	RNA hydrolysierendes Enzym
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
ROCK	Rho-assoziierte coiled-coil Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute / rotations per minutes
RPP	renal perfusion pressure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
sGC	soluble Guanylatcyclase/lösliche Guanylatzyklase
SM	smooth muscle, Glattmuskel
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SORLA	Sorting-related receptor with A-type repeats
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Src	auch c-Src, Zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma
Sta	heat-stable enterotoxin of E. coli
SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAL	thick ascending limb, dicker aufsteigender Ast
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
THP	Tamm-Horsfall-Protein, Uromodulin
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tNKCC2	totaler NKCC2
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultraviolet
V	Volt
VAMP	Vesikel-assoziierte Membranproteine
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
vgl.	vergleiche
VSMC	Vascular smooth muscle cell; glatte Gefäßmuskelzelle

WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
YC1	[3-(5'-hydroxymethyl-2'furyl)-1-benzyl Imidazol]
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium

## 7.2 Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abb. 1: NO/cGMP-Bildungs- und Signaltransduktionsweg.....	10
Abb. 2: Struktur (schematisch) der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	11
Abb. 3.: Übersicht über ein Nephron (oben) und Struktur des Glomerulus mit juxtaglomerulärem Apparat (unten).....	17
Abb. 4: Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife und seine Transporter.....	21
Abb. 5: Bestimmung der Zunahme der Phosphorylierung.....	31
Abb. 6: Stoffwechsellkäfig.....	32
Abb. 7: Immuncytochemische Aufnahmen von MKTAL-Zellen.....	50-51
Abb. 8: Prozentualer Anteil an Zellen, die pNKCC2 in der Membran aufweisen.....	52
Abb. 9: Expression von cGKI mRNA im TAL.....	53
Abb. 10: Renale Parameter bei Furosemid-Gabe.....	55
Abb. 11: Plasma Renin Konzentration und Vasopressin Menge im Urin.....	56
Abb. 12: Analyse des cGMP-Gehalts im Urin und im Nierengewebe.....	58
Abb. 13: Serumanalyse nach Furosemid-Gabe.....	59
Abb. 14: Zunahme der Phosphorylierung von NKCC2 innerhalb von 120 min nach Furosemid Injektion.....	60
Abb. 15: Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 bei Furosemid-Gabe.....	61
Abb. 16: Analyse der Phosphorylierung von NKCC2 durch Membranpräparation.....	62
Abb. 17: Immunhistochemische Analyse der renalen pNKCC2 Expression.....	64

Abb. 18: Immunhistochemische Analyse der Membranverteilung von pNKCC2.....	65
Abb. 19: Zunahme der Phosphorylierung von VASP.....	66
Abb. 20: Urinuntersuchung nach Gabe von YC1.....	67
Abb. 21: Urinuntersuchung nach kombinierter Gabe von YC1 und Furosemid.....	69
Abb. 22: Futteraufnahme unter Wasserentzug und Kontrollbedingungen.....	71
Abb. 23: Wasseraufnahme bei ad libitum Zugang zu Wasser und Standardfutter.....	72
Abb. 24: Urinvolumen bei Wasserentzug.....	74
Abb. 25: Renale Na <sup>+</sup> -Exkretion.....	75
Abb. 26: Renale K <sup>+</sup> -Exkretion.....	76
Abb. 27: Renale Cl <sup>-</sup> -Exkretion.....	77
Abb. 28: Urinosmolalität.....	78
Abb. 29: Analyse des cGMP-Gehalts im Urin.....	79
Abb. 30: Serum Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Konzentration, Serumosmolalität und Hämatokrit.....	80
Abb. 31: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen, über die NO/cGMP die Regulation von NKCC2 beeinflussen könnte.....	90

## **Tabellen**

Tab. 1: Puffer und Lösungen.....	26
Tab. 2: Liste der verwendeten Antikörper: WB = Western-Blot; IH = Immunhistochemie.....	27
Tab. 3: Adsorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz-Farbstoffe.....	28
Tab. 4: Verdünnungen von Urin bzw. Serum für Flammenphotometer.....	34
Tab. 5: Mastermix für reverse Transkription.....	42
Tab. 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (jeweils für vier Gele).....	46
Tab. 7: Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Konzentration im Serum.....	59

Tab. 8: Urinvolumina, Natrium- und Kalium-Exkretion der unbehandelten (Ktrl.) und mit YC1 behandelten Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse.....	68
Tab. 9: Urinvolumina, Natrium- und Kalium-Exkretion der mit Furosemid und mit YC1_Furosemid behandelten Wildtyp- und cGKI $\alpha$ -rescue-Mäuse.....	70
Tab. 10: Futteraufnahme.....	72
Tab. 11: Wasseraufnahme.....	73
Tab. 12: Urinvolumen bei Wasserentzug.....	74
Tab. 13: Renale Na <sup>+</sup> -Exkretion.....	75
Tab. 14: Renale K <sup>+</sup> -Exkretion.....	76
Tab. 15: Renale Cl <sup>-</sup> -Exkretion.....	77
Tab. 16: Urinosmolalität.....	78
Tab. 17: Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Konzentration im Serum.....	81

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei allen Personen, die freundlicherweise ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Schlossmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Bereitstellung der Mittel und die hervorragende Betreuung. Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Kees für seine guten Ratschläge und tatkräftige Unterstützung bedanken. Herrn Prof. Dr. Castrop und Frau Dr. Vitzthum gilt mein Dank für die Bereitstellung der TALs. Herr Prof. Dr. Castrop stellte uns zudem freundlicherweise das Renin-Substrat zur Verfügung.

Astrid Seefeld, Gertraud Wilberg und Katharina Wohlfart waren von Anfang bis Ende meiner Doktorandenzeit stets eine große Hilfe und haben mit viel Geduld und Hingabe die verschiedensten Aufgaben erfüllt. Nicht zuletzt aufgrund Ihrer guten Laune war es immer wieder schön mit Ihnen zusammenzuarbeiten. Vielen lieben Dank an unsere gute „Seele“ Rita Prenzyna und ihre würdige Nachfolgerin Martina Wechler. Meine Kollegen Andrea, Johannes, Julia, Lisa, Stefanie und Veronika haben immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt, wofür ich sehr dankbar bin. Besonders bei meiner Bürogefährtin Julia möchte ich mich herzlich bedanken. Mit ihr ist es nie langweilig gewesen und ich konnte viel mit ihr lachen.

Vielen lieben Dank an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mir während meiner Doktorandenzeit immer beigestanden haben. Meine Schwester Beate, ihr Mann Michael und der kleine Noah haben in der letzten Phase immer wieder für Ablenkung gesorgt.

Mein größter Dank gebührt Lisa (Dr. Elisabeth Schinner). Sie stand mir nicht nur fachlich mit Rat und Tat zur Seite, sondern hat mich auch moralisch immer unterstützt und hatte stets ein offenes Ohr für mich. Ohne sie und ihr unermüdliches Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

#### 7.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, 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 des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten 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.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)