

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Untersuchungen zur Expression und Regulation des niedermolekularen
Hitzeschockproteins α B-Crystallin in der Niere
in vivo und in vitro**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marlies Michl

aus

Dachau

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. W. Neuhofer

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. Michael Schleicher
Prof. Dr. Walter Samtleben

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2008

**Gewidmet
meinen Eltern und
meiner Schwester Theresa**

1.	Einleitung	1
1.1	Funktion der Niere im menschlichen Körper.....	1
1.2	Auswirkungen des Diuresezustands auf die interstitielle Osmolalität	
	im Nierenmark	4
1.3	Anpassungsmechanismen der Zellen des Nierenmarks an die extremen	
	Umgebungsbedingungen im Nierenmark	5
1.4	Hitzeschockproteine.....	6
1.5	Molekulare Chaperone.....	10
1.6	α B-Crystallin als kleines Hitzeschockprotein und molekulares Chaperone	12
1.7	Ziele der vorliegenden Arbeit	15
2.	Material und Methoden.....	16
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	16
2.1.1	Methodik	16
2.1.2	Präparation des Nierengewebes	16
2.2	Zellkultur.....	16
2.2.1	Medien und Lösungen.....	16
2.2.2	MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zellen	17
2.2.3	Steriltechnik	18
2.2.4	Kultivierung und Behandlung der Zellen	18
2.2.5	Inkubation der Zellen in hypertonomem Medium	19
2.2.5.1	Behandlung mit NaCl	19
2.2.5.2	Behandlung mit Harnstoff.....	19
2.2.5.3	Behandlung mit Raffinose	19
2.3	Northern Blot Analyse	20
2.3.1	Lösungen und Puffer.....	20
2.3.2	RNA-Isolierung.....	23
2.3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	23
2.3.4	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.5	„Blotting“	24
2.3.6	Hybridisierung	25
2.3.7	Immunodetektion	26
2.3.8	„Stripping“ der Membran	26

2.4	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelektrophorese (SDS-PAGE)	27
	und Western Blot Analyse	27
2.4.1	Lösungen und Puffer.....	27
2.4.1.1	SDS-PAGE	27
2.4.1.2	Western Blot Analyse	28
2.4.2	Antikörper	29
2.4.3	Herstellung von Lysaten aus Gewebeproben und kultivierten Zellen	29
2.4.3.1	Gewebeproben	29
2.4.3.2	MDCK-Zellen	30
2.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	30
2.4.5	SDS-PAGE	31
2.4.6	„Blotting“	32
2.4.7	Immunodetektion	32
2.4.8	„Stripping“ der Membran	34
2.4.9	Semiquantitative Western Blot Analyse	35
2.5	Immunhistologischer Nachweis von α B-Crystallin in der Rattenniere	35
2.5.1	Lösungen und Puffer.....	35
2.5.2	Antikörper	36
2.5.3	Aufbereitung der Gewebeproben	36
2.5.4	Methodik der Immunhistologie.....	36
2.6	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von α B-Crystallin und	37
	Zytokeratin in MDCK-Zellen	37
2.6.1	Lösungen und Puffer.....	37
2.6.2	Antikörper	37
2.6.3	Methodik der Immunfluoreszenz.....	37
2.6.4	Konfokale Lasermikroskopie und Datenaquisition	38
2.7	Sonstige Materialien und Geräte.....	39
2.8	Statistische Auswertung und Präsentation der Daten	40
3.	Ergebnisse	42
3.1	Intrarenale Verteilung von α B-Crystallin in Kortex, Außen- und Innenmark	42
	der normalen Rattenniere	42
3.1.1	Expression auf mRNA-Ebene.....	42
3.1.2	Semiquantitativer Nachweis auf Proteinebene	43

3.1.3	Immunhistologischer Nachweis in der Rattenniere	44
3.2	Intrarenale α B-Crystallin mRNA Expression in der Rattenniere in	
	Abhängigkeit vom Diuresezustand.....	46
3.3	Induktion von α B-Crystallin und Hsp72 durch NaCl, Harnstoff und	
	Raffinose in MDCK-Zellen	48
3.3.1	Induktion auf mRNA-Ebene	48
3.3.2	Induktion auf Proteinebene	50
3.4	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von α B-Crystallin und	
	Zytokeratin in MDCK-Zellen	52
3.4.1	Intrazelluläre Verteilung von α B-Crystallin	52
3.4.2	α B-Crystallin nach Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff	54
3.4.3	Zytokeratin nach Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff.....	54
3.4.4	Untersuchungen zur Co-Lokalisation von α B-Crystallin und	
	Zytokeratin bei hypertonomem Stress in MDCK-Zellen.....	57
3.5	Effekt von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die NaCl-induzierte	
	α B-Crystallin mRNA-Expression in MDCK-Zellen	59
4.	Diskussion.....	61
4.1	Anpassung der Nierenmarkszellen an die „unwirtlichen Umgebungs-	
	bedingungen“ durch die vermehrte Expression von Hsps	61
4.2	α B-Crystallin in der Niere.....	63
4.3	Regulation der α B-Crystallin Expression in der Niere	64
4.3.1	Einfluss von MAP-Kinasen	66
4.3.2	Einfluss von Veränderungen des Zytoskeletts.....	67
4.5	Abschließende Bemerkung	69
5.	Zusammenfassung.....	70
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	89
	Lebenslauf.....	92

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Wolfgang Neuhöfer herzlich für die Überlassung des Themas bedanken. Er ermöglichte diese Dissertation und trieb sie mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung voran. Er hatte stets ein offenes Ohr für anfallende Probleme und regte fruchtbare Diskussionen an, die diese Arbeit verwirklichen ließen.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Franz-Xaver Beck, Frau Maria-Luisa Fraek, Herrn Professor Dr. med. H. Bartels und Mitarbeitern, Herrn Nengtai Ouyang MD und Herrn Dr. med. Cornelius Holzapfl für die Anregungen, die lehrreichen Gespräche, die Bereitstellung von Materialien und die Hilfestellung bei den Methoden.

Größter Dank gebührt meinen Eltern, die mich während meines Studiums stets unterstützten und förderten, meiner Schwester und meinen Freunden, deren moralischer Beistand mir in schweren Zeiten Kraft gaben und meine Motivation aufrecht erhielten.

1. Einleitung

1.1 Funktion der Niere im menschlichen Körper

Die Niere übernimmt im Organismus viele wichtige Aufgaben. Als zentrales Regulationsorgan des Wasser- und Elektrolythaushalts sorgt sie für die Konstanthaltung des inneren Milieus, der Homöostase. Neben der Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen (v.a. Kreatinin und Harnstoff) ist sie für die Aufrechterhaltung des Ionen- bzw. Elektrolytgleichgewichts (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-) und die Regulation des Säure-Base-Haushalts verantwortlich. Eine weitere wichtige Funktion stellt die Regulation des extrazellulären Volumens dar. Dies geschieht über hormonelle und nervale Stimuli, renale Autoregulationsmechanismen sowie aktive und passive Transportmechanismen in der Niere, die u.a. die Harnkonzentrierung beeinflussen. Im Rahmen der Harnproduktion passiert das Blut zwei aufeinander folgende Kapillarsysteme. Zunächst wird in den Glomerulus-Kapillaren, einem Hochdruck-Kapillarsystem, das Plasma ultrafiltriert und der Primärharn entsteht. In einem zweiten Schritt erfolgt die schrittweise Rückresorption von Wasser, Elektrolyten und weiteren Substanzen aus dem Tubulussystem in die postglomerulären Kapillaren. Diese stellen ein Niederdruck-Kapillarsystem dar, das sich aus peritubulären Kapillaren und Vasa recta zusammensetzt. Dabei werden während der Passage durch die proximalen Tubuli aus dem Primärharn große Mengen an Elektrolyten, Harnstoff, Zucker (zu nahezu 100%), Aminosäuren (zu 100%) und andere Substanzen isoosmolar rückresorbiert. Anschließend finden in den medullären Anteilen der Henle-Schleifen, in den distalen Tubuli und in den Sammelrohren die Feineinstellung der Elektrolyt- und Wasserrückresorption und die Harnkonzentrierung statt. In den dicken aufsteigenden Henle-Schleifen werden aufgrund der geringen Wanddurchlässigkeit für Wasser relativ mehr Elektrolyte, insbesondere NaCl resorbiert und ein zum Plasma hypoosmolarer Harn erreicht das distale Konvolut. Hier und in den Sammelrohren kann aufgrund der steigerbaren Permeabilität für Wasser unter dem Einfluss von antidiuretischem Hormon (ADH) relativ mehr Wasser als Elektrolyte rückresorbiert werden. Die Flüssigkeit im Interstitium des Nierenmarks ist hyperton und durch einen hohen Natrium- und Harnstoffgehalt gekennzeichnet. Folglich resultiert eine Diffusion von Wasser entlang des osmotischen Druckgradienten aus dem Tubuluslumen ins Interstitium. Der osmotische Gradient stellt den Motor für die Diffusion von Wasser ins Nierenmark und somit für die Herstellung eines osmotischen Gleichgewichts zwischen dem

Urin in den ADH-empfindlichen Tubulsabschnitten und dem Interstitium dar (s. Abb. 1). Dieser Prozess dient der Wasserrückresorption und Harnkonzentrierung.

Die Niere kann, in Abhängigkeit des körperlichen Hydratationsstatus, einen unterschiedlich konzentrierten Harn produzieren und somit die Osmolalität des Extrazellulärtraums im physiologischen Bereich halten. Die Grundlage dafür stellt das Gegenstrom-Multiplikationsprinzip dar, ein funktionelles System aus medullären Nephronsegmenten und Vasa recta (Gottschalk and Mylle, 1959; Gottschalk and Mylle, 1997; Hargitay et al., 1951; Jamison et al., 1967; Tauck, 2006). Es basiert auf der variablen Durchlässigkeit bestimmter Nephronabschnitte für Wasser, Ionen und Harnstoff, auf der Möglichkeit der regulierbaren Wasserrückresorption über Aquaporine in ADH-empfindlichen Nephronabschnitten, auf dem aktiven Transport von Natrium und der Diffusion von Harnstoff ins Interstitium des Nierenmarks (Fenton and Knepper, 2007; Imai et al., 1988; Layton et al., 2004; Marsh, 1970; Pallone et al., 2003; Sands and Layton, 2000).

Aufgrund der Regulierbarkeit der interstitiellen Osmolalität im Nierenmark kommt es zum Aufbau eines osmotischen Gradienten entlang der kortikomedullären Achse und zur Ausscheidung eines Endharns, der in Abhängigkeit von der Flüssigkeitszufuhr hypo-, normo- oder hyperosmolar ist. So kann die Niere auf Wassermangel bzw. -überschuss reagieren. Durch den Aufbau hoher bzw. niedriger interstitieller Osmolalitäten wird viel bzw. wenig Wasser rückresorbiert und entsprechend ein hyperosmolarer bzw. hypoosmolarer Harn produziert. Die Osmolalität im Niereninterstitium kann dabei von 300 mosm/kg H₂O bei starkem Wasserüberangebot bis zu 1200 mosm/kg H₂O bei starkem Wasserbedarf schwanken (Beck et al., 1992; Jamison, 1982). Die Harnosmolalität verhält sich aufgrund des oben beschriebenen osmotischen Gleichgewichts ähnlich der Osmolalität im Niereninterstitium. Diese kann bei maximaler Diurese bis auf 50 mosm/kg H₂O abfallen und bei maximaler Antidiurese bis auf Werte von 1200–1400 mosm/kg H₂O ansteigen (Atherton et al., 1968; Beck et al., 1984; Beck et al., 1992; Jamison, 1982). Die beschriebenen Osmolalitätsschwankungen bei der Harnkonzentrierung, v.a. aber die stark hypertonen Umgebungsosmolalitäten in Antidiurese, stellen für die Zellen im Innenmark der Niere eine extreme Stresssituation dar, welche die Zellintegrität potenziell beeinträchtigt. Daher benötigen die Zellen der Nierenpapille protektive Mechanismen, um unter den extrem hohen und stark schwankenden Osmolalitäten des Extrazellulärtraums überleben zu können.

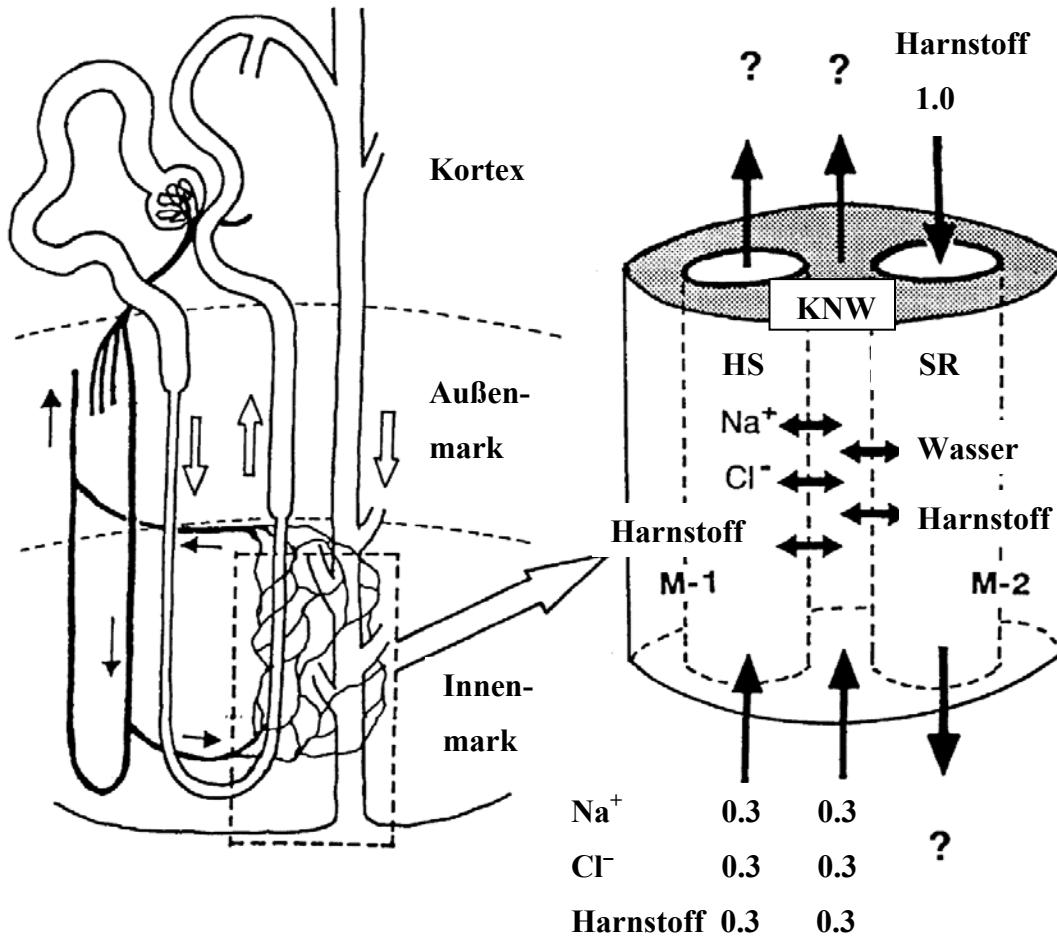


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gegenstromprinzips zwischen aufsteigendem Schenkel der Henle-Schleife und Sammelrohr im Nierenmark.

Linke Abb.: Darstellung der Nierenzonen (Kortex, Außen- und Innenmark) und der Anordnung von Henle-Schleife, Sammelrohr, Vasa recta und Kapillarnetz im Innenmark mit Flussrichtung von Urin (offene Pfeile) und Blut (schwarze Pfeile). Rechte Abb.: Vergrößerte Darstellung des „Drei-Kompartiment-Modells“ im Innenmark mit dünnem aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (HS), Kapillarnetz (KNW) und Sammelrohr (SR). Die Pfeile zeigen die Flussrichtung von Urin (\uparrow bzw. \downarrow) und den transmuralen Transport von Elektrolyten (Na^+ , Cl^-), Harnstoff und Wasser an (\leftrightarrow). M-1: Wand zwischen HS und KNW; M-2: Wand zwischen SR und KNW (Hamada et al., 1992).

1.2 Auswirkungen des Diuresezustands auf die interstitielle Osmolalität im Nierenmark

Den Hauptanteil aller gelösten, osmotisch aktiven Teilchen im Interstitium des Nierenmarks stellen Natrium und Harnstoff dar. Natrium ist das anteilmäßig am reichlichsten im extrazellulären Raum vorhandene Elektrolyt und ist für knapp die Hälfte des gesamten osmotischen Druckes im Extrazellulärtraum verantwortlich. Daher wird das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen maßgeblich durch den Gesamtgehalt von Natrium(-chlorid) bestimmt. Im Innenmark der Niere kann Harnstoff, der aus den Sammelrohren ins Interstitium des Nierenmarks resorbiert wird, zur hohen interstitiellen Osmolalität beitragen (Valtin, 1966). Andere Untersuchungen weisen auf eine Förderung der interstitiellen NaCl-Akkumulation durch Laktat in Antidiurese hin (Hervy and Thomas, 2003).

Die renale Ausscheidung oder Retention von Natrium und Wasser zielt darauf ab, starke Osmolalitätsschwankungen und konsekutive Volumenverschiebungen in den Körperzellen zu vermeiden. Um jedoch diese isoosmolalen (ca. 280–310 mosm/kg H₂O), für die Körperzellen adäquaten Umgebungsbedingungen gewährleisten zu können, ist zur Ausscheidung eines unterschiedlich konzentrierten Harns durch die Niere das in 1.1 beschriebene Gegenstromprinzip zwingend erforderlich. Dadurch sind die Nierenmarkszellen zwangsläufig unterschiedlich hohen Umgebungsosmolalitäten ausgesetzt.

Mit dem Diuresezustand ändert sich die interstitielle Osmolalität im Nierenmark (Ruiz-Guinazu et al., 1964). So kann es beim Übergang von Diurese zu Antidiurese zu einer raschen Änderung der interstitiellen Osmolalität im Nierenmark der menschlichen Niere kommen, die im Extremfall von 300 mosm/kg H₂O auf 1200 mosm/kg H₂O ansteigen kann.

Da zelluläre Membranen gut wasserpermeabel, jedoch nur in geringem Maße permeabel für gelöste Teilchen sind, werden Änderungen der interstitiellen Osmolalität zunächst durch schnelle, transmembranöse Wasserströme ausgeglichen. Es kommt somit initial zu Änderungen des Zellvolumens (Imai et al., 1988). Durch Volumenverschiebungen aus der Zelle in das Interstitium und vice versa resultiert bei hypertoner Umgebungsosmolalität (in Antidiurese) eine Zellschrumpfung und bei hypotoner (in Diurese) eine Zellschwellung (Grunewald et al., 1993; Grunewald et al., 1994). Die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen des Organismus hängt jedoch entscheidend von der Regulation des Gehalts an gelösten Teilchen in den verschiedenen Körperzellen ab. Besonders eine Zellschrumpfung wirkt sich nachteilig auf die Zellfunktion aus, da sich die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen ändert, sich der Gasaustausch verschlechtert und die Konzentration von allen intrazellulär

gelösten Teilchen v.a von anorganischen Elektrolyten, ansteigt (Beck et al., 1998; Garcia-Perez and Burg, 1991; Haussinger, 1996). Es kommt zu DNA-Doppelstrangbrüchen (Hizoh et al., 1998; Kultz and Chakravarty, 2001), Störungen des Zellzyklus (Michea et al., 2000) und Verminderung der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase Aktivität (Sakuma et al., 2005; Takayama et al., 1999). Alle genannten Situationen können die Apoptose induzieren und zum Zelluntergang führen.

Anders als bei hohen NaCl-Konzentrationen resultiert bei ansteigender interstitieller Harnstoffkonzentration kaum eine Veränderung des Zellvolumens, da Harnstoff die Zellmembran entlang des Konzentrationsgradienten relativ ungehindert passiert (Imai et al., 1988). Allerdings wirkt Harnstoff in höheren Konzentrationen destabilisierend bzw. denaturierend auf intrazelluläre Proteine (Somero, 1986; Somero GN, 1997; Yancey et al., 1982). Dadurch wird die Aktivität vieler intrazellulärer Polypeptide wie z.B. die von Enzymen vermindert (Burg et al., 1996; Neuhofer et al., 2002b) und bei Zellen ohne adäquate Schutz- oder Reparaturfunktion wird die Apoptose eingeleitet (Michea et al., 2000; Neuhofer et al., 1999a).

Neben erhöhten NaCl- und Harnstoffkonzentrationen finden sich im Nierenmark in Antidiurese zusätzlich erniedrigte Sauerstoff- und erhöhte Kohlendioxid-Partialdrücke, niedrige pH-Werte (Kuramochi et al., 1996) und hohe Konzentrationen von Ammonium-Ionen (Beck et al., 1998; Burg, 1994; Burg, 1995; Garcia-Perez and Burg, 1991; Neuhofer et al., 2005b; Somero GN, 1997). Diese stellen weitere Stressfaktoren dar, die auf die Nierenmarkszellen potenziell nachteilige Effekte ausüben.

1.3 Anpassungsmechanismen der Zellen des Nierenmarks an die extremen Umgebungsbedingungen im Nierenmark

Um den potenziell schädlichen Umgebungsbedingungen in Antidiurese, v.a. den hohen Konzentrationen von NaCl und Harnstoff entgegen zu wirken, weisen Nierenmarkszellen verschiedene Schutz- bzw. Anpassungsmechanismen auf (Zusammenfassung in Neuhofer and Beck, 2005). Zum einen wird der Gehalt an kleinen, organischen, osmotisch wirksamen Molekülen, sog. kompatiblen organischen Osmolyten (die Polyalkohole Sorbitol und myo-Inositol, die Trimethylamine Glycerophosphorylcholin und Betain, Taurin und andere Aminosäuren) im Intrazellulärraum erhöht (Burg et al., 1997; Neuhofer et al., 2005b). Diese

akkumulieren in Abhängigkeit vom Diuresezustand im Wesentlichen durch Aufnahme aus dem Extrazellulärraum (myo-Inositol, Betain, Taurin, Aminosäuren; Pummer et al., 2000; Silbernagl et al., 2003; Silbernagl et al., 1997) sowie durch intrazelluläre Synthese (Sorbitol, Glycerophosphorylcholin; Burg, 1994; Burg, 1996). Durch diesen Mechanismus wird ein osmotisches Gleichgewicht mit dem Extrazellularraum hergestellt (Somero GN, 1997), und der Gehalt an anorganischen Elektrolyten in der Zelle kann vermindert werden (Neuhöfer et al., 2002a). Des Weiteren üben einige Osmolyte einen protektiven Effekt gegenüber dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff auf intrazelluläre Proteine aus (Burg, 1996; Yancey and Burg, 1990). Da organische Osmolyte im Gegensatz zu NaCl und KCl im Zellinneren in sehr hohen Konzentrationen vorliegen können ohne die Zellstruktur oder -funktion nachteilig zu beeinflussen, wirkt sich dies protektiv auf das Zellüberleben aus (Somero, 1986; Yancey et al., 1982; Yancey and Somero, 1979).

Einen weiteren Schutzmechanismus der Nierenmarkszellen gegenüber Stressfaktoren stellt die vermehrte Expression von Hitzechockproteinen (Hsps, s. 1.4) dar. In-vivo- und in-vitro-Untersuchungen zeigen, dass erhöhte NaCl- und Harnstoffkonzentrationen im Nierenmark die Expression von Hsps in renalen Sammelrohrzellen induzieren und sich dies protektiv auf die Zellen auswirkt (Neuhöfer et al., 2002b; Neuhöfer et al., 2005a; Neuhöfer et al., 2001; Neuhöfer et al., 1998; Neuhöfer et al., 1999b). Eine Reihe von Hsps wurde bereits in verschiedenen Nierenzonen nachgewiesen (Müller et al., 1996), so auch das kleine Hsp α B-Crystallin (Smoyer et al., 2000).

1.4 Hitzechockproteine

Ritossa beobachtete 1962, dass nach der Exposition gegenüber erhöhten Temperaturen in Speicheldrüsenzellen von Drosophila-Larven neue Chromosomenauftreibungen, sog. „puffs“ auftraten (Ritossa, 1962). Kurz zuvor war bekannt geworden, dass „puffs“ die transkriptionale Aktivität spezifischer Gene repräsentieren, von denen RNA abgelesen wird und die für eine Gruppe bestimmter Proteine kodieren. 1974 zeigte Tissieres, dass die Expression dieser Proteine durch thermischen Stress (Hitzechock) induziert wird (Ashburner and Bonner, 1979; Tissieres et al., 1974) und bezeichnete sie als „Hitzechockproteine“.

Weitere Studien ergaben, dass eine Vorbehandlung von Zellen mit hohen, aber nicht letalen Temperaturen diese transient tolerant gegenüber einer weiteren stärkeren, potenziell tödlichen Hitzechockbehandlung machte (Lindquist and Craig, 1988; Mizzen and Welch, 1988; Welch

and Mizzen, 1988). Diese erworbene Thermotoleranz war auf die vermehrte Expression von Hsps zurückzuführen, mit deren Hilfe die Zellen den höheren Temperaturen widerstehen konnten (Gabai et al., 1997; Landry et al., 1989; Li and Kal, 1977). Dabei korrelierte die Menge der Hsps mit der Intensität des Stresseinflusses (Stone and Craig, 1990). Umgekehrt zeigte sich bei kompetetiver Hemmung von Hsps eine erhöhte Thermosensitivität (Johnston and Kucey, 1988; Riabowol et al., 1988).

Hsps kommen ubiquitär, Organismus-übergreifend vor und werden sowohl in Bakterien als auch beim Menschen beschrieben (Schlesinger, 1982; Welch, 1992). Einige Hsps werden nicht nur bei Zellstress, sondern auch unter „normalen“ Bedingungen exprimiert (Fink, 1999). Die Expression anderer Hsps ist hingegen auf die zelluläre Stressantwort beschränkt. Neben thermischem Stress induzieren auch chemische Substanzen, physikalische Reize, pathophysiologische Stressfaktoren u.v.a. die Expression von Hsps (Hightower, 1991; Morimoto, 1991; Nover, 1984; Zusammenfassung s. Tab. 1).

Allen Stressoren ist gemeinsam, dass sie die Zelle vital bedrohen, da sie die Zellintegrität durch Proteindenaturierung gefährden. Die Hsps werden heute als Stressproteine und ihre Induktion als zelluläre Stressantwort bezeichnet, obwohl die beteiligten Proteine aus historischen Gründen häufig noch immer als Hitzeschockproteine oder Hsps bezeichnet werden.

Die Benennung der Hsps und deren Einteilung in mehrere Klassen erfolgt nach ihrem Molekulargewicht (Welch, 1992). Man unterscheidet die Klassen der großen Hsps von denen der kleinen oder „small“ Hsps (auch Hsp28-Klasse genannt), zu denen auch α B-Crystallin zählt. In Abhängigkeit von der Literatur werden heute sechs große (Welch, 1990) und zehn kleine Hsp-Klassen unterschieden (Fontaine et al., 2003; s. Tab. 2).

Physiologische Bedingungen

Zellzyklus
Zellentwicklung, -proliferation und -differenzierung
Hormone und Wachstumsfaktoren

Stressfaktoren in der Umgebung

Hitze („thermischer Stress“)
Schwermetalle
Freie Radikale („oxidativer Stress“)
UV-Strahlung
Zytostatika

Pathophysiologische Stressfaktoren

Fieber
Mikrobielle Infektionen
Gewebeschädigung
Gendefekte und Onkogenese
Hypoxie und Anoxie
Ischämie und Reperfusion
pH-Entgleisungen

Tab. 1: Induktion von Hsps unter physiologischen und nicht-physiologischen Bedingungen

(Auswahl aus Morimoto, 1991; Nover, 1984)

Große Hsps	Hsp110 Hsp90 (Hsp83, Hsp89) Hsp70 und Hsp72 (Hsp73) Hsp60 (Hsp58, GroEL homolog) Hsp47 Hsp32
Kleine oder „small“ Hsps (Hsp28-Familie)	Hsp27 (Hsp25, HspB1) MKBP (myotonic dystrophy protein kinase binding protein, HspB2) HspB3 αA-Crystallin (HspB4) αB-Crystallin (HspB5) Hsp20 (p20, HspB6) cvHsp (cardiovascular heat shock protein, HspB7) Hsp22 (HspB8) HspB9 ODFP (sperm outer dense fiber protein, HspB10)

Tab. 2: Einteilung der Hsp-Klassen (nach Welch, 1990 und Fontaine et al., 2003). Die Bezeichnungen in Klammern werden als Synonyme verwendet.

Hsps sind phylogenetisch stark konserviert, d.h. es bestehen ausgeprägte Sequenzhomologien zwischen den Hsps verschiedener Spezies. Beispielsweise findet sich zwischen der menschlichen Hsp70-Gensequenz und der des Bakteriums *E. coli* eine Sequenzanalogie von 50%, in einigen Domänen sogar von 96% (Schlesinger, 1990). Dieser hohe Konservierungsgrad lässt eine essenzielle Funktion der Hsps für das Überleben der Zelle und des Organismus vermuten.

Hitzeschockproteine sind mit ihren vielseitigen Funktionen für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion essenziell. Da ihr Anteil am Gesamtprotein in einer Zelle bis zu 5% ausmachen kann (Feige und Polla, 1994), ist davon auszugehen dass ihnen eine wichtige Funktion zukommt. Hsps sind an der intrazellulären Proteinbiosynthese (Frydman et al., 1994; Hartl, 1991), der korrekten Proteinfaltung (Johnson et al., 1998), der Reparatur und dem Abbau falsch gefalteter Proteine (Hightower, 1991) beteiligt (vgl. 1.5). Sie sind in den intrazellulären Proteintransport (Zhang et al., 2006) und die Translokation von Polypeptiden durch Membranen von Zellorganellen involviert (Gambill et al., 1993; Voos et al., 1994). Unter Stressbedingungen sind Hsps an der Modulation des Zytoskeletts beteiligt (Guay et al., 1997; Huot et al., 1996; Nakamoto and Vigh, 2007) und nehmen dadurch Einfluss auf Exo-, Endo-, und, Pinozytose (Jog et al., 2007; Lavoie et al., 1993; Wang et al., 2006). Eine weitere Funktion liegt in der Regulation von Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosevorgängen (Ito et al., 2001; Minowada and Welch, 1995; Spector et al., 1995). So können sie einerseits die Apoptose verhindern (Beere et al., 2000; Mehlen et al., 1996) und andererseits die Induktion der Apoptose in irreversibel geschädigten Zellen fördern (Georgakis et al., 2006).

1.5 Molekulare Chaperone

Allen Hsps ist die Fähigkeit gemeinsam, fehlgefaltete Proteine oder neu synthetisierte Polypeptide in relativ stabilen Komplexen zu binden, korrekt zu falten und zwischen Zellkompartimenten zu transportieren (Ellis, 1990; Fink, 1999). Diese Funktion als „molekulares Chaperone“ ist einerseits für den Zellstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen wesentlich und ermöglicht andererseits das Überleben der Zelle unter dem Einfluss von Stressfaktoren (Hartl, 1996; Leppa and Sistonen, 1997; s. Tab. 1). Die Bezeichnung „molekulares Chaperone“ (chaperone engl.: Anstandsdame, Begleitperson) wurde von Laskey geprägt (Laskey et al., 1978). Molekulare Chaperone sind Helferproteine

und besitzen selbst keine Information für die korrekte Proteinkonformation. Sie fungieren als „Katalysatoren“, d.h. sie sind nur temporär an ihre Substratproteine gebunden und erscheinen im gefalteten Endprodukt nicht (vgl. Abb. 2).

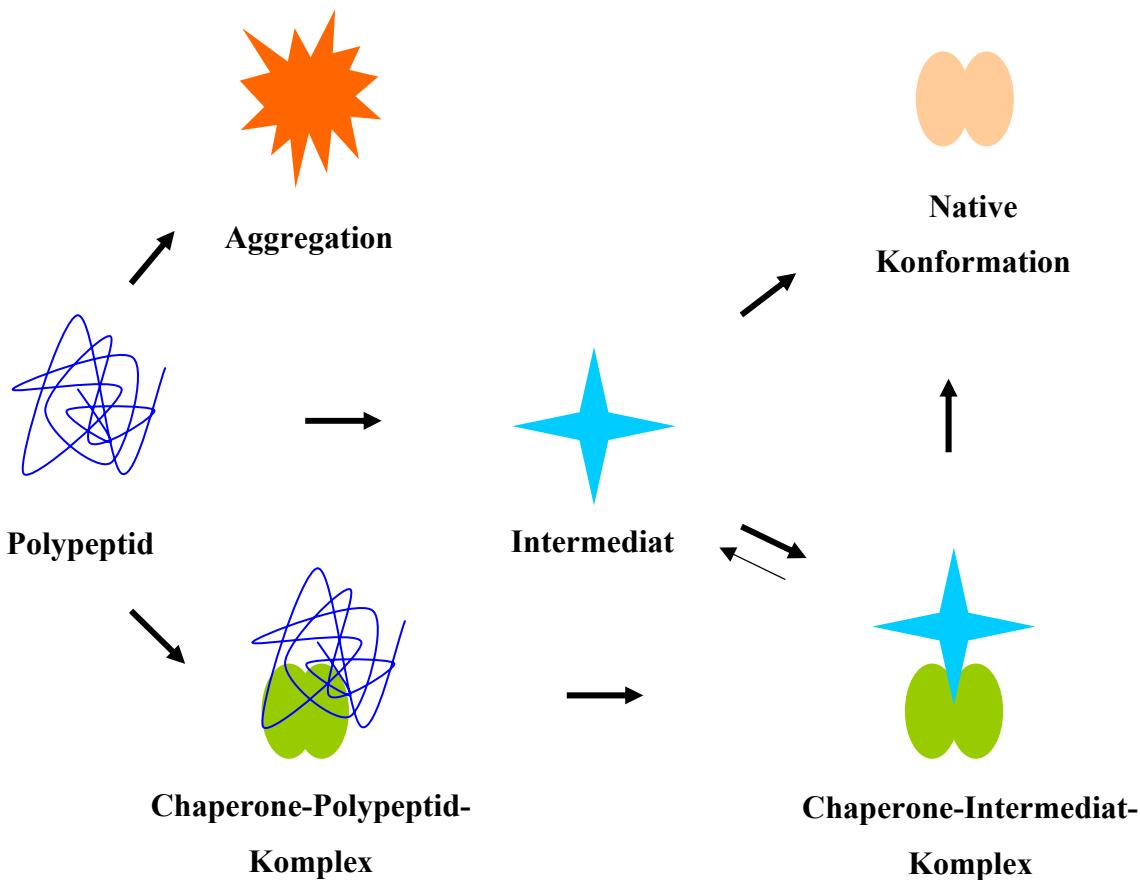


Abb. 2: Schematische Darstellung der Chaperone- bzw. Hsp-vermittelten Proteinfaltung in einer Zelle. Ungefaltete Polypeptide oder partiell gefaltete, höher organisierte intermediäre Polypeptide (Intermediate), die im Rahmen der Proteinbiosynthese oder unter dem Einfluss verschiedener Stressfaktoren entstehen, neigen zur Aggregation. Diese resultiert aus freiliegenden hydrophoben Aminosäureresten an der Moleküloberfläche. Chaperone können an diese hydrophoben Oberflächenstrukturen der Polypeptide binden (Chaperone-Polypeptid-Komplex, Chaperon-Intermediate-Komplex) und vermindern somit die Tendenz der Polypeptide und Intermediate untereinander zu aggregieren. So wird mithilfe von Chaperonen die Ausbildung der nativen, biologisch aktiven Konformation von Polypeptiden unterstützt (Schema modifiziert nach Fink, 1999).

Dabei können ihnen andere Chaperone bzw. Hsps zu Hilfe kommen, mit denen sie multimere, funktionelle Komplexe bilden (Ehrnsperger et al., 1997; Hernandez et al., 2002; Lee et al., 1997). Alleine oder im Komplexverband binden sie an Polypeptide, deren Faltung zur korrekten, biologisch aktiven Tertiärstruktur oder deren Rückfaltung zur nativen Peptidform gefördert wird (Freeman and Morimoto, 1996; Haslbeck, 2002). Weiterhin verhindern sie deren irreversible Aggregation, Denaturierung oder fehlerhafte Interaktion mit anderen Polypeptiden und Zellbestandteilen, indem sie die ungefaltete Konformation neu synthetisierter Polypeptide stabilisieren (Craig et al., 1993; Hartl, 1996; Haslbeck and Buchner, 2002; Sun and Macrae, 2005). Hsps sind somit in der Lage, eine durch Stress induzierte Proteinentfaltung oder -denaturierung abzufangen, indem sie die entfalteten oder denaturierten Proteine erkennen, binden und reparieren (Ellis, 1990; Ellis and van der Vies, 1991). Sind zytosolische Proteine irreversibel geschädigt, erfolgt der Abbau unter der Kontrolle von molekularen Chaperonen.

1.6 **α B-Crystallin als kleines Hitzeschockprotein und molekulares Chaperone**

α B-Crystallin (α -Basic-Crystallin) ist als ein wichtiger Strukturbestandteil der Augenlinse bekannt. α B-Crystallin stellt eine von zwei nahe verwandten Untereinheiten des α -Crystallin dar (α A- und α B-Crystallin), wobei α A-Crystallin hauptsächlich in der Augenlinse und nur in sehr geringem Maße in anderen Geweben exprimiert wird. α B-Crystallin hingegen wird als ubiquitäres Protein in vielen verschiedenen Gewebetypen und Organen wie Herz- und Skelettmuskel, ZNS und peripherem Nervensystem, Lunge, Haut, Retina, Plazenta und Niere exprimiert (Bhat and Nagineni, 1989; Dubin et al., 1989; Iwaki et al., 1991; Iwaki et al., 1990; Iwaki et al., 1989; Kato et al., 1991; Takenaka et al., 2000).

Das α B-Crystallin-Gen ist im Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns (Groenen et al., 1994). Man vermutet eine strukturelle Zusammensetzung aus zwei Domänen, einer globulären N-terminalen Domäne und einer unter den kleinen Hsps hoch konservierten α -Crystallin-Domäne nahe des C-Terminus (Carver et al., 1992; Ingolia and Craig, 1982; Wistow, 1985).

Die exakte Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur ist bisher nicht bekannt. Man nimmt jedoch an, dass die Quartärstruktur eine globuläre Form mit zentraler Höhle annimmt und dynamisch bzw. variabel ist (Haley et al., 1998; Vanhoudt et al., 1998; vgl. Abb. 3).

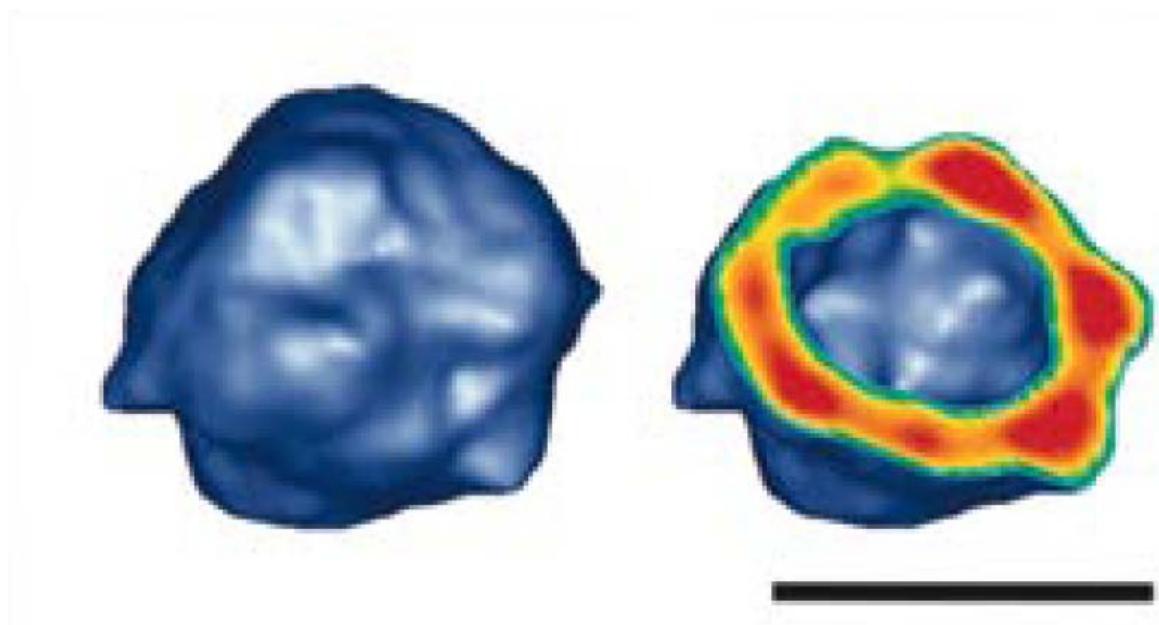


Abb. 3: Dreidimensionale Rekonstruktion des α B-Crystallin-Oligomers. Dargestellt ist die Oberfläche (links) und ein Querschnitt (rechts) des Oligomers, auf dem die zentrale Höhle sichtbar wird. Blau: Regionen hoher Proteindichte, rot: Regionen niedriger Dichte. Der Balken entspricht 10nm (Haley et al., 1998).

1991 zeigte Klemenz, dass α B-Crystallin in NIH 3T3 Fibroblasten durch thermischen Stress induzierbar ist und beschrieb es als Hsp (Klemenz et al., 1991). Das α B-Crystallin gehört mit seinem Molekulargewicht von ca. 20 kDa zu der Familie der kleinen Hsps (Horwitz, 1992; Jakob et al., 1993) und fungiert *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* als molekulares Chaperone (Horwitz, 2003). Es verhindert die Aggregation partiell entfalteter Polypeptide (Muchowski et al., 1999; Wang and Spector, 2000), interagiert bei Zellstress mit verschiedenen Elementen des Zytoskeletts (Quinlan, 2002; Smoyer et al., 2000; Verschueren et al., 2002) und schützt die Zelle vor Stress-induzierter Apoptose (Alge et al., 2002; Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b; Muchowski et al., 1999; Nagaraj et al., 2005). Wie alle Hsps bindet auch α B-Crystallin an nicht-native Proteine und stellt eines der effizientesten Chaperone im Hinblick auf die Substratbindung dar (Ehrnsperger et al., 1997; Lee et al., 1997). In der Zelle bildet es mit Hsp 25/27, zu dem es durch die α -Crystallin-Domäne eine hohe Analogie aufweist, große lösliche multimere Komplexe, Homo- oder Heterooligomere, bis zu einem Molekulargewicht von 800 kDa aus (Sun and Macrae, 2005).

In der Augenlinse verhindert α B-Crystallin die altersbedingte Aggregation entfalteter und denaturierter Proteine, erhält somit die Linsentransparenz und verzögert die Ausbildung eines Katarakts (Boyle and Takemoto, 1994; Carver et al., 1996; Kamradt et al., 2005; Liu et al., 2004b; Rao et al., 1995; Wang and Spector, 1994). Eine missense-Mutation im α B-Crystallin-Gen führt in der Linse zu einem frühzeitigen Katarakt (Berry et al., 2001). Auch bei Erkrankungen von Skelett- und Herzmuskel wie der Desmin-abhängigen Myopathie (Bova et al., 1999; Vicart et al., 1998) und der Desmin-abhängigen Kardiomyopathie (Wang et al., 2001) wurde eine Mutation im α B-Crystallin-Gen mit Verlust der Chaperone-Funktion und konsekutiver Aggregation von Desmin beobachtet (Chavez Zobel et al., 2003; Ito et al., 2003). Die intrazelluläre α B-Crystallin Konzentration ist bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie z.B. dem Alexander-Syndrom (Iwaki et al., 1992a), der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (Renkawek et al., 1992), dem Morbus Alzheimer (Kato et al., 2001), dem Morbus Parkinson (Iwaki et al., 1992b), der Multiplen Sklerose (Stoevring et al., 2005), bei astrozytären Gehirntumoren (Aoyama et al., 1993b; Odreman et al., 2005), bei Krampfanfällen (Kato et al., 1999b) und bei anderen neuropathologischen Befunden (Iwaki and Tateishi, 1991; Lowe et al., 1992) erhöht. Eine gesteigerte α B-Crystallin Expression wurde ebenfalls in Tumorzellen von aggressiven Mammakarzinomen (Gruvberger-Saal and Parsons, 2006), Nierenzellkarzinomen (Pinder et al., 1994) und Glioblastoma multiforme (Odreman et al., 2005) nachgewiesen. In diesen hoch malignen Tumoren wird α B-Crystallin als potenzielles Onkogen oder möglicher Tumormarker diskutiert. Des Weiteren wird vermutet, dass α B-Crystallin die Thrombozytenaggregation hemmt (Kanno and Matsuno, 2006).

In-vitro-Studien mit kultivierten Fibroblasten, Gliazellen, Astrozyten, Myozyten, retinalen und renalen Epithelzellen zeigten eine konstitutive und eine durch verschiedene Stressfaktoren induzierbare α B-Crystallin Expression (Aoyama et al., 1993a): Nach Hitzeschock (Head et al., 1994), bei Exposition gegenüber Schwermetallen (Ganadu et al., 2004; Hawse et al., 2003), bei Hyperglykämie (Nagaraj et al., 2005), bei Hypoxie/Ischämie (Louapre et al., 2005; Martin et al., 1997), bei osmotischem Stress (Dasgupta et al., 1992; Lin et al., 1993) und bei oxidativem Stress (Alge et al., 2002). Vor allem die beiden letztgenannten spielen für die Nierenmarkszellen in Antidiurese eine wesentliche Rolle.

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der Niere werden verschiedene Hsps exprimiert, die ein spezifisches Expressionsmuster in verschiedenen Nierenzonen aufweisen und für das Überleben von medullären Zellen bei hypertonen Umgebungsbedingungen essenziell sind (Müller et al., 1996; Neuhofer and Beck, 2005). Das kleine Hsp α B-Crystallin wurde wie in vielen anderen Geweben auch in der Niere von Säugetieren nachgewiesen (Smoyer et al., 2000). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die intrarenale Verteilung und Regulation von α B-Crystallin in der Rattenniere näher untersucht werden.

Die Zellen des Nierenmarks sind in Antidiurese, durch den Prozess der Harnkonzentrierung mittels Gegenstrommultiplikation osmotischem Stress ausgesetzt, der v.a. durch stark erhöhte interstitielle Konzentrationen von NaCl und Harnstoff entsteht. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen dieser Substanzen auf die α B-Crystallin Expression in vivo und in vitro näher überprüft werden. Im Tierexperiment sollte der Einfluss des Diuresezustands auf die α B-Crystallin Expression untersucht werden. Für die in-vitro-Untersuchungen wurden MDCK-Zellen verwendet, eine renale Epithelzelllinie mit Zelleigenschaften ähnlich den Sammelrohrzellen des Nierenmarks, die erhöhten NaCl- und Harnstoffkonzentrationen ausgesetzt wurden.

Bei Zellstress kommt es unter dem Einfluss von Hsps, u.a. α B-Crystallin, zu einer Restrukturierung des Zytoskeletts (Bennardini et al., 1992; Muchowski et al., 1999; van de Klundert et al., 1998). Versuche mit Hitze-gestressten Ratten-Kardiomyoblasten zeigen, dass phosphoryliertes α B-Crystallin an Aktin bindet und sich dies zytoprotektiv auswirkt. Dabei wird α B-Crystallin ein stabilisierender Effekt auf das Aktinfilament-Netzwerk zugeschrieben (Singh et al., 2007). Daher sollte in vitro untersucht werden, ob in MDCK-Zellen bei hypertonomem Stress eine Umorganisation des Zytoskeletts und eine Assoziation von α B-Crystallin an zytoskeletale Strukturen stattfindet.

Die drei Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten-Protein (MAP)-Kinasen, ERK (extracellular regulated kinase), JNK (Jun N-terminal kinase) und p38, werden durch Veränderungen der Umgebungstonizität induziert (Watts et al., 1998). Sie sind an der Induktion bzw. Regulation von Hsps beteiligt (Hoover et al., 2000; Sheikh-Hamad et al., 1998). MAP-Kinasen werden über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert und besitzen unterschiedliche Substratspezifität (Derijard et al., 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995). Daher sollte evaluiert werden, ob eine oder mehrere der MAP-Kinasen an der Regulation von α B-Crystallin beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

2.1.1 Methodik

Für die Tierversuche wurden männliche Laborratten der Zuchtlinie „Wistar“ verwendet, die von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h, konstanter Temperatur (25°C) und Luftfeuchtigkeit (60%) gehalten und hatten stets freien Zugang zu Trinkwasser und handelsüblichem Pelletfutter. Ihr anfängliches Körpergewicht betrug etwa 200 g. Um eine Diurese zu induzieren, erhielten die Versuchstiere drei Tage lang eine 3%-ige Saccharose-Trinkwasser-Lösung ad libitum.

Die Urinosmolalität wurde post mortem anhand von Blasenurin mittels Dampfdruckosmometer (Wescor, Logan, Utah, USA) bestimmt.

2.1.2 Präparation des Nierengewebes

Nach den Behandlungen wurden die Ratten mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal®, 60 mg/kg KG intraperitoneal) betäubt. Für Northern and Western Blot Analysen wurden die Rattennieren nach Entnahme sofort auf Eis gelegt und in Kortex, Außen- und Innenmark disseziert. Das Gewebe wurde daraufhin sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Aufbereitung der Rattennieren für die Immunhistologie ist in Abschnitt 2.5.3 beschrieben.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Medien und Lösungen

Zellkulturmedium:

Für die Kultivierung von MDCK-Zellen wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) Fertigpulver (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA) in H₂O bidest gelöst und 850 mg/l NaHCO₃ und 2,38 g/l HEPES zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH unter CO₂-Begasung bei Raumtemperatur (RT) auf 7,15 eingestellt. Ein pH-Wert von 7,15 bei RT entspricht einem pH-Wert von 7,4 bei Kultivierungstemperatur (37°C). Daraufhin wurde das frisch hergestellte Medium steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Vor dem

Gebrauch wurden dem Medium die entsprechenden Mengen an FCS (10% (v/v) Endkonzentration, s.u.) und Antibiotikalösung (1% (v/v) Endvolumen, s.u.) zugegeben.

Zur Herstellung von hypertonomem DMEM wurde isotonem DMEM das entsprechende Volumen einer konzentrierten NaCl-, Harnstoff- oder Raffinose-Stammlösung in DMEM zugegeben, bis die gewünschte Endosmolalität erreicht war. Die Endosmolalität wurde mittels Dampfdruckosmometer (Wescor) gemessen.

FCS (fetal calf serum; fötales Kälberserum):

FCS wurde von der Firma Invitrogen bezogen und in Aliquots bei -20°C gelagert. Zum Ansetzen des Mediums wurde ein entsprechender Aliquot an FCS frisch aufgetaut und in einer Konzentration von 10 %vol zugegeben.

Antibiotikalösung:

Als Antibiotikazusatz wurde eine 100-fach konzentrierte Lösung (Invitrogen) bestehend aus Penicillin (10000 U/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml) eingesetzt, die ebenso wie FCS in Aliquots bei -20°C tief gefroren aufbewahrt wurde. Diese wurde dem Medium vor Gebrauch in einer Konzentration von 1:100 (v/v) zugegeben.

Trypsin-EDTA-Lösung:

Die zum Passagieren von Zellen benötigte Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (0,05 g/dl Trypsin/0,02 g/dl EDTA; Invitrogen) wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt und erst bei Bedarf aufgetaut.

Einfriermedium:	90% (v/v) FCS
	10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid)

2.2.2 MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zellen

Es wurden MDCK-Zellen von der Firma American Type Culture Connection (ATCC CCL 34; Manassas, VA, USA) verwendet. MDCK-Zellen entstammen einer permanenten Zelllinie, die 1958 von Madin und Darby aus der Niere eines weiblichen Cocker Spaniels isoliert wurde (Madin and Darby, 1958). MDCK-Zellen werden u.a. zur Untersuchung der Auswirkungen von osmotischem Stress auf tubuläre Nierenzellen eingesetzt, da sie ähnliche epitheliale

Transport- und Stoffwechseleigenschaften wie Zellen distaler Nephronabschnitte besitzen (Gstraunthaler, 1988). Die Zellen wurden von Passage 10–50 für Versuche verwendet.

2.2.3 Steriltechnik

Die Arbeit mit Lösungen, Medien und Zellen fand unter Verwendung steriler Gefäße, Pipetten und sonstiger Arbeitsutensilien an einer „laminar-flow“ Sterilbank (Caeg Reinraumtechnik, Selm-Bork, Deutschland) statt. Alle Flüssigkeiten wurden mittels Membranfilter (Porengröße 0,2 µm, Nunc, Rochester, New York, USA) steril filtriert oder, falls möglich, autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte in sterilen Gefäßen.

2.2.4 Kultivierung und Behandlung der Zellen

MDCK-Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden die Zellen entweder in Plastikpetrischalen (Greiner, Solingen, Deutschland) mit einem Durchmesser von 94 mm (10 ml Medium; Northern Blot Analyse) oder von 60 mm (5 ml Medium; Western Blot Analyse) oder in 24-well-Platten (Costar, Cambridge, MA, USA; 1 ml Medium/Kammer, Immunfluoreszenz) ausgesät. Ein Mediumwechsel fand alle 2–3 Tage statt.

Sobald ein konfluenter (90–100%) Zellrasen gewachsen war (nach ca. 4–6 Tagen), wurden die Zellen entweder für Experimente verwendet oder zur Fortführung der Stammkultur passagiert. Bei der Zellpassage wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden zur Entfernung von Mediumresten sanft in 10 ml PBS geschwenkt. Daraufhin wurde PBS abgesaugt und die Zellen für 5–10 min in 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Trypsin verdaut extrazelluläre Matrix. EDTA komplexiert Kalzium und unterbindet die Ausbildung von Kalzium-abhängigen Zell-Zell-Kontakten. Sobald die Zellen eine runde Form angenommen hatten und nicht mehr adhären waren, wurden sie nach Zugabe von 5 ml Medium durch wiederholtes Auf- und Abziehen in einer 1 ml Kunststoffpipette vom Schalenboden abgelöst und vereinzelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und zum Ansetzen von Versuchen oder zur Fortführung der Stammkultur in sterile Petrischalen ausgesät.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die MDCK-Zellen nach Trypsinierung und Zentrifugation (s.o.) in DMSO-haltigem Einfriermedium suspendiert, in Kryoröhrchen (VWR, Darmstadt, Deutschland) überführt, schrittweise auf –80°C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Fortführung der Zellkultur wurde die Temperatur sukzessive auf –20°C vermindert, die Zellen im Einfriermedium 1:10 mit frischem Medium verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in eine Plastikpipette aufgetaut. Das Gefrierschutzmittel DMSO ist ein Zellgift und wirkt bei RT schon in geringer Dosierung zytotoxisch. Daher sollten die Zellen nicht nur schonend aufgetaut, sondern es auch die toxische Wirkung von DMSO niedrig gehalten werden. Dann folgten Zentrifugation, Resuspension und Aussaat der Zellen in frischem Medium nach oben beschriebener Anleitung.

2.2.5 Inkubation der Zellen in hypertonem Medium

2.2.5.1 Behandlung mit NaCl

Hypertones Medium (Endosmolalität 500 mosm/kg H₂O) wurde hergestellt, indem isotonem DMEM das erforderliche Volumen einer 4 M NaCl-Stammlösung in DMEM zugegeben wurde (s. 2.2.1). Die Endosmolalität wurde mittels Dampfdruckosmometer (Wescor) überprüft. Zu Beginn der Versuche wurde das Medium durch hypertones Medium ersetzt und die Zellen für die angegebenen Zeitspannen (max. 7 Tage) inkubiert. Bei einer Versuchsdauer von weniger als drei Tagen fand, wenn nicht anders angegeben, kein Mediumwechsel statt. Bei einer Versuchszeit größer drei Tage, wurde das Medium nach drei Tagen gewechselt.

2.2.5.2 Behandlung mit Harnstoff

Isotonem DMEM wurde das erforderliche Volumen einer 8 M Harnstoff-Stammlösung in DMEM zugegeben, um die gewünschte Mediumosmolalität von 500 mosm/kg H₂O zu erreichen. Dann wurde wie in 2.2.5.1 fortgefahren.

2.2.5.3 Behandlung mit Raffinose

Die erforderliche Menge an Raffinose (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in DMEM gelöst, um eine Endosmolalität von 500 mosm/kg H₂O zu erreichen. Nach Sterilfiltration wurden FCS und Antibiotikalösung hinzugefügt und fortgefahren wie in 2.2.5.1 beschrieben.

2.3 Northern Blot Analyse

2.3.1 Lösungen und Puffer

Alle für die Northern Blot Analyse verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit H₂O-DEPC statt mit H₂O bidest angesetzt. Zur Herstellung von H₂O-DEPC wurden 500 ml H₂O bidest mit 100 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gemischt, über Nacht inkubiert, anschließend autoklaviert und bei RT gelagert. Alle Gefäße und Arbeitsbestecke wurden mit H₂O-DEPC gereinigt bzw. soweit möglich autoklaviert oder über Nacht bei 245°C sterilisiert. Zusätzlich wurden Arbeitsflächen und -materialien mit RNase away (Molecular BioProbes, San Diego, CA, USA) behandelt, um einer RNase-Kontamination vorzubeugen.

10 x MOPS:	200 mM MOPS 50 mM Na-Aacetat 10 mM EDTA Die Substanzen wurden in H ₂ O-DEPC gelöst und der pH mit Essigsäure auf 7,0 eingestellt. Nach der Autoklavierung wurde die Lösung lichtgeschützt bei RT gelagert.
20 x SSC (Standard Salz-Citrat):	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat Die Substanzen wurden in 900 ml H ₂ O-DEPC gelöst und der pH mit 1N HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen mit H ₂ O-DEPC auf 1 l aufgefüllt, die Lösung autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
Formaldehyd-Agarose-Gel (1 %):	1 g Agarose (Biomol, Hamburg, Deutschland) 10 ml 10 x MOPS 2 ml 37% Formaldehyd Die Substanzen wurden mit H ₂ O-DEPC auf 100 ml aufgefüllt und unter Kochen gelöst.

Das flüssige Gel wurde anschließend im Wasserbad auf ca. 55°C abgekühlt und luftblasenfrei gegossen.

Formaldehyd-Laufpuffer (750 ml):	75 ml 10 x MOPS 15 ml 37% Formaldehyd Die Lösungen wurden mit H ₂ O-DEPC auf 750 ml aufgefüllt.
Formaldehyd-Probenpuffer (21 µl/Probe):	12,5 µl Formamid 2,5 µl 10 x MOPS 5 µl 37% Formaldehyd 1 µl Beschwerungspuffer
Beschwerungspuffer:	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau
Puffer B für Blockierungslösung:	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl Die Substanzen wurden in H ₂ O-DEPC gelöst und der pH mit NaOH auf 8,0 eingestellt.
Blockierungslösung, 10% (w/v):	25 g Blockingreagenz (Roche, Mannheim, Deutschland) 250 ml Puffer B Das Blockingreagenz wurde unter Erhitzen und Schütteln in Puffer B gelöst, autoklaviert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.
(Prä-)Hybridisierungslösung (50 ml):	25 ml Formamid 12,5 ml 20 x SSC 2,5 ml Blockierungslösung 2,5 ml 10% SDS

7,5 ml H₂O-DEPC

Hybridisierungswaschpuffer:	2 x SSC/0,1% SDS (500 ml): 50 ml 20 x SSC 5 ml 10% SDS 0,1 x SSC/0,1% SDS (500 ml): 2,5 ml 20 x SSC 5 ml 10% SDS Die Lösungen wurden mit H ₂ O-DEPC auf 500 ml aufgefüllt.
Detektionswaschpuffer:	0,1 M Maleinsäure, pH 8,0 3 M NaCl 0,3% Tween-20
Blockierungspuffer:	1% Blockierungslösung in Detektionswaschpuffer
Substratpuffer:	0,1 M Tris, pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ Die Substanzen wurden in H ₂ O-DEPC gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.
Ethidiumbromid-Lösung:	Ethidiumbromid wurde in einer Konzentration von 0,1–0,5 µg/ml in H ₂ O bidest gelöst und bei RT lichtgeschützt gelagert.
Antikörper:	Anti-DIG (Digoxigenin) F _{ab} -Fragment, AP (alkalische Phosphatase)-konjugiert (Roche)

2.3.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den MDCK-Zellen wurden diese dreimal mit DEPC-behandeltem PBS gewaschen und das erforderliche Volumen (1 ml/94-mm Schale) an Tri-Reagent (Peq-Lab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) zugegeben. Zur RNA-Phasenseparation wurde in jede Probe 0,1 ml Chloroform pipettiert, für 15 s gevortext und anschließend bei RT für 15 min stehen gelassen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C. Daraufhin wurde die obere wässrige Phase abpipettiert und in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Für die RNA-Präzipitation wurde jeweils 0,25 ml Isopropanol zugegeben, das Gemisch für 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend bei 12000 x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand aus Tri-Reagent und Chloroform wurde verworfen und das RNA-Pellet getrocknet. Abschließend folgte ein Waschgang mit eisgekühltem 75%-igem Ethanol (Liao et al., 1998). Das gewaschene RNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in 35 µl H₂O-DEPC bei 60°C gelöst und bei –80°C aufbewahrt.

2.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (Spektralphotometer, Biospec-1601E, Shimadzu, Kyoto, Japan) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurden die einzelnen RNA-Proben in H₂O-DEPC 1:200 verdünnt, die Absorption gemessen und die RNA-Konzentration anhand folgender Formel errechnet:

$$K_{RNA} = A_{260} \times 40^* \times 201^{**} \div 1000$$

K_{RNA} = RNA-Konzentration der Probe in µg/µl

A₂₆₀ = Absorption der Probe bei 260 nm;

* Faktor, wobei für RNA gilt: 1 OD = 40 µg/ml (OD = optical density). Somit entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

**Verdünnungsfaktor; errechnet aus der Verdünnung der RNA mit DEPC-H₂O.

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Anhand eines 260/280-Quotienten konnte die Qualität der RNA beurteilt werden. Betrug das 260/280-Verhältnis 1,6–1,9, so war eine Verunreinigung der RNA unwahrscheinlich.

2.3.4 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA nach deren Molekülgröße wurden jeweils gleiche Mengen an RNA (20 µg) in die Probentaschen eines Agarose-Gels aufgetragen. Hierzu wurden entsprechende Volumina einer RNA-Probe mit Probenpuffer (Verdünnung im Endvolumen 1:2) vermischt und mit H₂O-DEPC auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 65°C denaturiert, kurz auf Eis gelegt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Da sich die RNA-Sekundärstruktur auf die RNA-Laufeigenschaften auswirkt, musste die RNA vor Auftragen auf das Gel denaturiert werden. Neben der beschriebenen Hitzedenaturierung der RNA-Proben mit anschließender Kühlung auf Eis diente zusätzlich die Zugabe von Formaldehyd, welches sowohl im Agarosegel als auch im Proben- und Laufpuffer enthalten war. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 3–4 V/cm über Nacht und wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaufront ca. 3/4 bis 4/5 der Gellänge passiert hatte.

2.3.5 „Blotting“

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA im Agarosegel wurde diese auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N⁺; General Electrics Bio-Sciences Corp., NJ, USA) übertragen (s. Abb. 4). Hierzu wurden Gel und Membran bei RT zunächst für 5 min in H₂O-DEPC gewaschen und dann für 15 min in 20 x SSC äquilibriert. Daraufhin wurde der Transfer mittels Kapillarblot in Abwärtstransfer-Technik mit 20 x SSC gestartet und über Nacht laufen gelassen. Mittels UV-Strahlung (BLX-254, Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Frankreich) fand zur Immobilisation und Fixation der RNA auf der Membran im Anschluss das Crosslinking bei 0,12 J/cm² statt.

Die im Gel verbliebene RNA wurde mittels Ethidiumbromid-Lösung sichtbar gemacht. Somit konnte beurteilt werden, ob eine adäquate Auftrennung der RNA stattgefunden hatte bzw. ob eine Degradierung der RNA zu beobachten war.

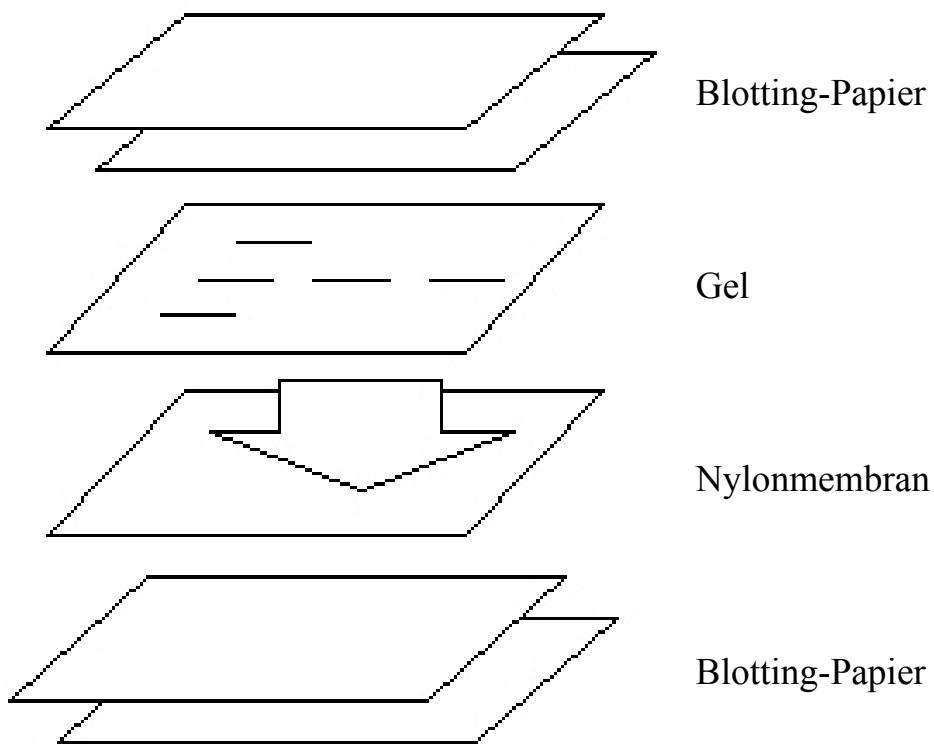


Abb. 4: Schematische Darstellung des „Blotting“. Die treibende Kraft für die Übertragung der RNA aus dem Gel auf die Nylonmembran stellt der Flüssigkeitsstrom von 20 x SSC dar, womit das Gel ständig in Kontakt war. Um Gel und Nylonmembran vor Verunreinigung zu schützen wurden diese zwischen zurechtgeschnittene Filterpapiere geschichtet.

2.3.6 Hybridisierung

Nach Äquilibrierung der Membran in 20 x SSC wurde diese in Plastikfolie eingeschweißt und in Prähybridisierungslösung (ohne cDNA Sonde) für 2 h bei 55°C inkubiert. Währenddessen fand die Herstellung der Hybridisierungslösung (= Prähybridisierungslösung mit cDNA Sonde) statt. Dazu wurden die Digoxigenin-markierten α B-Crystallin (Wu et al., 1985), Hsp72 (Neuhöfer et al., 1999b) und GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) cDNA Sonden (Neuhöfer et al., 2002a) für 5 min bei 95°C denaturiert und danach sofort auf Eis gelegt. Die cDNA Sonden wurden in geeigneten Konzentrationen der Hybridisierungslösung zugegeben und die Membran über Nacht hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in einem Schüttelwasserbad (WB14, Memmert, Schwalbach, Deutschland) bei einer Temperatur von 55°C. Nach der Hybridisierung wurde die Membran

viermal in Hybridisierungswaschpuffer gewaschen, zweimal für 15 min in 2 x SSC/0,01% SDS bei RT und zweimal für 15 min in 0,1 x SSC/0,01% SDS bei 55°C.

2.3.7 Immunodetektion

Die Immunodetektion erfolgte entsprechend der folgenden Behandlungsschritte. Für die Inkubation mit den unten aufgeführten Puffern wurde die Membran luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und unter Schütteln für die angegebenen Zeitspannen bei RT inkubiert.

1 Waschgang in Detektionswaschpuffer	5 min
Inkubation in Blockierungspuffer	60 min
Inkubation in Blockierungspuffer mit anti-DIG F _{ab} -Fragment, AP-konjugiert (1:20000)	30 min
4 Waschgänge in Detektionswaschpuffer	4 x 10 min
Äquilibrierung der Membran in Substratpuffer	5 min
Äquilibrierung der Membran in Substratpuffer mit CDP-Star (lichtgeschützt, 1:100, Roche)	5 min

Nach dem letzten Arbeitsschritt musste die Membran zunächst abtropfen und wurde dann luftblasenfrei in eine frische Plastikfolie eingeschweißt. Diese wurde in einer Röntgenkassette platziert und ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak, Rochester, NY, USA) aufgelegt, bis sich deutliche Bandensignale zeigten.

Nach der Filmentwicklung wurden die Banden eingescannt und deren Intensität densitometrisch mittels Image J Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) analysiert. Durch die Normalisierung auf GAPDH konnten Intensitätsunterschiede durch ungleich aufgetragene RNA-Mengen ausgeglichen werden (s. 2.3.8). Hierzu wurde das Integral des untersuchten Bandensignals zu dem des entsprechenden GAPDH-Bandensignal ins Verhältnis gesetzt.

2.3.8 „Stripping“ der Membran

Um zu überprüfen, ob identische RNA-Mengen auf das Gel aufgetragen waren, wurden die Blots mit GAPDH-spezifischer cDNA rehybridisiert. Da eine Hybridisierung mit αB-Crystallin- und GAPDH-spezifischer cDNA im gleichen Hybridisierungsansatz aufgrund der

ähnlichen mRNA-Größe (0,8 kb und 1,1 kb) nicht möglich ist, mussten getrennte Hybridisierungen der Membran vorgenommen werden. Daher wurde jeweils das vorherige Hybridisierungsprodukt mittels „Stripping“ beseitigt. Hierfür wurde die Membran vor dem „Stripping“ für 5 min in H₂O-DEPC, und anschließend für 20 min in 20 x SSC äquilibriert. Zum „Stripping“ wurde die Membran für 1 min in 0,1% SDS in H₂O-DEPC bei 95°C gekocht, nach kurzem Abtropfen in eine neue Folie eingeschweißt und bis zur nächsten Hybridisierung bei 4°C gelagert.

2.4 Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

2.4.1 Lösungen und Puffer

Lysepuffer für Nierengewebe und MDCK-Zellen: 8 M Harnstoff in PBS

2.4.1.1 SDS-PAGE

Sammelgel, 4% (10 ml): 1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
(Lösung A)

5 ml 0,4% SDS/0,25 M Tris-HCl, pH 6,8
(Lösung C)

3,7 ml H₂O bidest

10 µl TEMED

80 µl Ammoniumpersulfat (10%)

Trenngel, 10 % (20 ml): 6,8 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
(Lösung A)

5 ml 0,8% SDS/1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
(Lösung B)

8,2 ml H₂O bidest

10 µl TEMED

66 µl Ammoniumpersulfat (10%)

Laufpuffer (1000 ml): 192 mM Glycin
 0,1% SDS

25 mM Tris-HCl, pH 8,3

Die Substanzen wurden mit H₂O bidest auf 1000 ml aufgefüllt und bei RT gelagert.

4 x SDS-Probenpuffer:	20% SDS 400 mM DTT 40% Glycerin 240 mM Tris-HCl, pH 6,8 Bromphenolblau
-----------------------	--

2.4.1.2 Western Blot Analyse

Blottingpuffer (1000 ml):	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 20% Methanol Die Substanzen wurden mit H ₂ O bidest auf 1000 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.
---------------------------	--

Ponceau S-Lösung:	2,6 mM Ponceau S 180 mM Trichloressigsäure Die Substanzen wurden in PBS gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.
-------------------	---

PBS (phosphate buffered saline):	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ Die Substanzen wurden zunächst in 900 ml H ₂ O bidest gelöst, der pH auf 7,4 eingestellt und anschließend das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.
----------------------------------	---

PBST:	0,1% Tween-20 in PBS
-------	----------------------

Blockierungslösung: 10% Ziegenserum (goat serum) in PBST

Immunodetektion: DAB-Färbung:

0,05% Diaminobenzidin-

Tetrahydrochlorid (DAB)

0,1% H₂O₂

Die Substanzen wurden in PBST gelöst.

Chemilumineszenz:

ECL Detection Kit (Pierce, Rockford, IL,

USA)

2.4.2 Antikörper

Zur Inkubation der Membran mit den jeweiligen Antikörpern wurden diese in unten angegebenen Konzentrationen mit 10% Ziegenserum in PBST verdünnt.

Kaninchen anti-αB-Crystallin AK (polyklonal; SPA-223, StressGen, Victoria, British Columbia, Canada), 1:5000

Maus anti-Hsp72 AK (monoklonal; SPA-810, StressGen), 1:5000

Kaninchen anti-Aktin AK (polyklonal; Sigma), 1:1000

Kaninchen anti-Maus IgG (H+L) (Dianova, Wiesbaden, Deutschland), 1:1000

Ziegen anti-Kaninchen IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert (Dianova), 1:5000

2.4.3 Herstellung von Lysaten aus Gewebeproben und kultivierten Zellen

2.4.3.1 Gewebeproben

Für Northern and semiquantitative Western Blot Analysen wurden die Rattennieren nach der Entnahme sofort auf Eis gelegt und in Kortex, Außen- und Innenmark disseziert. Die einzelnen Gewebeteile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Proteinextraktion wurden die Gewebeproben für 30 s mittels Potter-Elvehjem-Homogenisator in 8 M Harnstoff in PBS 1:10 (w/v) homogenisiert, daraufhin mit 13000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und schließlich der Überstand für semiquantitative Western Blot Analysen verwendet. Für Northern Blot Analysen wurden die Gewebeproben in 1 ml Tri-Reagent zerkleinert und anschließend die RNA wie unter 2.3.2 beschrieben isoliert.

2.4.3.2 MDCK-Zellen

Die MDCK-Zellen wurden nach Verwerfen des Mediums dreimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und sofort auf Eis gelegt. Durch die Zugabe von 4°C kaltem Lysepuffer (100 µl/60 mm Petrischale) konnten die Zellen mit einem Plastikzellschaber vom Schalenboden abgeschabt werden. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in eine Kunststoffpipette wurden sie vollständig im Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Daraufhin wurde das Zelllysat bei 4°C für 15 min mit 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in neue Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (King und Laemmli, 1971; Laemmli, 1970) wurde ein kommerziell erhältlicher, fünffach konzentrierter Fertig-Assay (Protein Assay Reagent, Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Das Prinzip des Assays beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit einer Masse >3 kDa mit Coomassie Brilliant Blue G-259 („CBB-Methode“). Der Assay enthält neben dem Farbstoff, der hauptsächlich an basische Aminosäure-Reste bindet, noch Phosphorsäure und Methanol in Wasser.

Das Reagens wurde zunächst 1:5 (v/v) mit H₂O bidest verdünnt und zur Entfernung größerer Partikel filtriert. Nach der Kalibrierung des Photometers wurde mittels Protein-Standardkonzentrationen (Bovines Gamma Globulin; 0–5–10–20–30–40 µg/ml) zunächst eine Kalibrierungskurve erstellt. Anschließend wurden die Proteinproben 1:1000 (v/v) mit dem verdünnten Reagens vermischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Messung erfolgte innerhalb von 5–60 min, um eine Verfälschung durch Präzipitatbildung (>60 min) zu verhindern.

Um Mess- und Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten, wurde die Proteinbestimmung aller Proben inklusive Standard zweifach durchgeführt und jeweils der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde anhand der Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration (µg/ml) in der Probe ermittelt.

2.4.5 SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht wurde ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet. In die Gelspuren wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen (s. Abb. 5). Hierzu wurden entsprechende Volumina der Proteinproben mit 1/4 Vol. 4 x SDS-Probenpuffer (7,5 µl) gemischt und anschließend H₂O bidest bis zu einem Endvolumen von 30 µl zugegeben. Die Proben wurden daraufhin für wenige Sekunden anzentrifugiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend, nach erneuter kurzer Zentrifugation, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem Puffersystem nach Laemmli (Towbin et al., 1992) bei einer Feldstärke von 20 V/cm. Durch das Bromphenolblau, welches im Probenpuffer enthalten war, wurde die Lauffront im Gel sichtbar gemacht. Somit konnte die Elektrophorese gestoppt werden, sobald die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

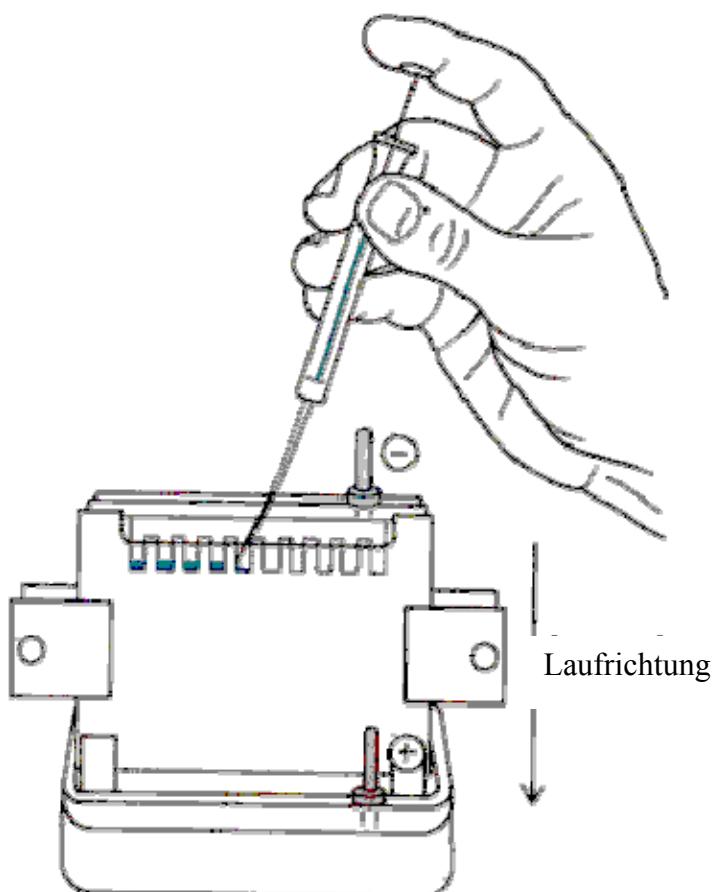


Abb. 5: Schematische Darstellung der Gel-elektrophorese.

Gleiche Mengen an Protein wurden in die jeweiligen Gelspuren aufgetragen. Die Proteine laufen im Gel aufgrund ihrer negativen Ladung zur Kathode und werden entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Auf jedes Gel wurde außerdem ein Proteingrößenmarker (Bio-Rad) aufgetragen. Somit konnten sowohl die elektrophoretische Auftrennung der Proteine als auch der Transfer auf die Nitrozellulosemembran (s. 2.4.6) sichtbar gemacht werden. Zusätzlich konnte die Membran nach dem „Blotting“ an geeigneter Stelle in zwei Hälften geteilt, und somit Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts zeitgleich mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden (s. 2.4.7).

2.4.6 „Blotting“

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Otto, 1993). Der Transfer erfolgte in einem Tank-Elektroblot-System (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bei einer Feldstärke von 20 V/cm für 1 h und 4°C. Nach dem Transfer wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen und die Proteinbanden mit Ponceau S angefärbt. Somit sollte die Effektivität des Proteintransfers beurteilt und gleichzeitig überprüft werden, ob in alle Spuren jeweils die gleiche Menge an Protein aufgetragen worden war. Im Anschluss wurde Ponceau S durch mehrmaliges Waschen mit PBS wieder von der Membran entfernt.

2.4.7 Immunodetektion

Zum Nachweis der einzelnen Proteine wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (s. Abb. 6). Hierzu wurden die Antikörper in 10% Ziegenserum in PBST verdünnt wie in 2.4.2 angegeben. Zwischen jeder Antikörperfexposition wurde die Membran 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Alle Inkubationen fanden für die angegebenen Zeitspannen auf einem Schüttler bei RT statt. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte aufgeführt.

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung	30 min
Inkubation mit Primärantikörper	
polyklonaler Kaninchen anti-αB-Crystallin AK 1:5000 oder	
monoklonaler Maus anti-Hsp72 AK 1:5000 oder	
polyklonaler Kaninchen anti-Aktin AK 1:1000	60 min
3 Waschgänge mit 0,1% Tween-20 in PBS	3 x 5 min
Inkubation mit Sekundärantikörper (nur Hsp72)	
Kaninchen anti-Maus IgG (H+L)	

3 Waschgänge mit 0,1% Tween-20 in PBS	3 x 5 min
Inkubation mit Sekundär- (α B-Crystallin, Aktin) bzw. Tertiärantikörper (Hsp72)	
Peroxidase-konjugiertes Ziegen anti-Kaninchen-IgG (H+L), 1:5000	60 min
3 Waschgänge mit 0,1% Tween-20 in PBS	3 x 5 min
Visualisierung der Immunkomplexe mit	
DAB-Färbung oder	2 min
ECL-Färbung (enhanced Chemilumineszenz)	4 min

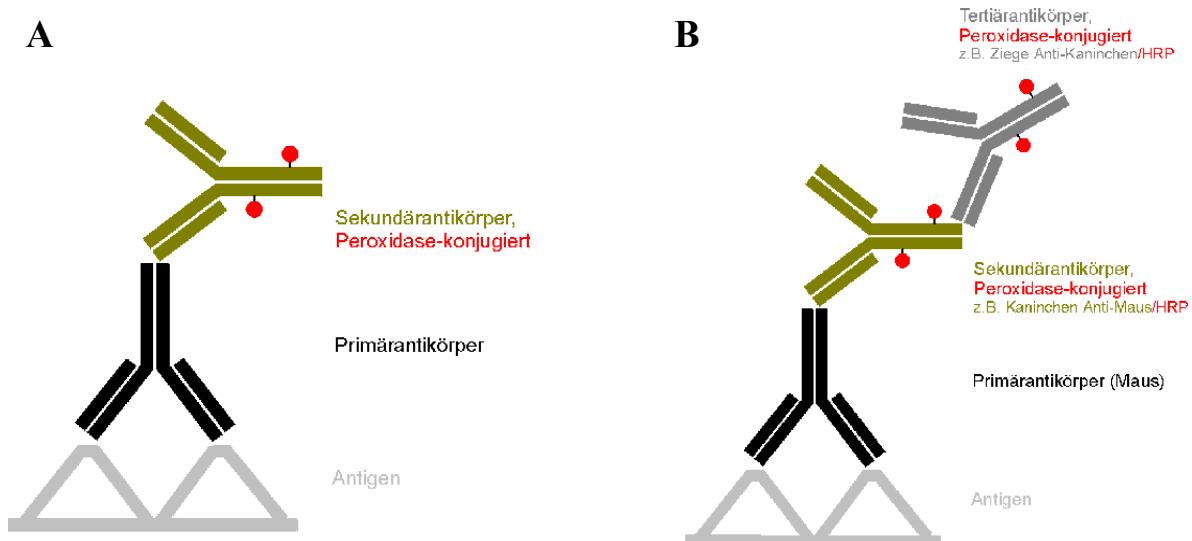


Abb. 6: Schematische Darstellung der Immunodetektion von α B-Crystallin, Aktin (A) und Hsp72 (B). Da zur Detektion von Hsp72 mit einem monoklonalen Maus AK als Primärantikörper inkubiert wurde, musste vor der Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Ziegen anti-Kaninchen AK mit einem Kaninchen anti-Maus AK als Sekundärantikörper inkubiert werden.

Zur Darstellung der Immunkomplexe wurden zwei verschiedene Färbemethoden angewandt. Bei der DAB-Färbung wurde die Membran nach dem letzten Waschgang für 2 min mit DAB-Lösung inkubiert, in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Die Banden stellten sich dabei in brauner Farbe dar. Bei der Chemilumineszenz wurde die Membran für 4 min in einer peroxid- und luminolhaltigen Lösung inkubiert, kurz zum Abtropfen auf ein trockenes Tuch gelegt, in

eine Röntgenkassette platziert und daraufhin ein Röntgenfilm (X-OMAT) aufgelegt. In der Regel wurden die Banden nach 2–5 s sichtbar (s. Abb. 7). Die Intensität der Banden auf der Nitrozellulosemembran und dem Röntgenfilm wurde densitometrisch mittels Image J Software analysiert. Anhand der Aktinbanden konnte beurteilt werden, ob jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren. Zusätzlich konnte die Signalstärke der Proteinbanden zu der der Aktinbanden ins Verhältnis gesetzt und Intensitätsunterschiede durch ungleich aufgetragene Proteinmengen ausgeglichen werden.

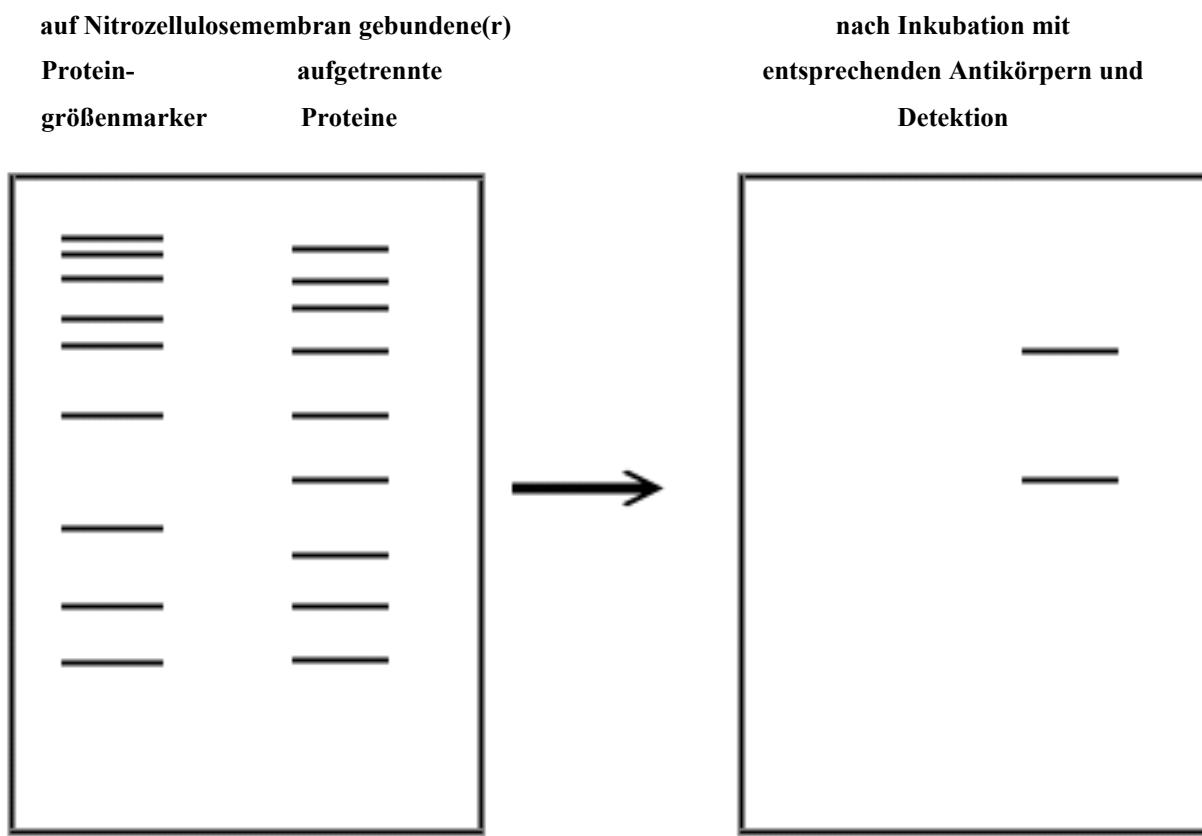


Abb. 7: Schematische Darstellung der Nitrozellulosemembran vor und nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern.

2.4.8 „Stripping“ der Membran

Zum Nachweis weiterer Proteine zusätzlich zu α B-Crystallin (Hsp72 und Aktin) mussten die Immunkomplexe der vorangegangenen Detektionsritte von der Nitrozellulosemembran entfernt werden („stripping“). Hierzu wurde die Membran mit Western Blot Stripping Puffer

(Pierce) unter Schütteln für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss konnte eine erneute Immunodetektion, wie in 2.4.7 beschrieben, vorgenommen werden.

2.4.9 Semiquantitative Western Blot Analyse

Zur semiquantitativen Bestimmung von α B-Crystallin in den verschiedenen Nierenzonen wurden zusätzlich zu den Gewebeproben auch bekannte Mengen von rekombinantem α B-Crystallin Protein (SPP-227, StressGen) in unterschiedlichen Mengen (50-200-500 ng) aufgetragen. Nach densitometrischer Auswertung wurden die Banden der Gewebeproben mit denen der bekannten, rekombinanten Proteinfestigungen verglichen. Somit konnte der α B-Crystallin Gehalt in den Gewebeproben ermittelt werden. Ansonsten wurde verfahren wie unter 2.4.5 bis 2.4.7 beschrieben.

2.5 Immunhistologischer Nachweis von α B-Crystallin in der Rattenniere

2.5.1 Lösungen und Puffer

Blockierungslösung: 1% BSA/0,01% Natriumazid in PBS, pH 7,2

Permeabilisierungslösung: 0,2% Triton X-100 in PBS, pH 7,4 (s. 2.6.1)

Paraformaldehyd, 4% 4 g Paraformaldehyd
100 ml H₂O bidest
Die Substanzen bei 60°C verrühren und NaOH tropfenweise zugeben bis die Lösung klar wird. Anschließend die Lösung abkühlen lassen, filtrieren und bei 4°C aufbewahren.

Immunodetektion: DAB-Färbung, s. 2.4.1

Hämalaun-Lösung: 1 g Hämatoxylin
200 mg NaIO₃
50 g Kalilaun
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure

Die Substanzen wurden mit H₂O bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

2.5.2 Antikörper

Maus anti- α B-Crystallin AK (monoklonal; SPA-222, StressGen), 1:500

Ziegen anti-Maus AK, Peroxidase-konjugiert (Dianova), 1:500

2.5.3 Aufbereitung der Gewebeproben

Die Ratten wurden auf einem beheizten Präpariertisch positioniert. Nach Entnahme der Nieren wurden 2 mm dicke Gewebeschnitte entlang der kortikomedullären Achse angefertigt. Diese wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffineinbettung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Bartels und Mitarbeitern (Anatomisches Institut, Ludwig-Maximilian-Universität München) durchgeführt.

2.5.4 Methodik der Immunhistologie

Die Immunfärbung wurde in Kooperation mit Dr. Negtai Ouang (Abteilung für Nephrologie, Univ.-Prof. Dr. med. Heemann, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München) durchgeführt. Hierzu wurden mit einem Mikrotom 4 μ m dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgebracht. Vor der Immunfärbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, rehydriert und in PBS äquilibriert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation der Schnitte in 0,6% H₂O₂ in Methanol, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, und anschließend eine 30-minütige Behandlung mit 0,1% Triton X-100 in PBS, um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurde mit BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und eine unspezifische Adsorption der Antikörper zu verhindern.

Zur Immunfärbung wurden die Schnitte für 1 h bei RT mit anti- α B-Crystallin AK und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Zwischen den einzelnen Antikörperexpositionen wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Unter optischer Kontrolle erfolgte die Detektion der Peroxidaseaktivität in DAB-Lösung in PBST und daraufhin die Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 min. Im Anschluss wurde die Färbereaktion durch Waschungen mit Leitungswasser gestoppt. Schließlich wurden die Gewebeproben mittels Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland)

eingedeckt und digital fotografiert. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert worden waren.

2.6 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von α B-Crystallin und Zytokeratin in MDCK-Zellen

2.6.1 Lösungen und Puffer

Blockierungslösung: 1% BSA/0,01% Natriumazid in PBS, pH 7,4

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100 in PBS, pH 7,4

2.6.2 Antikörper

Die Antikörper wurden in angegebener Verdünnung in Blockierungslösung verwendet.

Maus anti- α B-Crystallin AK (monoklonal; SPA-222, StressGen), 1:1000

Kaninchen anti-Panzytokeratin AK (polyklonal; sc-15367, Santa Cruz Bio-technologies, Santa Cruz, Californien, USA), 1:200

Ziege anti-Maus-IgG (H+L), Alexa488-konjugiert (polyklonal, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), 1:1000

Ziege anti-Kaninchen-IgG (H+L), CyTM3-konjugiert (Code-Nr.111-165-144, Dianova), 1:1000

2.6.3 Methodik der Immunfluoreszenz

Die MDCK-Zellen wurden in 24-well-Platten kultiviert, wobei in jede Kammer gläserne 12-mm Deckgläser (Merck) eingelegt wurden, die als Objektträger dienten und später die Herausnahme der Zellen ermöglichten. Nachdem ein konfluenter Zellmonolayer gewachsen war, wurden die Zellen entsprechend des unten aufgeführten Versuchsprotokolls behandelt. Das Kammersystem gestattete die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Medien und für unterschiedliche Zeitspannen. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf einem Schüttler bei RT durchgeführt. Die Antikörperexpositionen erfolgten in angegebener Verdünnung in Blockierungslösung und wurden von jeweils drei 5-minütigen Waschgängen in PBS unterbrochen.

3 kurze Waschgänge mit PBS	
Fixierung mit Methanol bei –20°C	15 min
3 Waschgänge mit PBS	3 x 5 min
Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS (pH 7,4)	15 min
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung	60 min
Inkubation mit Primärantikörper	
monoklonaler Maus anti- α B-Crystallin AK (1:1000) oder	
polyklonaler Kaninchen anti-Panzytokeratin AK (1:200)	60 min
3 Waschgänge mit PBS	3 x 5 min
Inkubation mit Sekundärantikörper (lichtgeschützt)	
Alexa488-konjugiertes Ziege anti-Maus-IgG (1:1000) oder	
Cy TM 3-konjugiertes anti-Kaninchen-IgG (1:1000)	60 min
3 Waschgänge mit PBS	3 x 5 min

Zur Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von α B-Crystallin und Panzytokeratin wurden die Zellen zuerst mit anti- α B-Crystallin AK, daraufhin mit anti-Panzytokeratin AK und schließlich mit Alexa488-konjugiertem Ziege anti-Maus-IgG und CyTM3-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG behandelt.

Nach dem abschließenden Waschgang mit PBS erfolgte das Eindecken der Zellen. Hierzu wurde der luftgetrocknete Zellrasen mit FluorSave Reagent (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) benetzt, gläserne Objektträger aufgelegt und über Nacht zum Trocknen bei 4°C stehen gelassen.

2.6.4 Konfokale Lasermikroskopie und Datenaquisition

Zur Auswertung der Ergebnisse diente ein konfokales Lasermikroskop der Firma Olympus (Tokio, Japan) mit entsprechender Software (Fluoview300, Version 3.3). Nach Einsatz der passenden Filter (HQ 585/40M und BA 510/540) und Einstellung der angemessenen Apertur und Laserintensität folgte die Aufnahme der Zellen in 20- und 60-facher Vergrößerung. Die Anregungswellenlänge betrug für den Alexa488-konjugierten Sekundärantikörper 488 nm und für den Cy3-konjugierten Sekundärantikörper 568 nm. Es wurde keine Nachbearbeitung der Bilder vorgenommen.

2.7 Sonstige Materialien und Geräte

Im Folgenden sind Materialien und Geräte aufgelistet, die bei den einzelnen Methoden noch nicht beschrieben wurden.

Pipetten:	10, 20, 100, 200 und 1000 µl Einmal-Pipettenspitzen aus Plastik (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 2 ml Einmal-Pipetten aus Plastik (Greiner) 10 ml Einmal-Pipetten aus Glas (Sarstedt)
Filter:	Einmal-Faltenfilter aus Papier (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) Sterile Membranfilter (Porengröße 0,2 µm; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)
Brutschränke:	Binder, Tuttlingen, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttler:	Unimax 1010 (Heidolph, Kelheim, Deutschland)
Spannungsgeräte:	Model 1000/500 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Magnetrührer:	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparaturen:	Agarose-Gelelektrophoresekammer Vertikale SDS-Gelelektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
Tank-Elekroblot-System:	Modell EB10 (Peqlab)

Thermomixer:	Modell 5435 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Thermoblock:	Unitek TM HBS130IE (Scientific Plastics, Milton Keynes, Großbritannien)
Waagen:	PC 4400 (Mettler, Greifensee, Schweiz) AC 88 mit Glaswindschutz (Mettler)
Zentrifugen:	Universal 16 R (Hettlich, Tuttlingen, Deutschland) Universal K2S (Hettlich)
Vortexer:	IKA Vibrofix VF1-electronic (Janke & Kunkel)
Trockenschrank:	Heraeus
(Tief-)Kühlschränke:	Kühlschrank (privileg, Fürth, Deutschland) Kühlschrank (Siemens) Tiefkühlschrank (Heraeus) Tiefkühlschrank (AEG)
Autoklav:	Typ ELV-3870 (Systec, Wettenberg, Deutschland)

2.8 Statistische Auswertung und Präsentation der Daten

Alle Daten wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben und als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Es wurde der t-Test nach Student für zwei unabhängige Stichproben bzw. für eine Stichprobe (SPSS, Chicago, IL, USA) verwendet, um die Versuchsgruppen zu vergleichen. Ergab sich für das Signifikanzniveau ein

p-Wert < 0.05, wurde angenommen, dass sich die verglichenen Versuchsgruppen voneinander statistisch signifikant unterschieden.

3. Ergebnisse

3.1 Intrarenale Verteilung von α B-Crystallin in Kortex, Außen- und Innenmark der normalen Rattenniere

Die intrarenale Verteilung von α B-Crystallin in den verschiedenen Nierenzonen der normalen Rattenniere wurde mittels Northern und Western Blot Analyse untersucht. Zur Untersuchung der α B-Crystallin-Expression auf mRNA- und Proteinebene wurden Gewebehomogenate verschiedener Nierenzonen (Kortex, Innenmark, Außenmark) der Rattenniere hergestellt. Mithilfe der semiquantitativen Western Blot Analyse konnte der α B-Crystallin Proteingehalt in den einzelnen Nierenzonen ermittelt werden.

3.1.1 Expression auf mRNA-Ebene

Die Northern Blot Analyse zeigte eine ansteigende α B-Crystallin mRNA-Expression vom Nierenkortex bis zum Niereninnenmark (Abb. 8). Während im Kortex nur wenig α B-Crystallin mRNA detektiert werden konnte, zeigte sich eine deutliche α B-Crystallin mRNA-Expression im Außenmark und eine massive α B-Crystallin mRNA-Expression im Innenmark der Rattenniere. Die densitometrische Auswertung ergab, dass der α B-Crystallin mRNA-Gehalt im Innenmark das 4-fache des Außenmarks und das 11-fache des Kortex betrug.

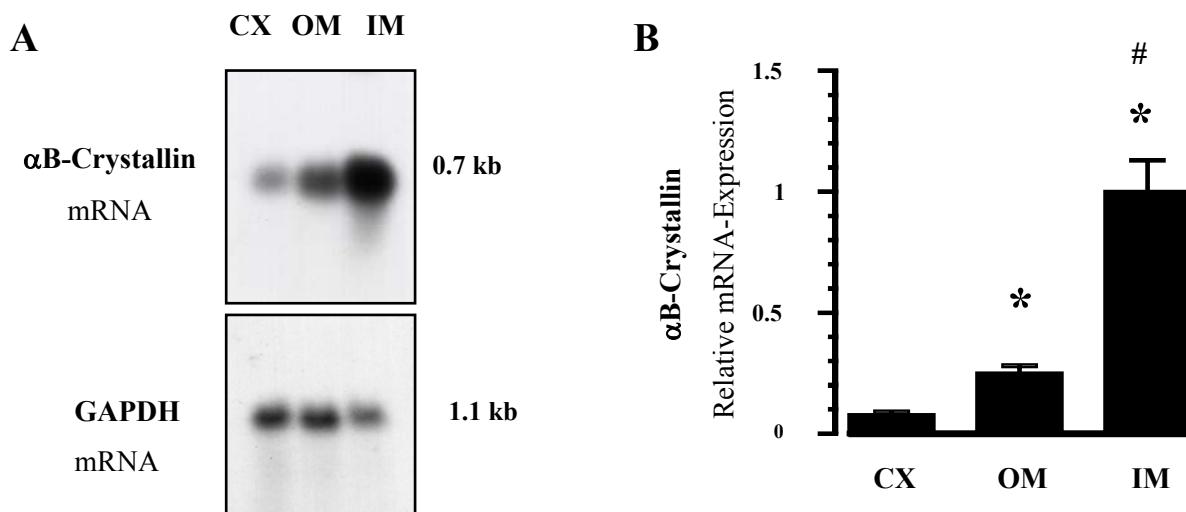


Abb. 8 (S.42): Expression von α B-Crystallin mRNA in den verschiedenen Zonen der normalen Rattenniere. Northern Blot Analyse zur Ermittlung des α B-Crystallin mRNA-Gehalts in Kortex (CX), Außenmark (OM) und Innenmark (IM). Die densitometrischen Daten für α B-Crystallin wurden auf GAPDH normalisiert, um Unterschiede in der aufgetragenen RNA-Menge auszugleichen. A Repräsentativer Northern Blot; B Auswertung der Ergebnisse. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 4; * P<0,05 vs. CX; #P<0,05 vs. OM und CX.

3.1.2 Semiquantitativer Nachweis auf Proteinebene

Die Western Blot Analyse ergab für α B-Crystallin eine ähnliche intrarenale Verteilung wie die Northern Blot Analyse für α B-Crystallin mRNA (Abb. 9). Während im Nierenkortex nur sehr geringen Mengen α B-Crystallin Protein ($1,93 \pm 0,06$ ng pro μ g Gesamtprotein) detektiert werden konnten, betrug die α B-Crystallin Konzentration im Außenmark $8,32 \pm 1,38$ ng pro μ g Gesamtprotein und im Innenmark $19,92 \pm 1,63$ ng pro μ g Gesamtprotein. So zeigte sich ein mehr als 2-fach höherer α B-Crystallin Proteingehalt im Niereninnenmark als im Außenmark und ein 10-fach höherer als im Kortex. Somit macht α B-Crystallin Protein im Niereninnenmark etwa 2% des gesamten Zellproteins der Nierenpapille aus.

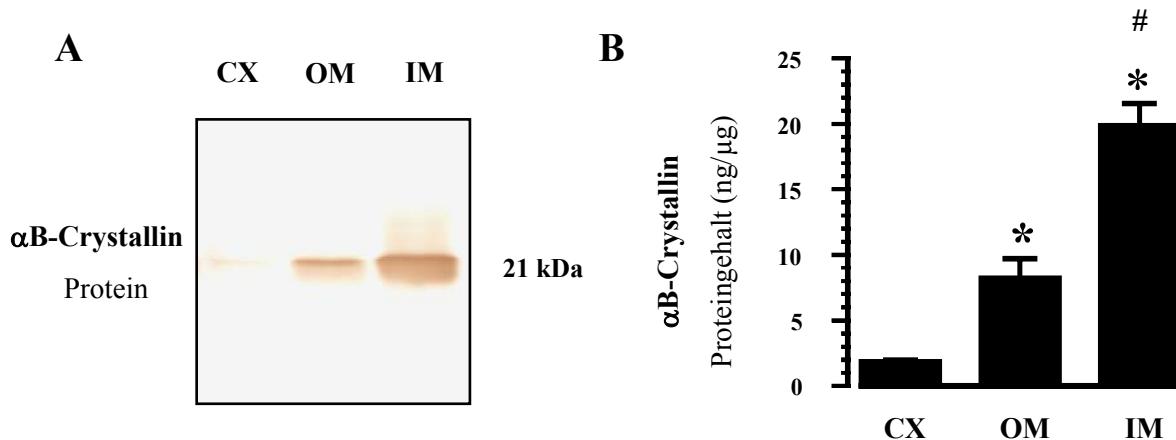
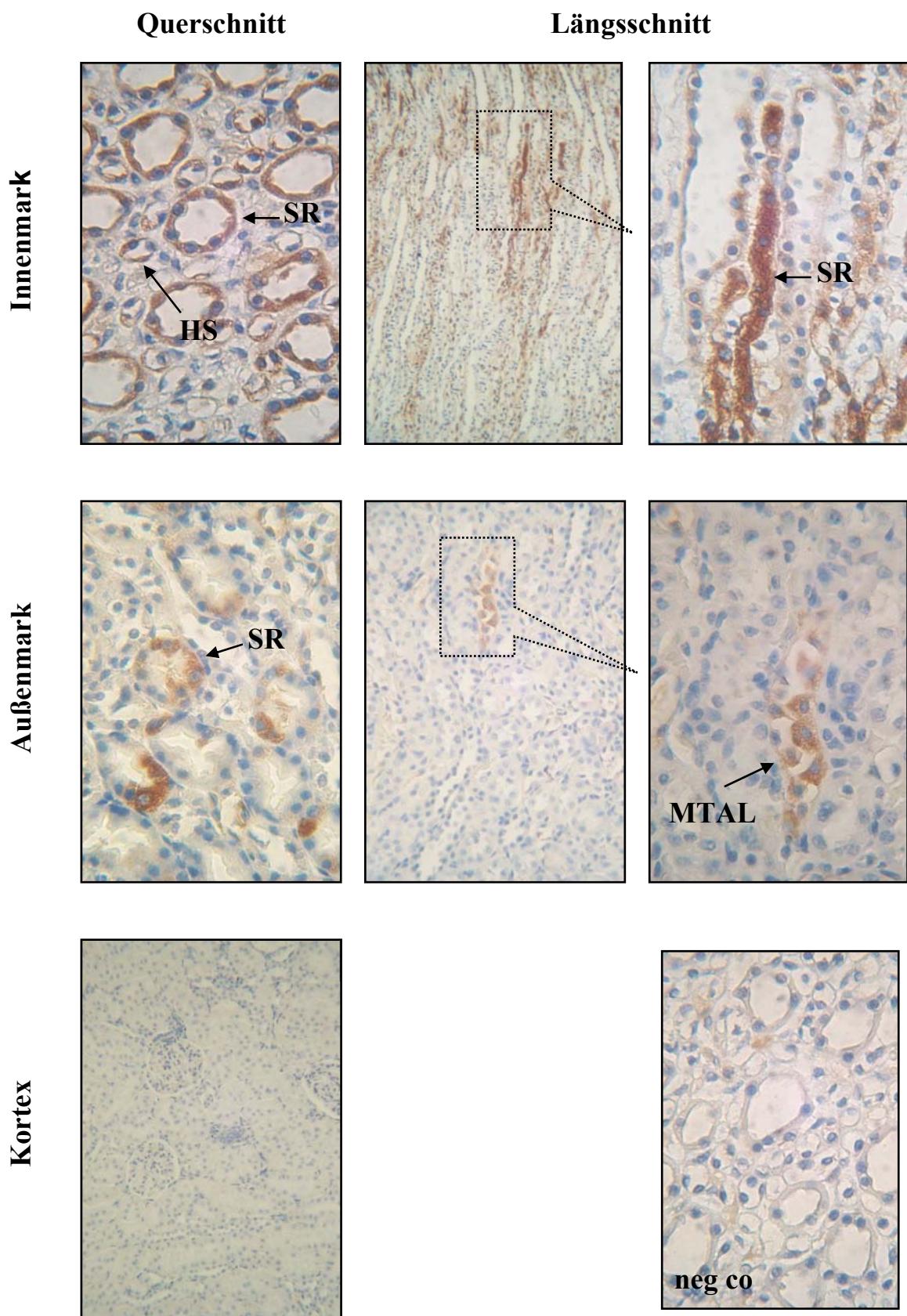


Abb. 9: Expression von α B-Crystallin Protein in den verschiedenen Zonen der Rattenniere. Aus Gewebehomogenaten von Kortex (CX), Außen- (OM) und Innenmark (IM) wurden jeweils gleiche Mengen an Protein auf das Gel aufgetragen. Der α B-Crystallin Proteingehalt in Kortex, Außenmark und Innenmark konnte darauf mittels semiquantitativer Western Blot Analyse ermittelt werden. A Repräsentativer Western Blot; B Quantifizierung der Ergebnisse. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 4; * P<0,05 vs. CX; #P<0,05 vs. OM und CX.

3.1.3 Immunhistologischer Nachweis in der Rattenniere

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Northern und Western Blot Analysen zeigte sich in den immunhistologischen Untersuchungen im Niereninnenmark eine stärkere α B-Crystallin Expression als im Außenmark. Im Nierenkortex konnte α B-Crystallin nicht detektiert werden. Der immunhistologische Nachweis von α B-Crystallin ermöglichte zusätzlich dessen genauere Lokalisation und Zuordnung zu einzelnen Gewebestrukturen. Während im Nierenkortex weder glomeruläre noch tubuläre Strukturen α B-Crystallin Immunoreaktivität aufwiesen, war in der Papille eine intensive α B-Crystallin-Färbung zu beobachten. Diese zeigte sich vor allem in den Epithelzellen der medullären Sammelrohre und in den dünnen Schenkeln der Henle-Schleife. Im Außenmark wurden vereinzelt Sammelrohrepithelien angefärbt. Interstitielle Strukturen färbten sich weder im Kortex noch im Außen- oder Innenmark an.

Abb.10 (S.45): Immunhistologischer Nachweis von α B-Crystallin in der normalen Rattenniere. Es wurden 4 μ m dicke Paraffinschnitte von Rattennieren hergestellt, die vorher weder diuretisch noch antidiuretisch behandelt worden waren. Die Gewebeproben wurden mit dem α B-Crystallin Antikörper inkubiert und mit Hämalaun gegengefärbt. Gezeigt ist die mikroskopische Ansicht von Quer- und Längsschnitten durch Kortex, Außen- und Innenmark. Kortex: Keine α B-Crystallin Immunoreaktivität. Außenmark: Stellenweise α B-Crystallin Nachweis in einzelnen Sammelrohren und dünnen Schenkeln der Henle-Schleife. Innenmark (Papille): Starke α B-Crystallin Immunoreaktivität in Sammelrohren und in dünnen und dicken Schenkeln der Henle-Schleife. neg co, Negativkontrolle (Papille, Querschnitt), bei der nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. SR, Sammelrohr; HS, Henle-Schleife; MTAL, dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife.



3.2 Intrarenale α B-Crystallin mRNA Expression in der Rattenniere in Abhängigkeit vom Diuresezustand

Um zu überprüfen, ob Veränderungen der Umgebungsosmolalität die intrarenale α B-Crystallin Expression beeinflussen, wurde die α B-Crystallin mRNA Expression bei chronischer Diurese untersucht. Zur Induktion einer Diurese erhielten die Versuchsratten drei Tage lang eine 3%-ige Saccharoselösung zu Trinken, während den Kontrollratten Trinkwasser ohne Saccharosezusatz zur Verfügung stand. Anschließend wurde der α B-Crystallin mRNA-Gehalt im Innen- und Außenmark der Rattennieren ermittelt und mit dem der Kontrollratten verglichen. Wie in Abb. 11 dargestellt ist, zeigte sich im Innen- und Außenmark ein von den Kontrollbedingungen signifikant reduzierter α B-Crystallin mRNA-Gehalt. Nach dreitägiger Diurese war bei den Versuchstieren der α B-Crystallin mRNA-Gehalt im Innenmark um 46% und im Außenmark um 27% gesunken. Um die Diurese zu verifizieren wurde während der Versuche Urin gewonnen und dessen Osmolalität bestimmt. Die Urinosmolalität fiel von 860 mosm/kg H₂O unter Kontrollbedingungen auf 253 mosm/kg H₂O während Diurese ab, was für eine effektive Diurese sprach (s. Abb. 12).

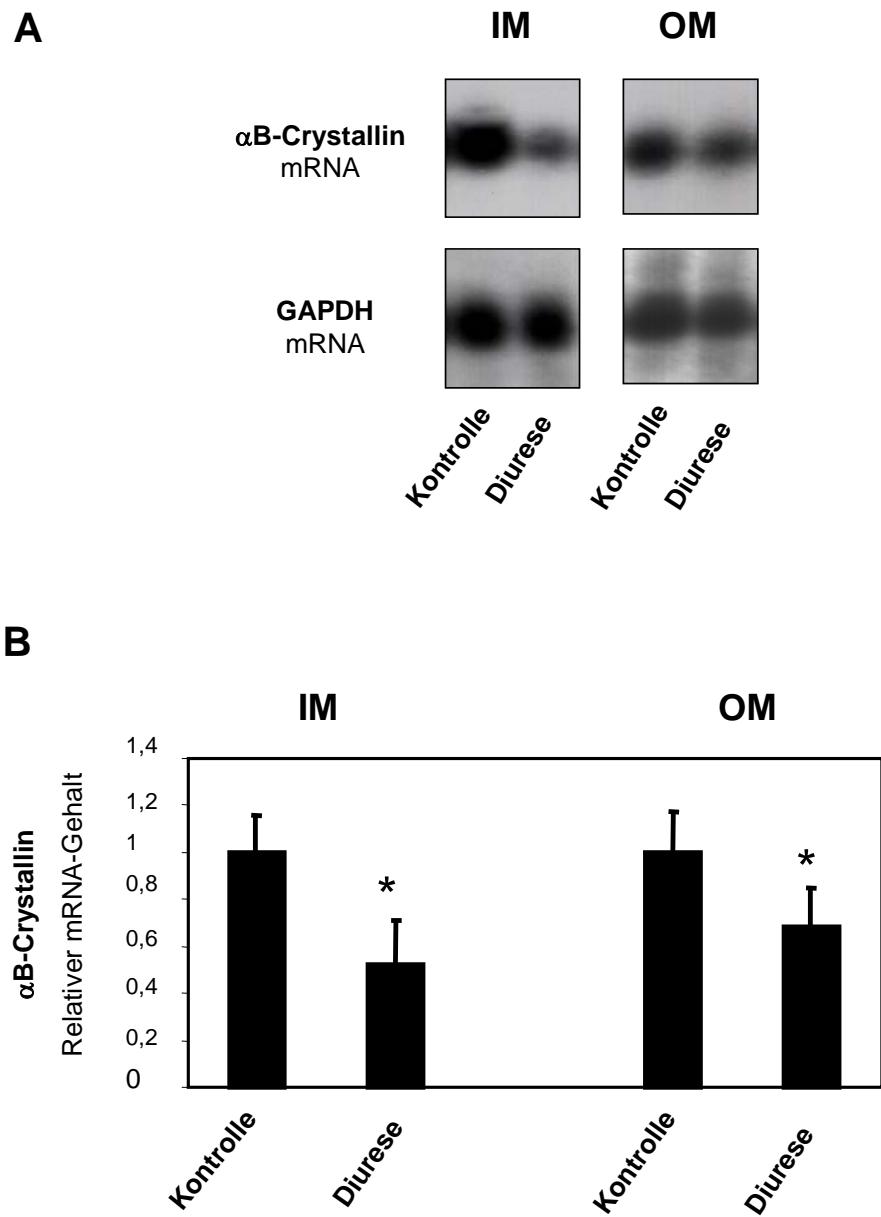


Abb. 11: Effekt der Diurese auf die medulläre α B-Crystallin mRNA Expression in der Ratteniere. Nach den Versuchen wurde die Expression von α B-Crystallin mRNA mittels Northern Blot Analyse im Außen- und Innenmark bestimmt. Nach der Hybridisierung mit der α B-Crystallin-Sonde wurde das Blot mit einer GAPDH-Sonde rehybridisiert. Durch die Normalisierung mit GAPDH wurden bei der Auswertung Unterschiede durch ungleich aufgetragene RNA-Mengen ausgeglichen. IM, Innenmark; OM, Außenmark; A Repräsentative Northern Blots; B Quantitative Darstellung nach Normalisierung auf GAPDH. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 4; *P<0.05 vs. Kontrolle der jeweiligen Nierenzone.

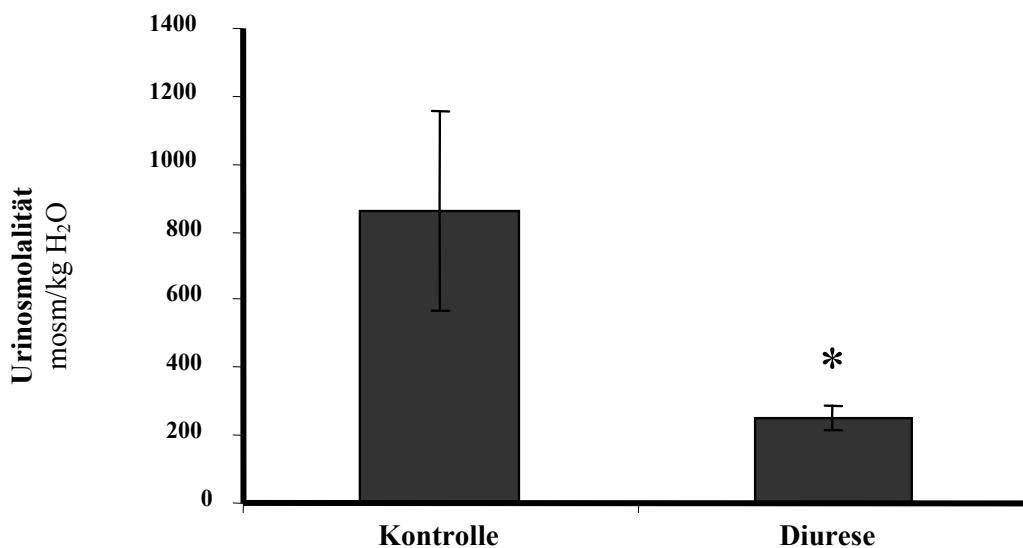


Abb. 12: Urinosmolalität unter Kontrollbedingungen und in Diurese. Bei diuretischen Ratten und Kontrollratten wurde Urin gewonnen und dessen Osmolalität mittels Dampfdruckosmometer (Wescor) bestimmt, um die Diurese zu verifizieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für n = 4 angegeben; *P<0.05 vs. Kontrolle.

3.3 Induktion von α B-Crystallin und Hsp72 durch NaCl, Harnstoff und Raffinose in MDCK-Zellen

In-vitro-Versuche sollten die Induzierbarkeit der α B-Crystallin und Hsp72 Expression durch Hyperosmolalität bzw. Hypertonizität auf mRNA- (nur α B-crystallin) und Protein-Ebene (α B-Crystallin und Hsp72) untersuchen. Hierzu wurden MDCK-Zellen für die angegebenen Zeitspannen in hyperosmolarem Medium inkubiert (s. 2.2.5), dem NaCl, Harnstoff oder Raffinose bis zu einer Endosmolalität von 500 mosm/kg H₂O zugegeben worden waren. Im Anschluss wurde der α B-Crystallin- bzw. Hsp72-Gehalt mittels Northern und Western Blot Analyse ermittelt.

3.3.1 Induktion auf mRNA-Ebene

Die Expression der α B-Crystallin mRNA wurde nach ein- und dreitägiger NaCl-, Harnstoff- und Raffinose-Exposition untersucht und mit der von MDCK-Zellen verglichen, die während dieser Zeitspanne in isotonem Medium kultiviert worden waren. Aufgrund der maximalen Inkubationzeit von drei Tagen fand bei diesen Versuchen kein Mediumwechsel statt.

Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigte sich bei der Behandlung mit NaCl und Harnstoff nach dreitägiger Inkubation eine von den isotonen Kontrollen signifikant unterschiedliche α B-Crystallin mRNA-Induktion. Diese war 2,5- bzw. 2-fach höher als unter Kontrollbedingungen. Nach eintägiger Inkubation konnte unter NaCl- und Harnstoff-Exposition noch keine signifikante α B-Crystallin mRNA-Induktion beobachtet werden.

Bei der Behandlung mit Raffinose wurde eine von den Kontrollen signifikant höhere α B-Crystallin mRNA-Induktion bereits vom ersten Tag an beobachtet. Diese stieg allerdings vom ersten bis zum dritten Tag nicht mehr signifikant an. In den Kontrollzellen blieb eine signifikante α B-Crystallin mRNA-Induktion aus. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der α B-Crystallin mRNA-Induktion zwischen erstem und drittem Tag festgestellt werden.

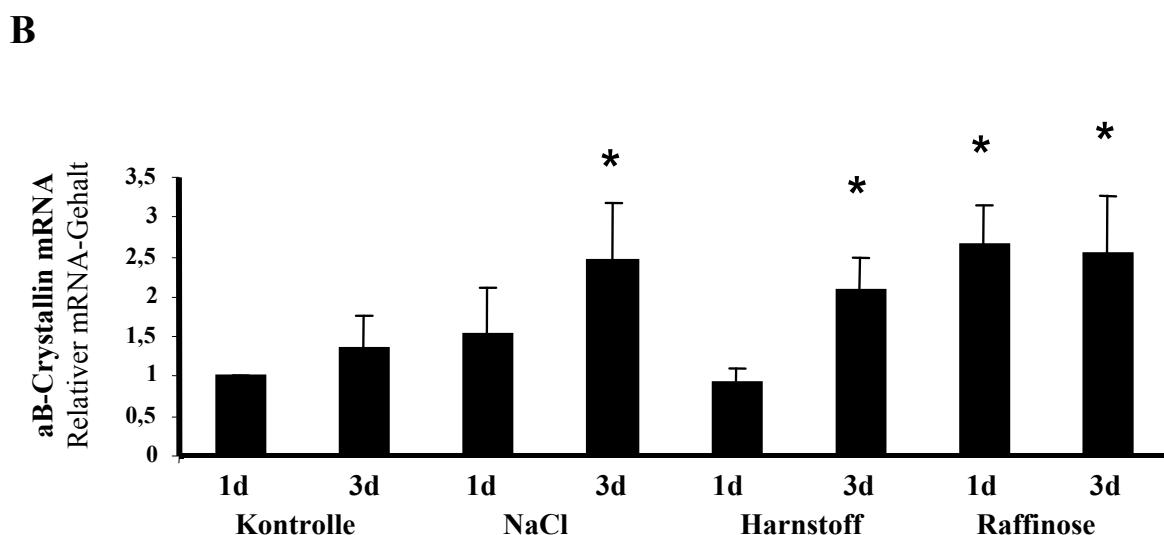
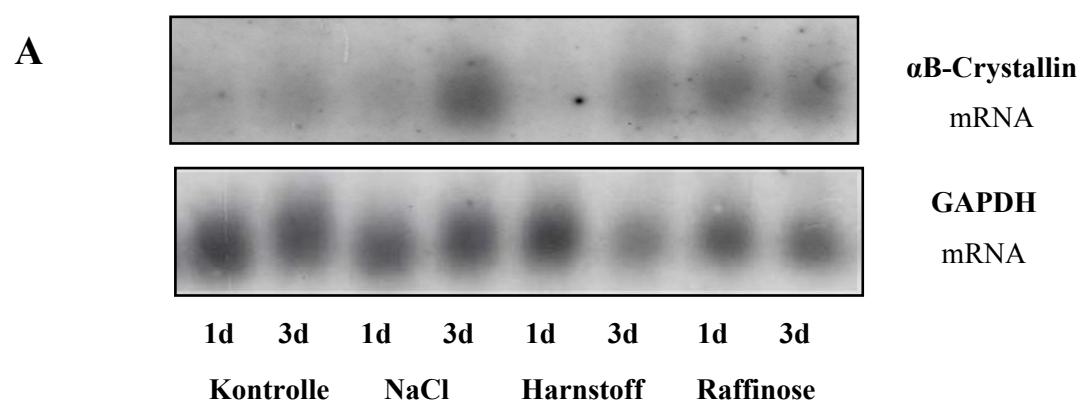


Abb. 13: Effekt von NaCl, Harnstoff und Raffinose auf die α B-Crystallin mRNA-Expression in MDCK-Zellen. Die MDCK-Zellen wurden für einen Tag bzw. drei Tage in hyperosmolarem Medium (Endosmolalität 500 mosm/kg H₂O durch Zugabe von 100 mM NaCl, 200 mM Harnstoff oder 200

mM Raffinose) kultiviert. Der ermittelte α B-Crystallin mRNA-Gehalt wurde daraufhin mit dem von in isotonem Kontrollmedium (300 mosm/kg H₂O) inkubierten MDCK-Zellen verglichen. Unterschiede in der aufgetragenen RNA-Menge wurden durch die Normalisierung mit GAPDH ausgeglichen. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n = 4; *P<0.05 vs. Kontrolle 1 d.

3.3.2 Induktion auf Proteinebene

Die α B-Crystallin Proteinexpression wurde nach ein-, zwei- und dreitägiger Inkubation in hyperosmolarem Medium (500 mosm/kg H₂O durch NaCl-, Harnstoff- oder Raffinose-Zugabe) mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 14). Die α B-Crystallin Proteinexpression sollte mit dem Expressionsmuster des TonEBP Zielgens Hsp72 verglichen werden, einem unter hyperosmolaren Stressbedingungen bereits genauer charakterisierten Hsp (Neuhöfer et al., 2001; Rauchman et al., 1997). Daher wurde die Nitrozellulosemembran gestript und mit anti-Hsp72 AK inkubiert. Das Hsp72-Expressionsmuster der früheren Untersuchungen konnte bestätigt werden (Neuhöfer et al., 1999b). Eine im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant erhöhte Hsp72-Proteinexpression zeigte sich bei der Behandlung der Zellen mit NaCl und Raffinose, nicht jedoch mit Harnstoff. Dabei führte die NaCl-Exposition zu einer stärkeren Hsp72-Expression als Raffinose.

Für α B-Crystallin zeigte sich ähnlich wie für Hsp72 bei NaCl- und Raffinose-Exposition eine von den Kontrollbedingungen signifikant unterschiedliche Proteinexpression. Im Versuchsverlauf nahm der α B-Crystallin Proteingehalt vom ersten bis zum dritten Tag zu, wobei ab dem zweiten Tag eine deutlich erhöhte α B-Crystallin Expression nachgewiesen werden konnte. Die α B-Crystallin Expression überstieg unter NaCl- und Raffinose-Behandlung jedoch nicht die von Hsp72.

Anders als bei Hsp72 kam es auch bei Harnstoff-Exposition zu einem signifikanten Anstieg der α B-Crystallin Expression. Dieser war allerdings geringer ausgeprägt als bei NaCl- und Raffinose-Exposition. Unter allen drei Versuchsbedingungen fiel die im zeitlichen Verlauf zunehmende α B-Crystallin Expression auf, wohingegen Hsp72 bereits am ersten Tag stark induziert wurde und dessen Expression bis zum dritten Tag nicht zunahm (s. Abb. 14).

Unter Kontrollbedingungen nahm die α B-Crystallin Expression ebenfalls leicht zu, erreichte jedoch nicht die Ausmaße wie bei NaCl-Exposition.

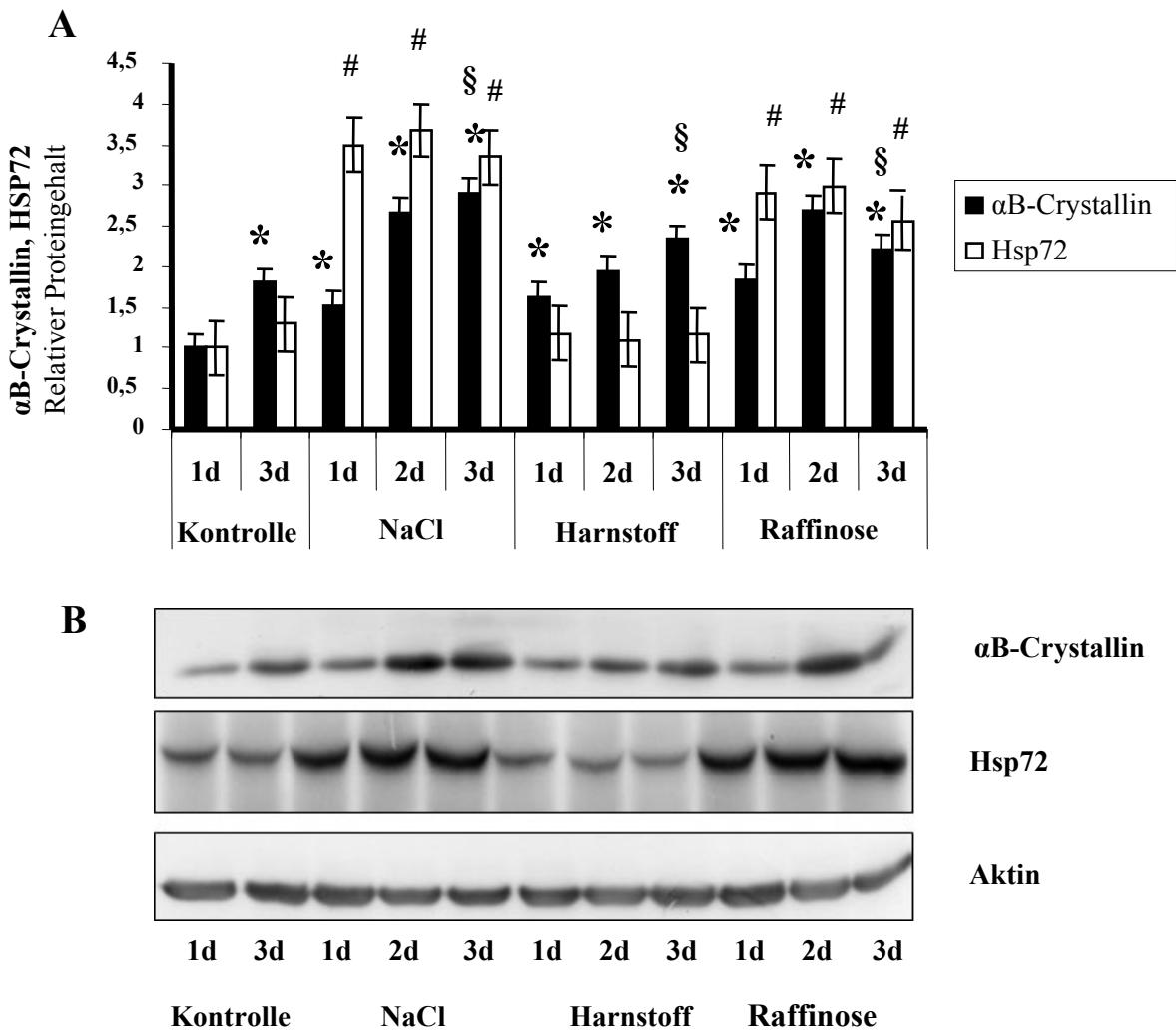


Abb. 14: Effekt von NaCl, Harnstoff und Raffinose auf die α B-Crystallin und Hsp72 Proteinexpression in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden für die angegebenen Zeitspannen in hyperosmolarem Medium oder Kontrollmedium kultiviert (vgl. Legende zu Abb. 13). Anschließend wurden der α B-Crystallin- und Hsp72-Gehalt mittels Western Blot Analyse ermittelt und densitometrisch ausgewertet. Zum Nachweis, dass gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden, wurde die Nitrozellulosemembran gestript und anschließend mit einem anti-Aktin AK inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM für $n = 6$; * $P < 0.05$ vs. α B-Crystallin Kontrolle 1 d; $^{\$}P < 0.05$ vs. α B-Crystallin Kontrolle 3 d; $^{#}P < 0.05$ vs. Hsp72 Kontrolle 1 d.

3.4 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von α B-Crystallin und Zytokeratin in MDCK-Zellen

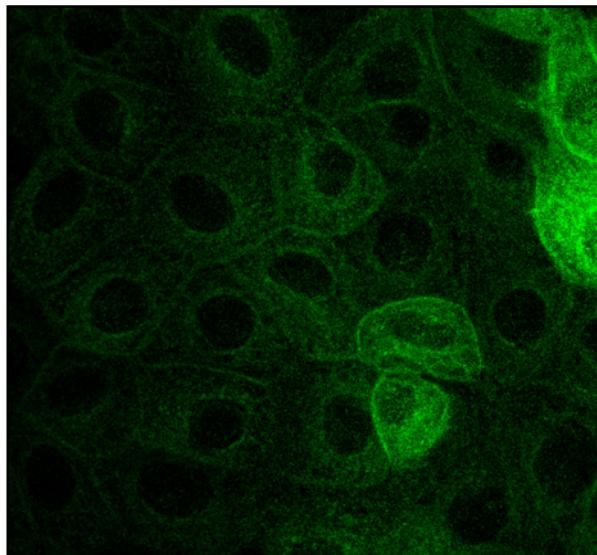
Um die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung von α B-Crystallin unter isotonen Bedingungen und bei hypertonomem Stress zu beurteilen und um die Ergebnisse aus Northern und Western Blot Analysen zu bestätigen, wurde die intrazelluläre Verteilung von α B-Crystallin mit einer Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Des Weiteren sollte anhand eines immunfluoreszenzmikroskopischen Doppelnachweises von α B-Crystallin und Zytokeratin untersucht werden, ob es bei hypertonomem Stress zu einer Assoziation von α B-Crystallin an Strukturen des Zytoskeletts kommt (van de Klundert et al., 1998). Hierzu wurden MDCK-Zellen für die jeweils angegebenen Zeitspannen (ein bis drei Tage) in hyperosmolarem Medium, das NaCl oder Harnstoff in angebener Konzentration enthielt, kultiviert. Anschließend wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit den jeweiligen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollen für die Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff dienten MDCK-Zellen, die für den entsprechenden Zeitraum in isotonem Medium inkubiert worden waren.

3.4.1 Intrazelluläre Verteilung von α B-Crystallin

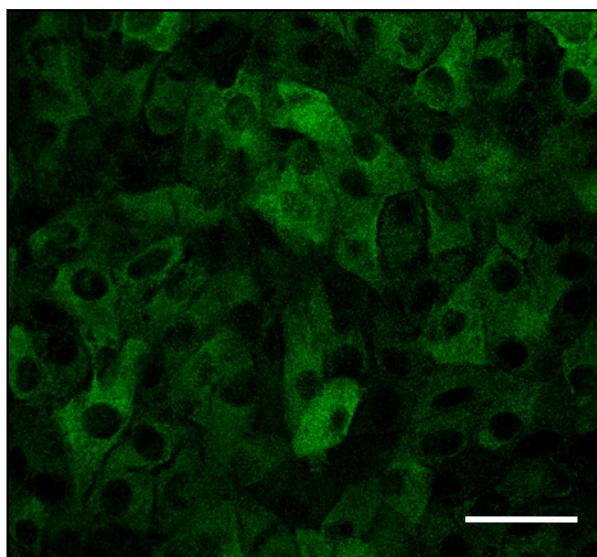
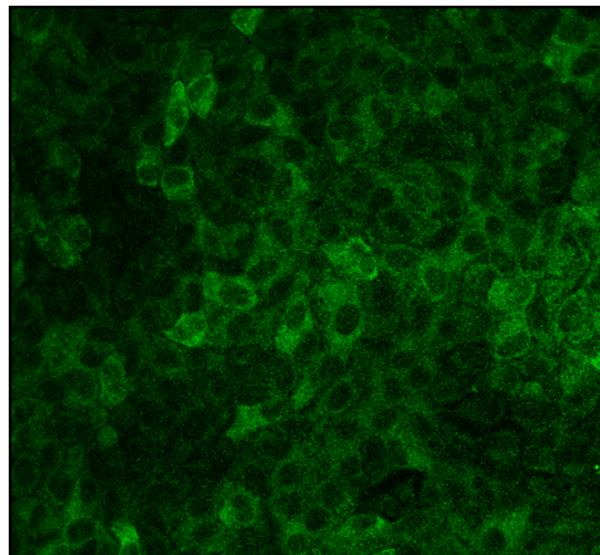
α B-Crystallin war sowohl bei den in isotonem Medium kultivierten als auch bei den NaCl- und Harnstoff-behandelten MDCK-Zellen fast ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar. Es fand sich eine relativ homogene zytoplasmatische Verteilung, wobei die α B-Crystallin Expression keinen bestimmten zellulären Strukturen zugeordnet werden konnte. Der Zellkern blieb von der Färbung weitestgehend ausgespart. Es zeigte sich keine Assoziation von α B-Crystallin an Strukturen der Zellmembran (s. Abb. 15).

Nach der Behandlung mit NaCl und Harnstoff wurden morphologische Zellveränderungen beobachtet. So nahmen die MDCK-Zellen unter dem Einfluss von NaCl eine rundliche Gestalt an und flachten ab, wodurch sie größer erschienen als die Kontrollzellen. Sie imponierten regelmäßig angeordnet im Zellverband. Die Harnstoff-behandelten MDCK-Zellen hingegen waren kleiner und zeigten Unregelmäßigkeiten in Gestalt, Größe und Anordnung (s. Abb. 15).

NaCl



Harnstoff



Kontrolle

Abb. 15: Intrazelluläre Verteilung von α B-Crystallin in MDCK-Zellen nach NaCl- und Harnstoff-Exposition. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung morphologischer Unterschiede von MDCK-Zellen nach NaCl- und Harnstoff-Exposition. Zu Kultivierungsbedingungen vgl. Legende von Abb. 16. 60-fache Vergrößerung. Der Balken entspricht 200 μ m.

3.4.2 α B-Crystallin nach Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse (s. 3.2.2 und Abb. 14) zeigte die Immunfluoreszenzmikroskopie unter NaCl- und Harnstoff-Exposition eine ansteigende α B-Crystallin Expression vom ersten bis zum dritten Tag. Dabei war unter dem Einfluss von NaCl eine stärkere und unter dem von Harnstoff eine schwächere Färbung für α B-Crystallin zu beobachten. Unter allen Versuchsbedingungen lag die α B-Crystallin Expression jedoch deutlich über der unter Kontrollbedingungen, bei denen α B-Crystallin nur in geringem Maße nachweisbar war (s. Abb. 16). Das zytoplasmatische Verteilungsmuster von α B-Crystallin änderte sich unter dem Einfluss von NaCl oder Harnstoff nicht.

3.4.3 Zytokeratin nach Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff

Zytokeratin stellt ein Hauptfilament des Zytoskeletts dar und ist im Nierengewebe in großen Mengen vorhanden (Oosterwijk et al., 1990). Es gibt eine Reihe von Antikörpern mit einer Spezifität für einzelne Zytokeratine, mehrere Zytokeratine und Zytokeratingruppen. Panzytokeratin wurde als epithelialer Marker gewählt, da es alle Zytokeratine nachweist. Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von Zytokeratin in MDCK-Zellen ergab unter Kontrollbedingungen eine sehr schwache Zytokeratin-Expression und eine diffuse zelluläre Verteilung mit Betonung der Zellgrenzen. Anders als α B-Crystallin reicherte sich Zytokeratin sowohl bei erhöhten NaCl- als auch Harnstoffkonzentrationen an den Zellgrenzen an, die deutlich hervortraten, und nahm von den submembranösen Strukturen zur Zellmitte hin ab (s. Abb. 17). Die Zytokeratin-Expression nahm nach NaCl- und Harnstoffbehandlung der MDCK-Zellen zu, erreichte jedoch nicht die Ausmaße der α B-Crystallin Expression bei hypertonomem Stress. Das Lokalisationsmuster der Zytokeratinexpression verhielt sich unter NaCl-Exposition ähnlich wie bei Harnstoff (s. Abb. 17).

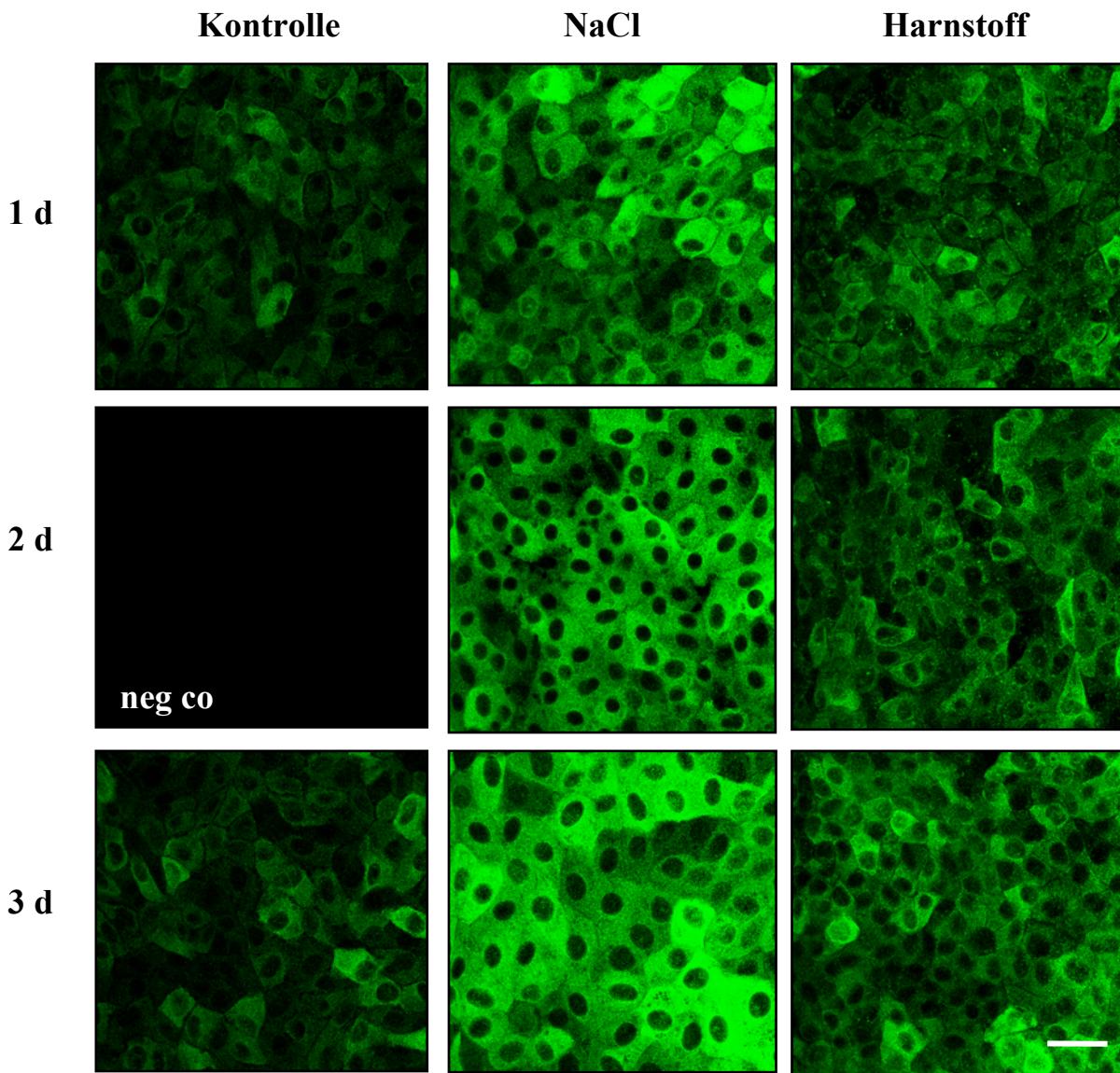


Abb. 16: Nachweis von α B-Crystallin in MDCK-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie. MDCK-Zellen wurden für ein, zwei und drei Tage in isotonem Medium (300 mosm/kg H₂O, Kontrolle) oder in hypertonomem Medium (500 mosm/kg H₂O durch Zugabe von NaCl bzw. Harnstoff) kultiviert und anschließend mit monoklonalem anti- α B-Crystallin AK (Primärantikörper) und polyklonalem Alexa488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG (Sekundärantikörper) inkubiert. Die linke Bilderspalte zeigt die MDCK-Zellen unter Kontrollbedingungen, die mittlere die nach NaCl-Exposition und die rechte die nach Harnstoff-Behandlung. Die Anordnung erfolgte nach ansteigenden Inkubationszeiten Tag 1 (oben) bis Tag 3 (unten). *neg co* Negativkontrolle, bei der die Inkubation mit dem Primärantikörper entfiel. 60-fache Vergrößerung. Der Balken im Bild rechts unten entspricht 200 μ m.

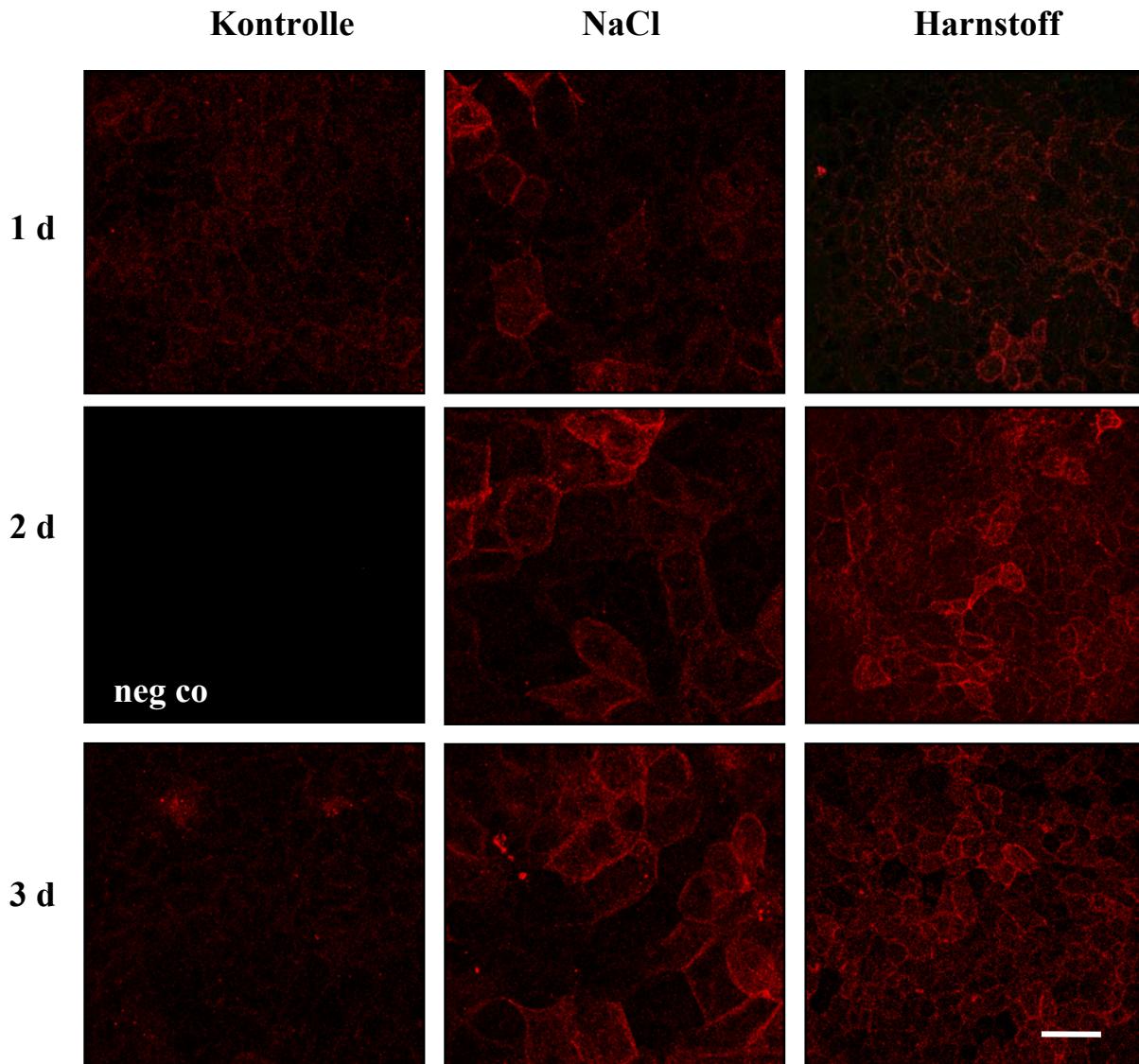


Abb. 17: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Zytokeratin in MDCK-Zellen. Die Zellen wurden behandelt wie in der Legende von Abb. 16 beschrieben und anschließend mit polyklonalem Kaninchen anti-Panzytokeratin AK (Primärantikörper) und Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Gezeigt sind die Ergebnisse nach ein-, zwei- und dreitägiger Inkubation mit NaCl und Harnstoff und in isotonem Medium (Kontrolle). *neg co* Negativkontrolle, bei der die Inkubation mit dem Primärantikörper entfiel. Bei 60-facher Vergrößerung entspricht der Balken 200 µm.

3.4.4 Untersuchungen zur Co-Lokalisation von α B-Crystallin und Zytokeratin bei hypertonomem Stress in MDCK-Zellen

In verschiedenen Untersuchungen hat sich unter Stressbedingungen wie z. B. bei Hitzeschock oder saurem Umgebungs-pH eine Assoziation von α B-Crystallin an zytoskelettale Strukturen gezeigt (Bennardini et al., 1992; Muchowski et al., 1999). Co-Lokalisationsnachweise in anderen als renalen Zelllinien demonstrieren unter Stressbedingungen eine Umorganisation des Intermediärfilament-Netzwerkes und beschrieben eine begleitende Anlagerung von α B-Crystallin (van de Klundert et al., 1998). So wurde in renalen Epithelzellen ebenfalls eine Interaktion zwischen α B-Crystallin und zytoskeletalen Strukturen bei hypertonomem Stress vermutet. Zur Untersuchung dieser Frage wurden MDCK-Zellen in isotonem und hypertonomem Medium inkubiert und anschließend eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für α B-Crystallin und Panzytokeratin durchgeführt. Durch den kombinierten Einsatz passender Filter war die gleichzeitige Darstellung von α B-Crystallin und Zytokeratin in der gleichen Zelle möglich. Wie in Abb. 17 dargestellt ist, zeigte sich im Vergleich zu Kontrollbedingungen unter NaCl- und Harnstoff-Exposition ein Anstieg der α B-Crystallin und Zytokeratin-Expression (vgl. hierzu auch 3.4.2 und 3.4.3). α B-Crystallin war sowohl in isoton als auch in hyperton kultivierten MDCK-Zellen größtenteils im Zytoplasma nachweisbar, während Zytokeratin vorwiegend an den Zellmembranen, teilweise auch im Zytoplasma und in den Zellkernen lokalisiert war. Eine Co-Lokalisation der α B-Crystallin und Zytokeratin-Expression bei hypertonomem Stress konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich vielmehr ein inverses zelluläres Expressionsmuster.

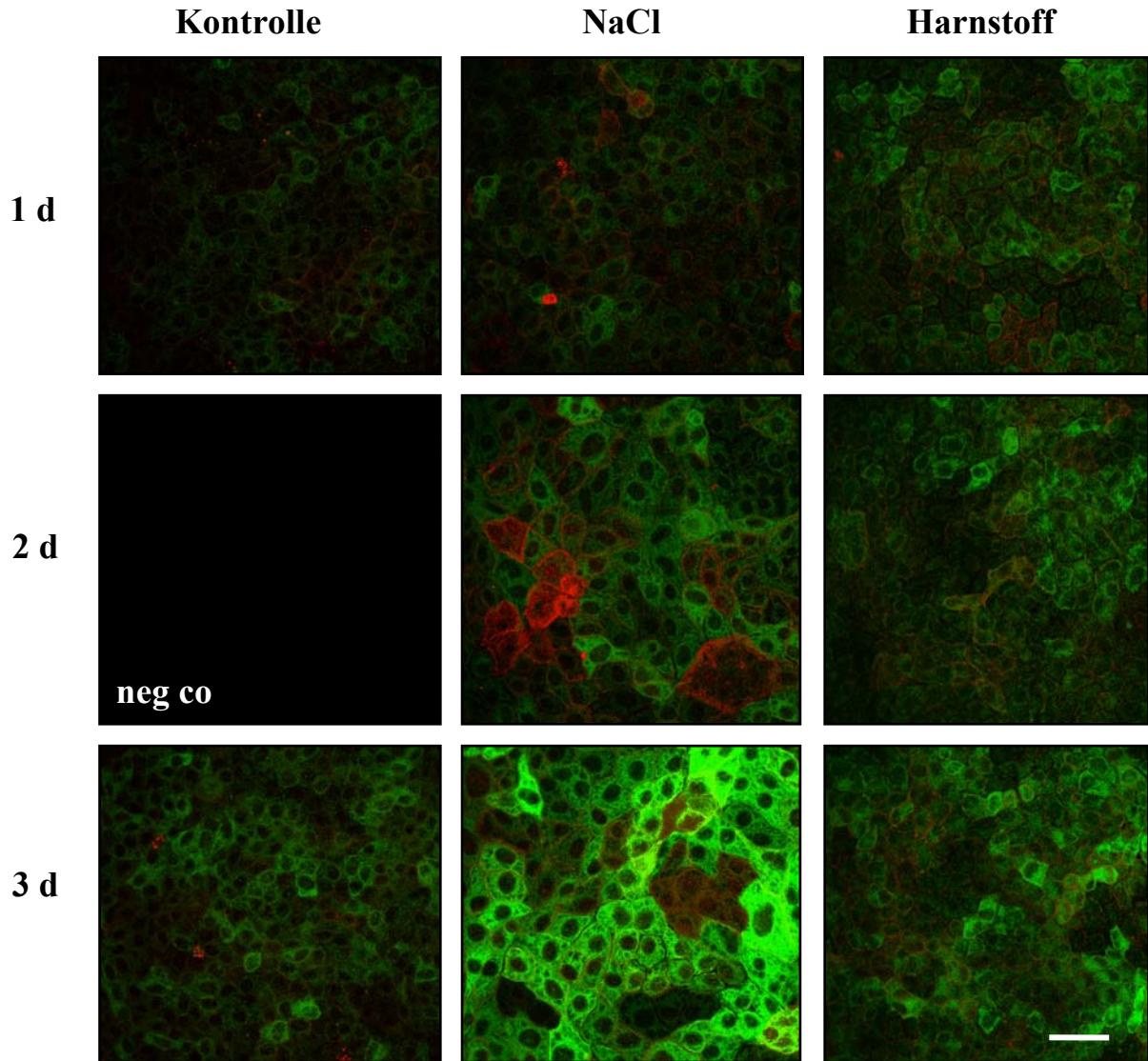


Abb. 17: Immunfluoreszenz-Doppelnachweis für α B-Crystallin und Panzytokeratin in MDCK-Zellen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitspannen entweder in isotonem Medium (300 mosm/kg H₂O, Kontrolle) oder in hyposmolarem Medium (500 mosm/kg H₂O durch NaCl- oder Harnstoff-Zugabe) kultiviert und anschließend für α B-Crystallin und Panzytokeratin gefärbt (s. Legende Abb. 15 und 16). Durch den Einsatz verschiedener Filter war mittels konfokaler Lasermikroskopie die Darstellung von α B-Crystallin und Zytokeratin in derselben Zelle möglich. *neg co* Negativkontrolle, bei der die Inkubation mit dem Primärantikörper entfiel. Der Balken im Bild unten rechts entspricht 200 μ m.

3.5 Effekt von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die NaCl-induzierte α B-Crystallin mRNA-Expression in MDCK-Zellen

Mitogen-aktivierten-Protein (MAP)-Kinassen sind an der Regulation von Genen beteiligt, die durch Veränderungen der Umgebungstonizität induziert werden (Sheikh-Hamad et al., 1998). Um den Einfluss von MAP-Kinasen auf die α B-Crystallin mRNA-Expression zu untersuchen, wurden verschiedene MAP-Kinase-Inhibitoren verwendet. Die MDCK-Zellen wurden für 1 h in isotonem Medium vorbehandelt, das einen Inhibitor der p38 MAP-Kinase (SB203580), einen Inhibitor der ERK MAP-Kinase (U0126) bzw. einen Inhibitor der JNK MAP-Kinase (SP600125) in den angegebenen Konzentrationen enthielt. Nach 1 h wurde dem Medium NaCl bis zu einer Endosmolalität von 500 mosm/kg H₂O zugegeben und die Zellen für 24 h inkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit einem Medium behandelt, welches ausschließlich das Vehikel Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, das als Lösungsmittel für SB203580, U0126 und SP600125 verwendet wurde. Anschließend wurde der Effekt der MAP-Kinase-Inhibitoren auf die Induktion der α B-Crystallin mRNA bei hypertonomem Stress mittels Northern Blot analysiert (s. Abb. 18). Diese ergab, dass von allen drei MAP-Kinase-Inhibitoren nur die Behandlung mit SP600125 zu einem signifikanten Unterschied in der α B-Crystallin mRNA-Expression führte. Bei ansteigenden Inhibitor-Konzentrationen in der Versuchsreihe zeigte sich lediglich bei der Inkubation mit SP600125 in höchster Konzentration eine statistisch signifikante Unterdrückung der α B-Crystallin mRNA-Expression. Die Zugabe der MAP-Kinase-Inhibitoren U0126 und SB203580 nahm keinen signifikanten Einfluss auf die α B-Crystallin mRNA-Expression.

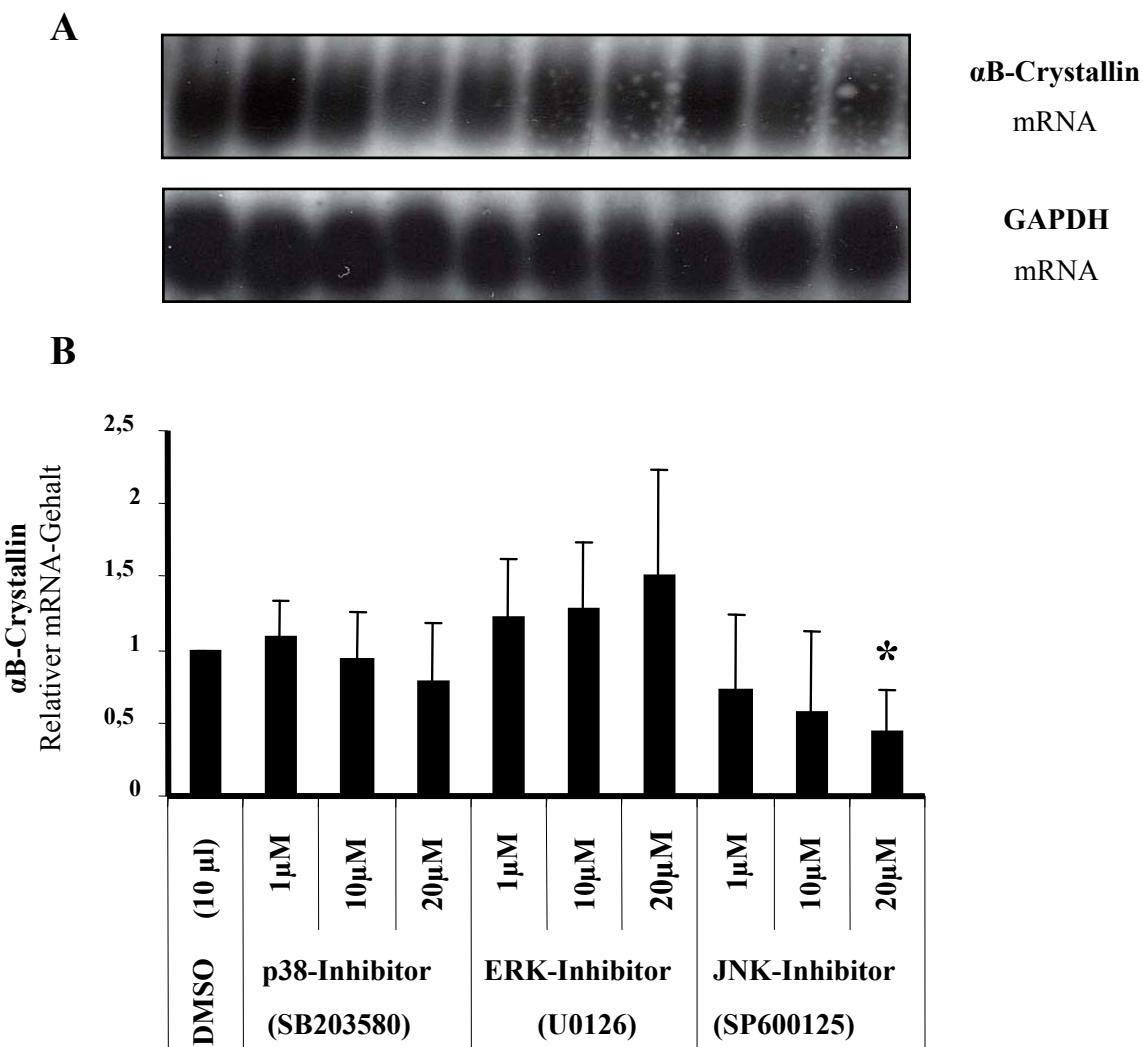


Abb. 18: Effekt von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die Expression von α B-Crystallin mRNA bei hypertonomem Stress. MDCK-Zellen wurden für 1 h in isotonem Medium inkubiert, das 1 μM , 10 μM oder 20 μM an SB203580 (p38 MAP-Kinase-Inhibitor), U0126 (ERK MAP-Kinase-Inhibitor) bzw. SP600125 (JNK MAP-Kinase-Inhibitor) enthielt. Nach dieser Vorbehandlung wurde dem Medium NaCl bis zu einer Mediumosmolalität von 500 mosm/kg H₂O zugegeben und die Zellen für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Medium kultiviert worden waren, das ausschließlich das Vehikel DMSO enthielt. Der Nachweis von α B-Crystallin erfolgte durch Northern Blot Analyse. Die Blots wurden anschließend gestript und mit GAPDH-spezifischer Sonde rehybridisiert, um zu überprüfen, ob gleiche RNA-Mengen aufgetragen waren. A Repräsentative Northern Blots für α B-Crystallin und GAPDH; B Relative α B-Crystallin mRNA-Expression. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM für n=3. *P<0,05 vs. Kontrolle (DMSO).

4. Diskussion

4.1 Anpassung der Nierenmarkszellen an die „unwirtlichen Umgebungsbedingungen“ durch die vermehrte Expression von Hsps

Unter physiologischen Bedingungen sind die meisten Säugetierzellen kaum schwankenden Umgebungsosmolalitäten ausgesetzt. Eine Ausnahme bilden jedoch die Zellen des Nierenmarks. Im Rahmen der Harnkonzentrierung kommt es beim Übergang von Diurese zu Antidiurese und vice versa zu einer raschen Änderung der Osmolalität im Interstitium des Nierenmarks, die auf 1400 mosmol/l H₂O aufsteigen kann (Beck et al., 1992; Jamison, 1982). Dabei schafft v.a. die Konzentrationszunahme von NaCl und Harnstoff im Interstitium des Nierenmarks in Antidiurese ein potenziell schädliches Milieu für die Nierenmarkszellen. NaCl, das die Zellemembran praktisch nicht frei passieren kann, führt bei erhöhter extrazellulärer Konzentration zum Wasserausstrom aus der Zelle und zum Konzentrationsanstieg der intrazellulär gelösten Teilchen, v.a. der anorganischen Elektrolyte. Diese schädigen in hohen Konzentrationen die Struktur und Funktion verschiedener Zellproteine (Somero, 1997). Harnstoff, der durch die Zellmembran in die Zelle permeieren kann, hat selbst eine destabilisierende bzw. denaturierende Wirkung auf intrazelluläre Proteine und führt zur Beeinträchtigung von Enzymfunktionen (Cox and Kanagalingam, 1968; Yancey et al., 1982). Beide stören also in höheren Konzentrationen die Zellfunktion, und den Zellen droht die Induktion der Apoptose (Neuhofe and Beck, 2005). Daher sind die Nierenzellen v.a. in den medullären Nephronanteilen auf Schutzmechanismen angewiesen, die ihnen im Umgang mit den potenziell letalen Umgebungsbedingungen zu Hilfe kommen. Die Anpassungsmechanismen, welche den Nierenmarkszellen eine Adaptation an die extrem hohen und stark schwankenden Osmolalitäten des Extrazellulärraums ermöglichen, basieren auf drei Säulen:

- (1) Als Reaktion auf ein verändertes Zellvolumen kommt es innerhalb von Minuten zu einem aktiven transmembranösen Elektrolyttransport. Bei der Volumenregulation spielen v.a. die Ionen Na⁺, K⁺ und Cl⁻ eine Rolle (Sone et al., 1993).
- (2) Bei erhöhten NaCl-, Harnstoff- und Glucosekonzentrationen kommt es innerhalb von Stunden bis Tagen zur Akkumulation von organischen Osmolyten in der Zelle (Glycerophosphorylcholin, Betain, Sorbit, *myo*-Inositol, freie Aminosäuren und deren Derivate wie z.B. Taurin; Burg, 1995). In der Niere spielen die organischen Osmolyte für

die Volumenregulation der Zelle eine größere Rolle als anorganische Elektrolyte (Garcia-Perez and Burg, 1991). Im Gegensatz zu den Ionen beeinträchtigen sie die Funktion von Proteinen auch in hohen Konzentrationen nicht. Zusätzlich wirken die Trimethylamine Glycerophosphorylcholin und Betain dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff auf die intrazellulären Proteine entgegen (Burg, 1996; Yancey and Burg, 1990).

(3) In den Sammelrohrzellen des Nierenmarks werden spezifische Hsps exprimiert (Lindquist and Craig, 1988; Müller et al., 1996; Neuhofer et al., 1999b). In-vivo- und in-vitro-Untersuchungen zeigen, dass erhöhte NaCl- und Harnstoffkonzentrationen im Nierenmark die Expression von Hsps in renalen Sammelrohrzellen erhöhen und sich dies protektiv auf die Zellen auswirkt (Neuhofer et al., 2001; Santos et al., 1998). Aufgrund ihrer Funktion als molekulare Chaperone und ihrer anti-apoptotischen Eigenschaften bei Zellstress, tragen die Hsps vermutlich einen großen Teil dazu bei, dass die Zellen den potenziell schädlichen Umgebungsbedingungen widerstehen können (Beck et al., 2000; Santos et al., 2003).

Zu einigen Hsps, die bereits in verschiedenen Nierenzonen nachgewiesen wurden, liegen Ergebnisse zu Expression, Funktion und Regulation vor (Müller et al., 1996). Hsp72 und Hsp27, die in den Sammelrohrzellen des Nierenmarks in hohen Konzentrationen exprimiert werden, sind in MDCK-Zellen durch hypertonen Stress induzierbar (Neuhofer et al., 2005a). Während eine erhöhte extrazelluläre NaCl-Konzentration in MDCK-Zellen zur Induktion von Hsp72 führt, hat Harnstoff keinen direkten Einfluss auf die Hsp72-Expression (Neuhofer et al., 1999b bzw. Abb. 14). Da aber MDCK-Zellen, die mit erhöhten NaCl-Konzentrationen vorbehandelt sind und eine deutlich gesteigerte Hsp72-Expression zeigen, sonst letalen Harnstoffkonzentrationen widerstehen (Cai et al., 2004), geht man davon aus, dass Hsp72 die denaturierende Wirkung von Harnstoff auf intrazelluläre Proteine verhindert (Neuhofer et al., 2002b).

Diese Annahme stützen Versuche mit transfizierten MDCK-Zellen, die bei NaCl-Exposition nicht mehr zur adäquaten Hsp72-Expression fähig sind und eine anschließende Behandlung mit hohen Harnstoffkonzentrationen nicht überleben (Neuhofer et al., 1999a). Transfizierte MDCK-Zellen, die Hsp72 überexprimieren, überleben jedoch hohe Harnstoffkonzentrationen, während die Kontrollzellen mit leerem Vektorkonstrukt absterben (Neuhofer et al., 2001). Somit ist anzunehmen, dass Hsp72 bei erhöhten extrazellulären NaCl- und Harnstoffkonzentrationen wesentlich zum Überleben der MDCK-Zellen beiträgt und vermutlich auch *in vivo* den Zelltod von Nierenmarkszellen bei hoher Umgebungsosmolalität

verhindert. Die Untersuchungen von Neuhofer et al. zur Expression von Hsps als zentralen Anpassungsmechanismus der Sammelrohrzellen an die „unwirtlichen Umgebungsbedingungen“ im Nierenmark, ließen einen Schutzeffekt bisher noch weniger untersuchter Hsps wie α B-Crystallin auf die Nierenmarkszellen vermuten. Auch das kleine Hsp α B-Crystallin wurde bereits in der Niere nachgewiesen (Smoyer et al., 2000) und zeigt auf zellulärer Ebene als molekulares Chaperone eine protektive Wirkung (Horwitz, 1992; Klemenz et al., 1991). Da über α B-Crystallin in der Niere bisher noch wenig bekannt ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit dessen Expression, Funktion und Regulation am Tier- und Zellmodell untersucht werden.

4.2 α B-Crystallin in der Niere

Das kleine Hsp α B-Crystallin wurde bereits in hohen Konzentrationen in vielen verschiedenen Gewebetypen einschließlich der Niere nachgewiesen (Klemenz et al., 1993; Smoyer et al., 2000; Takenaka et al., 2000; vgl. 1.6). In seiner Funktion als molekulares Chaperone verhindert es die Aggregation und Denaturierung ungefalteter, partiell oder falsch gefalteter Proteine (Horwitz, 1992; Horwitz, 2003; Jakob et al., 1993; Muchowski et al., 1999; Wang and Spector, 2000). Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der α B-Crystallin Expression in den verschiedenen Nierenzonen. So stieg die α B-Crystallin Expression in der normalen Rattenniere vom Kortex bis zum Innenmark stark an (vgl. Abb. 8 und 9). Während α B-Crystallin mRNA und Protein im Nierenkortex kaum nachweisbar waren, wurde mittels semiquantitativer Western Blot Analyse für α B-Crystallin Protein im Niereninnenmark schon unter physiologischen Bedingungen ein Anteil von fast 2% am gesamten Zellprotein errechnet (s. Abb. 8 und 9). Dieses intrarenale Expressionsmuster von α B-Crystallin in adulten Rattennieren konnte durch immunhistologische Nachweisverfahren bestätigt werden (s. Abb. 10) und stimmt mit früheren Ergebnissen überein (Smoyer et al., 2000; Takenaka et al., 2000). In der Immunhistologie zeigte sich des Weiteren, dass α B-Crystallin in erster Linie in den Zellen von medullären Sammelrohren und dünnen Schenkeln der Henle-Schleife exprimiert wird (Abb. 10). Vor allem letztere stellen medulläre Strukturen dar, die bei der Gegenstrommultiplikation im Rahmen der Harnkonzentrierung eine zentrale Rolle spielen und deren Zellen deshalb sehr hohen Umgebungsosmolalitäten ausgesetzt sind (Atherton et al., 1968; Jamison, 1982). Da die Sammelrohrzellen und die Zellen der dünnen Schenkel der

Henle-Schleife nur etwa 40–50% des gesamten papillären Zellvolumens ausmachen (Pfaller, 1982), liegt die tatsächliche α B-Crystallin Expression in diesen Zellen vermutlich weitaus höher als für die gesamte Papille ermittelt wurde. In den Glomeruli und den kortikalen Tubulusaschnitten hingegen, die nicht am Prozess der Harnkonzentrierung beteiligt und deshalb keinen erhöhten bzw. schwankenden Umgebungsosmolalitäten ausgesetzt sind, zeigte sich nur eine sehr geringe bzw. keine α B-Crystallin Expression (s. Abb. 10).

Aufgrund der Beobachtung, dass die α B-Crystallin Expression im Nierenmark die im Nierenkortex um ein Vielfaches übersteigt, wurde eine essenzielle Funktion von α B-Crystallin speziell in dieser Nierenzone vermutet. Da sich das intrarenale α B-Crystallin Expressionsmuster analog dem osmotischen Druckgradienten verhielt und die stark hyperosmolare Umgebungstonizität im Innenmark für die Nierenmarkszellen bekanntermaßen hypertonen Stress darstellt, sollte der Einfluss der Umgebungsosmolalität auf die α B-Crystallin Expression in vivo und in vitro untersucht werden.

Im Nierenmark von Ratten, bei denen durch Trinken einer 3%-igen Saccharose-Lösung eine Diurese induziert wurde, zeigte sich eine signifikante Abnahme der α B-Crystallin mRNA Expression parallel zur Abnahme der Urinosmolalität. Diese war im Innenmark besonders ausgeprägt (s. Abb. 11 und 12). Selbst nach lange anhaltender Diurese ist der kortikomedulläre osmotische Druckgradient noch nicht gänzlich aufgehoben und im Innenmark sind noch immer erhöhte NaCl- und Harnstoffkonzentrationen messbar (Müller et al., 1998). Somit lässt sich erklären, warum die α B-Crystallin mRNA Expression in Diurese nur um 46% abfiel, weniger als durch die stark verminderte Urinosmolalität erwartet gewesen wäre. Dieser Abfall der α B-Crystallin Expression in Diurese steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Takenaka et al., die eine starke α B-Crystallin Induktion bei Dehydratation bzw. in Antidiurese zeigten (Takenaka et al., 2000). Zusätzlich konnte die α B-Crystallin Expression in MDCK-Zellen durch erhöhte extrazelluläre NaCl- und Raffinosekonzentrationen sehr wirksam induziert werden (s. Abb. 13 und 14).

4.3 Regulation der α B-Crystallin Expression in der Niere

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass die α B-Crystallin Expression sich im Innenmark der Niere entsprechend dem Diuresezustand ändert und in vitro durch hypertonen Stress induzierbar ist, deuten darauf hin, dass der interstitiellen Tonizität eine wichtige Rolle bei der Regulation der α B-Crystallin Expression zukommt. Diese Hypothese wird weiterhin

durch die Tatsache untermauert, dass die α B-Crystallin Expression mit dem kortikomedullären osmotischen Gradienten korreliert, da sich ein hoher α B-Crystallin Gehalt im hyperosmolaren Niereninnenmark und nur unbedeutende Mengen im isoosmotischen Nierenkortex finden (Michl et al., 2006). Für die Regulation von α B-Crystallin durch hohe Umgebungsosmolalitäten und eine wichtige Funktion bei der Harnkonzentrierung sprechen ebenfalls Untersuchungen an sich entwickelnden Rattenieren, in denen die α B-Crystallin Expression in den ersten drei Wochen nach Geburt parallel zum tubulären Wachstum ansteigt und mit dem Erwerb der tubulären Funktion korreliert (Iwaki et al., 1991). Untersuchungen an anderen Zelllinien, bei denen die α B-Crystallin Expression bei osmotischem Stress zunimmt, festigen die Annahme, dass α B-Crystallin in der Niere durch hypertonen Stress reguliert wird (Kegel et al., 1996).

Interessanterweise waren α B-Crystallin mRNA und Protein im Zellmodell nicht nur durch eine erhöhte extrazelluläre NaCl- und Raffinose-, sondern auch durch eine erhöhte Harnstoffkonzentration induzierbar (s. Abb. 13 und 14). Harnstoff übt jedoch, anders als NaCl und Raffinose, keinen osmotischen Stress aus, da es im Gegensatz zu NaCl und Raffinose die meisten Zellmembranen leicht passieren kann. Frühere Studien an MDCK-Zellen zeigen außerdem, dass Harnstoff in Konzentrationen bis zu 500 mosm/kg H₂O keinen Einfluss auf die Expression von Hsps wie z.B. Hsp72 und Hsp27 hat (Neuhofer et al., 2005a; Neuhofer et al., 1999b). Im Gegensatz zu Hsp72, wurde α B-Crystallin Protein in vitro jedoch deutlich durch erhöhte Harnstoffkonzentrationen induziert. Daher gibt es Grund zur Annahme, dass die Induktion von α B-Crystallin in der Niere anderen Regulationsmechanismen als Hsp72 unterliegt. Dafür spricht auch die unterschiedliche Zeitspanne von der Exposition gegenüber hypertonomem Stress bis zum Anstieg der α B-Crystallin bzw. Hsp72 Expression (s. Abb. 14). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass, im Gegensatz zur Expression des TonEBP-Zielgens Hsp72, die durch hypertonen Stress induzierte α B-Crystallin Expression unabhängig von TonEBP ist (Na et al., 2003; Woo et al., 2002). Des Weiteren sind an der Regulation von α B-Crystallin und Hsp72 möglicherweise unterschiedliche MAP-Kinasen beteiligt.

4.3.1 Einfluss von MAP-Kinasen

In Säugetierzellen aktiviert osmotischer Stress bestimmte Mitogen-aktivierte-Protein (MAP)-Kinasen. Diese sind an der Regulation von osmosensitiven Genen beteiligt (Brewster et al., 1993; Itoh et al., 1994; Matsuda et al., 1995). Dazu gehören Hitzeschockproteine wie Hsp72 und α B-Crystallin sowie Transporter und Synthaseenzyme für organische Osmolyte, deren intrazelluläre Akkumulation den Zellen ermöglicht, sich an hypertone Umgebungsbedingungen zu adaptieren und die Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Heute sind drei Hauptmitglieder der Familie der MAP-Kinasen bekannt, nämlich ERK (extracellular regulated kinase), JNK (Jun N-terminal kinase) und p38. Auch im Nierenmark kommt es bei hoher Umgebungsosmolalität zur zeitlich versetzten und unterschiedlich starken Aktivierung von MAP-Kinasen (Watts et al., 1998). Sie greifen in verschiedene Signaltransduktionskaskaden regulierend ein und sind u.a. an der Induktion von Hsps beteiligt. Vor allem die p38 MAP-Kinase scheint für die Induktion von durch Hypertonizität induzierbaren Genen bei osmotischem Stress in MDCK-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Sheikh-Hamad et al., 1998) und für das Überleben der Zellen von zentraler Bedeutung zu sein (Neuhöfer et al., 1999a). In Glioma-Zellen führt Hitzeschock zur Zunahme der p38 MAP-Kinase Aktivität und zu einer erhöhten α B-Crystallin Expression, während bei Hemmung der p38 MAP-Kinase die α B-Crystallin Induktion ausbleibt (Kato et al., 1999a). In Herzmuskelzellen wird α B-Crystallin bei hypertonem Stress in einem p38 MAP-Kinase abhängigen Prozess induziert und verhindert die Einleitung der Apoptose (Hoover et al., 2000).

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von MAP-Kinasen auf die α B-Crystallin Expression in MDCK-Zellen bei hypertonomem Stress untersucht werden. Hierzu wurden jeweils die spezifischen MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 (p38-Inhibitor), U0126 (ERK-Inhibitor) und SP600125 (JNK-Inhibitor) eingesetzt. Interessanterweise ergaben die vorliegenden Untersuchungen, dass α B-Crystallin in MDCK-Zellen in einem JNK MAP-Kinase-abhängigen Prozess reguliert wird und weder die p38 MAP-Kinase noch die ERK MAP-Kinase signifikanten Einfluss auf die α B-Crystallin Expression nehmen (s. Abb. 18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass offenbar nicht die p38 MAP-Kinase, welche bekannterweise an der Regulation vieler durch Hypertonizität induzierbarer Gene wie z.B. Hsp72 beteiligt ist (Neuhöfer et al., 1999a; Sheikh-Hamad et al., 1998), sondern vielmehr die JNK MAP-Kinase bei der Regulation der α B-Crystallin Expression in renalen Sammelrohrzellen eine Rolle spielt. Matsuda et al. vermuten demnach unterschiedliche

Signaltransduktionswege für die Induktion von α B-Crystallin und Hsp72 (Matsuda et al., 1995). Eine mögliche Erklärung könnten die voneinander unabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen über verschiedene MAP-Kinasen-Kinasen und die Vielzahl der unterschiedlichen Zielproteine der MAP-Kinasen darstellen (Derijard et al., 1995). Darüber hinaus kann die Aktivierung der drei MAP-Kinasen in Abhängigkeit von Gewebetyp und Stressor zu gegensätzlicher Wirkung führen, was deren komplexe Regulations- und Wirkungsbreite erklärt (Xia et al., 1995).

4.3.2 Einfluss von Veränderungen des Zytoskeletts

MAP-Kinasen werden nicht direkt durch eine hohe Konzentration osmotisch aktiver Teilchen im Extrazellulärtraum, sondern durch die konsekutive Veränderung des Zellvolumens aktiviert (Roger et al., 1999). Bei einer Zellvolumenänderung, wie bei hypertonomem Stress, kommt es durch Depolymerisation und Polymerisation von Intermediärfilamenten zur Umstrukturierung des Zytoskeletts. Diese Modulation des Zellskeletts wird vermutlich in einem MAP-Kinase abhängigen Prozess reguliert (Bustamante et al., 2003). Harnstoff hingegen, der keine wesentliche Zellvolumenänderung verursacht, führt weder zur Aktivierung von MAP-Kinasen noch zur Depolymerisation von Intermediärfilamenten (Bustamante et al., 2003; Roger et al., 1999).

Zellstress kann durch eine Destabilisierung des Zytoskeletts zum Zelltod führen. Die Zellen reagieren daher auf einwirkende Stressfaktoren mit der Stabilisierung und Umorganisation des Zellgerüsts und der Neusynthese und intrazellulären Umverteilung von Hsps (Collier and Schlesinger, 1986). In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass sich die kleinen Hsps α B-Crystallin und Hsp27 bei Zellstress an Aktinfilamente anlagern, in einem p38-abhängigen Prozess das Aktinfilamentgerüst stabilisieren und zum Überleben der Zellen in einer sonst letalen Umgebung beitragen (Guay et al., 1997; Launay et al., 2006; Singh et al., 2007).

In renalen Tubuluszellen beispielsweise zeigt sich bei Ischämie eine Schädigung des Aktin-Zytoskeletts und ein Anstieg der α B-Crystallin Expression im Nierenmark (Smoyer et al., 2000). In nicht-renalen Geweben ist bei Zellstress eine intrazelluläre Umverteilung (Adhikari et al., 2004; Djabali et al., 1997; Perng et al., 1999) und Assoziation von α B-Crystallin an zytoskeletale Strukturen zu beobachten (Bennardini et al., 1992; Muchowski et al., 1999). α B-Crystallin interagiert dabei mit verschiedenen Bestandteilen des Zytoskeletts (Quinlan, 2002; Smoyer et al., 2000; Verschuure et al., 2002) und schützt die Zelle vor Stress-induzierter Apoptose (Alge et al., 2002; Liu et al., 2004a; Liu et al., 2004b; Muchowski et al.,

1999; Nagaraj et al., 2005). Man nimmt deshalb an, dass α B-Crystallin als molekulares Chaperone für Intermediärfilamente agiert und ihm eine protektive Funktion hinsichtlich des Zytoskeletts zukommt. Da es sich bei Zellstress fest an Intermediärfilamente anlagert, kann es deren Aggregation oder ungezielte Interaktionen mit anderen Proteinen verhindern, das Zytoskelett stabilisieren, die Zellfunktion aufrecht erhalten und das Überleben der Zelle fördern (Perng et al., 1999). Co-Lokalisationsnachweise in nicht-renalen Zelllinien zeigten unter Stressbedingungen eine Umorganisation des Intermediärfilamentnetzwerks und beschrieben eine Assoziation von α B-Crystallin (van de Klundert et al., 1998).

So wurde in renalen Epithelzellen ebenfalls eine Interaktion zwischen α B-Crystallin und zytoskeletalen Strukturen bei hypertonomem Stress vermutet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz untersucht, ob bei hypertonomem Stress in MDCK-Zellen eine Co-Lokalisation der α B-Crystallin und Zytokeratin Expression nachweisbar ist. Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Bestandteil des Zytoskeletts. Man kennt heute 20 verschiedene Zytokeratine, wobei Epithelien immer mindestens zwei Zytokeratine exprimieren. Untersuchungen an adulten und sich entwickelnden Nieren zeigten, dass in allen Nierenanteilen Zytokeratine exprimiert werden und zytoplasmatisch lokalisiert sind (Oosterwijk et al., 1990). Allerdings konnte durch vorliegende Experimente weder unter normalen Bedingungen noch bei Exposition gegenüber NaCl und Harnstoff der Nachweis einer Co-Lokalisation von α B-Crystallin und Zytokeratin in MDCK-Zellen erbracht werden (s. Abb. 17). Die Hypothese der Co-Lokalisation von α B-Crystallin und Zytokeratin in MDCK-Zellen bei hypertonomem Stress konnte somit nicht bestätigt werden. Dies macht eine direkte Interaktion zwischen beiden bei möglicherweise stattfindenden Umverteilungssprozessen in Stresssituationen unwahrscheinlich.

Bezüglich der Regulation der α B-Crystallin Expression lässt sich Untersuchungen zusammenfassend festhalten, dass das kleine Hsp α B-Crystallin in MDCK-Zellen bei hypertonomem Stress über einen JNK MAP-Kinase abhängigen Mechanismus induziert wird und die MAP-Kinasen p38 und ERK dabei offenbar keine Rolle spielen. Des Weiteren scheint die α B-Crystallin Expression in MDCK-Zellen bei hypertonomem Stress in keinem Zusammenhang mit Umbauvorgängen des Zytoskeletts zu stehen.

4.5 Abschließende Bemerkung

Abschließend ist zu sagen, dass weitere Fragen zur Funktion und Regulation des kleinen Hsp α B-Crystallin in der Niere offen bleiben. Man kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen davon ausgehen, dass α B-Crystallin im Nierenmark im Rahmen der Harnkonzentrierung eine wichtige Funktion zukommt. Dafür sprechen (1) der hohe α B-Crystallin Proteinanteil am zellulären Gesamtprotein, (2) die starke Induzierbarkeit durch hypertonen Stress bzw. hohe Umgebungsosmolalitäten, (3) die Expression in den Zellen der medullären Sammelrohre und Tubuli und nicht in Glomeruli und interstitiellen Zellen, und (4) die Korrelation der α B-Crystallin Expression mit dem Diuresezustand. Die Ergebnisse zur Regulation von α B-Crystallin lassen zwar vermuten, dass die JNK MAP-Kinase an der Induktion bei hypertonomem Stress beteiligt ist, der genaue Induktions- bzw. Regulationsprozess bleibt jedoch ungeklärt. Da eine Co-Lokalisation der α B-Crystallin Expression mit zytoskeletalen Strukturen im renalen Zellmodell nicht nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Zytoskelett der renalen Sammelrohrzellen keine seiner Zielstrukturen darstellt.

Man kann spekulieren, dass α B-Crystallin in Abhängigkeit von der Art des Zellstresses und des Gewebetyps über verschiedenste Signalwege induziert wird. So könnte z.B. hypertoner Stress über eine Zellvolumenänderung und erhöhte intrazelluläre Ionenkonzentrationen andere Signaltransduktionskaskaden induzieren als die Umstrukturierung des Zytoskeletts oder die Denaturierung intrazellulärer Proteine bei erhöhter intrazellulärer Harnstoffkonzentration.

Ebenfalls Raum für weiterführende Untersuchungen lässt die Frage, ob α B-Crystallin neben hypertonomem Stress und erhöhter extrazellulärer Harnstoffkonzentration auch durch andere Stressfaktoren wie z.B. niedrigen Umgebungs-pH, niedrigen pO₂, erhöhten pCO₂, erhöhte Laktatkonzentration etc. induzierbar ist.

5. Zusammenfassung

Das kleine Hitzeschockprotein α B-Crystallin ist in vielen verschiedenen Gewebetypen u.a. in der Niere nachweisbar. Es wird sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen exprimiert. Viele verschiedene Stressfaktoren induzieren in den betroffenen Zellen die Expression von α B-Crystallin, das – wie viele andere Hsps - als molekulares Chaperone die Zellen vor sonst letalen Umgebungseinflüssen schützt. Dies wird bewerkstelligt, indem es partiell oder komplett entfaltete, fehlgefaltete oder aggregierte Polypeptide bindet und deren native Konformation wiederherstellt, oder bei irreversibler Schädigung dem lysosomalen Abbau zuführt.

Im Nierenmark stellen hohe extrazelluläre Konzentrationen an NaCl und Harnstoff, die im Rahmen der Harnkonzentrierung das interstitielle Milieu prägen, die größte Bedrohung für die Zellen der medullären Nephronanteile dar. Wie vorliegende Untersuchungen zeigen, exprimieren die Zellen der medullären Sammelrohre und der dünnen Schenkel der Henle-Schleife α B-Crystallin konstitutiv sehr stark und es macht im Innenmark etwa 2% des gesamten Zellproteins aus. Im Nierenkortex ist α B-Crystallin hingegen kaum nachweisbar. Da die α B-Crystallin Expression parallel zum osmotischen Gradienten vom Nierenkortex zum Innenmark ansteigt und in Diurese im Nierenmark signifikant abfällt, kann man davon ausgehen, dass die α B-Crystallin Expression wesentlich durch die interstitielle Osmolalität reguliert wird. Diese Annahme wird durch die vorliegenden in-vitro-Versuche mit MDCK-Zellen unterstützt, die zeigen, dass α B-Crystallin durch hypertonen Stress induzierbar ist. Interessanterweise führt auch eine erhöhte extrazelluläre Harnstoffkonzentration zur α B-Crystallin Induktion. α B-Crystallin wird daher vermutlich über andere Regulationsmechanismen induziert als beispielsweise Hsp72, ein gut untersuchtes Hsp in der Niere und TonEBP-Zielgen, welches durch erhöhte Harnstoffkonzentrationen nicht induzierbar ist. Dafür spricht auch, dass bei der Induktion von α B-Crystallin die JNK MAP-Kinase eine Rolle spielt und nicht die p38 MAP-Kinase, die an der Expression vieler anderer durch Hypertonizität induzierbarer Gene, u.a. Hsp72, beteiligt ist. Interaktionen zwischen α B-Crystallin und Strukturen des Zytoskeletts konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass α B-Crystallin im Rahmen der Harnkonzentrierung eine bedeutende Funktion für die Zellen im Innenmark der Niere zukommt und dass dessen Expression nicht nur durch hypertonen Stress, sondern auch durch hohe

Harnstoffkonzentrationen und vermutlich mehrere andere Stressfaktoren im Nierenmark reguliert wird.

6. Literaturverzeichnis

- Adhikari AS, Sridhar Rao K, Rangaraj N, Parnaik VK, Mohan Rao C. 2004. Heat stress-induced localization of small heat shock proteins in mouse myoblasts: intranuclear lamin A/C speckles as target for alphaB-crystallin and Hsp25. *Exp Cell Res* 299(2):393-403.
- Alge CS, Priglinger SG, Neubauer AS, Kampik A, Zillig M, Bloemendaal H, Welge-Lussen U. 2002. Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by alphaB-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11):3575-3582.
- Aoyama A, Frohli E, Schafer R, Klemenz R. 1993a. Alpha B-crystallin expression in mouse NIH 3T3 fibroblasts: glucocorticoid responsiveness and involvement in thermal protection. *Mol Cell Biol* 13(3):1824-1835.
- Aoyama A, Steiger RH, Frohli E, Schafer R, von Deimling A, Wiestler OD, Klemenz R. 1993b. Expression of alpha B-crystallin in human brain tumors. *Int J Cancer* 55(5):760-764.
- Ashburner M, Bonner JJ. 1979. The induction of gene activity in drosophila by heat shock. *Cell* 17(2):241-254.
- Atherton JC, Hai MA, Thomas S. 1968. The time course of changes in renal tissue composition during water diuresis in the rat. *J Physiol* 197(2):429-443.
- Beck F, Dorge A, Rick R, Thurau K. 1984. Intra- and extracellular element concentrations of rat renal papilla in antidiuresis. *Kidney Int* 25(2):397-403.
- Beck FX, Burger-Kentischer A, Müller E. 1998. Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pflugers Arch* 436(6):814-827.
- Beck FX, Neuhofer W, Müller E. 2000. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2):F203-215.
- Beck FX, Schmolke M, Guder WG, Dorge A, Thurau K. 1992. Osmolytes in renal medulla during rapid changes in papillary tonicity. *Am J Physiol* 262(5 Pt 2):F849-856.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2(8):469-475.
- Bennardini F, Wrzosek A, Chiesi M. 1992. Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ Res* 71(2):288-294.

- Berry V, Francis P, Reddy MA, Collyer D, Vithana E, MacKay I, Dawson G, Carey AH, Moore A, Bhattacharya SS, Quinlan RA. 2001. Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* 69(5):1141-1145.
- Bhat SP, Nagineni CN. 1989. alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158(1):319-325.
- Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, Horwitz J. 1999. Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11):6137-6142.
- Boyle D, Takemoto L. 1994. Characterization of the alpha-gamma and alpha-beta complex: evidence for an in vivo functional role of alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Exp Eye Res* 58(1):9-15.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259(5102):1760-1763.
- Burg MB. 1994. Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. *J Exp Zool* 268(2):171-175.
- Burg MB. 1995. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268(6 Pt 2):F983-996.
- Burg MB. 1996. Coordinate regulation of organic osmolytes in renal cells. *Kidney Int* 49(6):1684-1685.
- Burg MB, Kwon ED, Kultz D. 1997. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59:437-455.
- Burg MB, Kwon ED, Peters EM. 1996. Glycerophosphocholine and betaine counteract the effect of urea on pyruvate kinase. *Kidney Int Suppl* 57:S100-104.
- Bustamante M, Roger F, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Martin PY, Feraille E. 2003. Regulatory volume increase is associated with p38 kinase-dependent actin cytoskeleton remodeling in rat kidney MTAL. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(2):F336-347.

- Cai Q, Ferraris JD, Burg MB. 2004. Greater tolerance of renal medullary cells for a slow increase in osmolality is associated with enhanced expression of HSP70 and other osmoprotective genes. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(1):F58-67.
- Carver JA, Aquilina JA, Truscott RJ, Ralston GB. 1992. Identification by ¹H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin. *FEBS Lett* 311(2):143-149.
- Carver JA, Nicholls KA, Aquilina JA, Truscott RJ. 1996. Age-related changes in bovine alpha-crystallin and high-molecular-weight protein. *Exp Eye Res* 63(6):639-647.
- Chavez Zobel AT, Loranger A, Marceau N, Theriault JR, Lambert H, Landry J. 2003. Distinct chaperone mechanisms can delay the formation of aggresomes by the myopathy-causing R120G alphaB-crystallin mutant. *Hum Mol Genet* 12(13):1609-1620.
- Collier NC, Schlesinger MJ. 1986. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol* 103(4):1495-1507.
- Cox RA, Kanagalingam K. 1968. A spectrophotometric study of the denaturation of deoxyribonucleic acid in the presence of urea or formaldehyde and its relevance to the secondary structure of single-stranded polynucleotides. *Biochem J* 108(4):599-610.
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* 57(2):402-414.
- Dasgupta S, Hohman TC, Carper D. 1992. Hypertonic stress induces alpha B-crystallin expression. *Exp Eye Res* 54(3):461-470.
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267(5198):682-685.
- Djabali K, de Nechaud B, Landon F, Portier MM. 1997. AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci* 110 (Pt 21):2759-2769.
- Dubin RA, Wawrousek EF, Piatigorsky J. 1989. Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 9(3):1083-1091.
- Ehrnsperger M, Gruber S, Gaestel M, Buchner J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* 16(2):221-229.
- Ellis RJ. 1990. The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol* 1(1):1-9.
- Ellis RJ, van der Vies SM. 1991. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60:321-347.

- Feige U, Polla BS. 1994. Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 50(11-12):979-986.
- Fenton RA, Knepper MA. 2007. Urea and renal function in the 21st century: insights from knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 18(3):679-688.
- Fink AL. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79(2):425-449.
- Fontaine JM, Rest JS, Welsh MJ, Benndorf R. 2003. The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chaperones* 8(1):62-69.
- Freeman BC, Morimoto RI. 1996. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *Embo J* 15(12):2969-2979.
- Frydman J, Nimmessern E, Ohtsuka K, Hartl FU. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370(6485):111-117.
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272(29):18033-18037.
- Gambill BD, Voos W, Kang PJ, Miao B, Langer T, Craig EA, Pfanner N. 1993. A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J Cell Biol* 123(1):109-117.
- Ganadu ML, Aru M, Mura GM, Coi A, Mlynarz P, Kozlowski H. 2004. Effects of divalent metal ions on the alphaB-crystallin chaperone-like activity: spectroscopic evidence for a complex between copper(II) and protein. *J Inorg Biochem* 98(6):1103-1109.
- Garcia-Perez A, Burg MB. 1991. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71(4):1081-1115.
- Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A. 2006. Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death. *Clin Cancer Res* 12(2):584-590.
- Gottschalk CW, Mylle M. 1959. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. *Am J Physiol* 196(4):927-936.

- Gottschalk CW, Mylle M. 1997. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. 1959. J Am Soc Nephrol 8(1):153-164; discussion 153-159.
- Groenen PJ, Merck KB, de Jong WW, Bloemendaal H. 1994. Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. Eur J Biochem 225(1):1-19.
- Grunewald JM, Grunewald RW, Kinne RK. 1993. Ion content and cell volume in isolated collecting duct cells: effect of hypotonicity. Kidney Int 44(3):509-517.
- Grunewald JM, Grunewald RW, Kinne RK. 1994. Regulation of ion content and cell volume in isolated rat renal IMCD cells under hypertonic conditions. Am J Physiol 267(1 Pt 2):F13-19.
- Gruvberger-Saal SK, Parsons R. 2006. Is the small heat shock protein alphaB-crystallin an oncogene? J Clin Invest 116(1):30-32.
- Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. J Cell Sci 110 (Pt 3):357-368.
- Haley DA, Horwitz J, Stewart PL. 1998. The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. J Mol Biol 277(1):27-35.
- Hamada Y, Imai M, Aoki T, Suzuki R, Kamiya A. 1992. Simulation of the profile of water, NaCl, and urea transport in the countercurrent multiplication system between thin ascending limb and inner medullary collecting duct. Tohoku J Exp Med 168(1):47-62.
- Hargitay B, Kuhn W, Wirz H. 1951. [A model experiment on the problem of urine concentration.]. Helv Physiol Pharmacol Acta 9(2):C 26-27.
- Hartl FU. 1991. Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation. Semin Immunol 3(1):5-16.
- Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381(6583):571-579.
- Haslbeck M. 2002. sHsps and their role in the chaperone network. Cell Mol Life Sci 59(10):1649-1657.
- Haslbeck M, Buchner J. 2002. Chaperone function of sHsps. Prog Mol Subcell Biol 28:37-59.
- Häussinger D. 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. Biochem J 313 (Pt 3):697-710.
- Hawse JR, Cumming JR, Oppermann B, Sheets NL, Reddy VN, Kantorow M. 2003. Activation of metallothioneins and alpha-crystallin/sHSPs in human lens epithelial

- cells by specific metals and the metal content of aging clear human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2):672-679.
- Head MW, Corbin E, Goldman JE. 1994. Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J Cell Physiol* 159(1):41-50.
- Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO. 2002. The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* 277(41):38294-38304.
- Hervy S, Thomas SR. 2003. Inner medullary lactate production and urine-concentrating mechanism: a flat medullary model. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(1):F65-81.
- Hightower LE. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66(2):191-197.
- Hizoh I, Strater J, Schick CS, Kubler W, Haller C. 1998. Radiocontrast-induced DNA fragmentation of renal tubular cells in vitro: role of hypertonicity. *Nephrol Dial Transplant* 13(4):911-918.
- Hoover HE, Thuerauf DJ, Martindale JJ, Glembotski CC. 2000. alpha B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. A potential role for alpha B-crystallin as a target of the p38 branch of the cardiac stress response. *J Biol Chem* 275(31):23825-23833.
- Horwitz J. 1992. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10449-10453.
- Horwitz J. 2003. Alpha-crystallin. *Exp Eye Res* 76(2):145-153.
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56(2):273-279.
- Imai M, Taniguchi J, Yoshitomi K. 1988. Osmotic work across inner medullary collecting duct accomplished by difference in reflection coefficients for urea and NaCl. *Pflugers Arch* 412(6):557-567.
- Ingolia TD, Craig EA. 1982. Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(7):2360-2364.
- Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Kato K. 2001. Regulation of the levels of small heat-shock proteins during differentiation of C2C12 cells. *Exp Cell Res* 266(2):213-221.

- Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Tsuzuki M, Kishikawa M, Shimada A, Hosokawa M, Kato K. 2003. Hsp27 suppresses the formation of inclusion bodies induced by expression of R120G alpha B-crystallin, a cause of desmin-related myopathy. *Cell Mol Life Sci* 60(6):1217-1223.
- Itoh T, Yamauchi A, Miyai A, Yokoyama K, Kamada T, Ueda N, Fujiwara Y. 1994. Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 93(6):2387-2392.
- Iwaki A, Iwaki T, Goldman JE, Ogomori K, Tateishi J, Sakaki Y. 1992a. Accumulation of alpha B-crystallin in brains of patients with Alexander's disease is not due to an abnormality of the 5'-flanking and coding sequence of the genomic DNA. *Neurosci Lett* 140(1):89-92.
- Iwaki T, Iwaki A, Liem RK, Goldman JE. 1991. Expression of alpha B-crystallin in the developing rat kidney. *Kidney Int* 40(1):52-56.
- Iwaki T, Kume-Iwaki A, Goldman JE. 1990. Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues. *J Histochem Cytochem* 38(1):31-39.
- Iwaki T, Kume-Iwaki A, Liem RK, Goldman JE. 1989. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 57(1):71-78.
- Iwaki T, Tateishi J. 1991. Immunohistochemical demonstration of alphaB-crystallin in hamartomas of tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 139(6):1303-1308.
- Iwaki T, Wisniewski T, Iwaki A, Corbin E, Tomokane N, Tateishi J, Goldman JE. 1992b. Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *Am J Pathol* 140(2):345-356.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268(3):1517-1520.
- Jamison R, Kriz, W. 1982. Urinary concentrating mechanism: Structure and function. Oxford University Press, New York.
- Jamison RL, Bennett CM, Berliner RW. 1967. Countercurrent multiplication by the thin loops of Henle. *Am J Physiol* 212(2):357-366.
- Jog NR, Jala VR, Ward RA, Rane MJ, Haribabu B, McLeish KR. 2007. Heat shock protein 27 regulates neutrophil chemotaxis and exocytosis through two independent mechanisms. *J Immunol* 178(4):2421-2428.
- Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO. 1998. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 273(6):3679-3686.

- Johnston RN, Kucey BL. 1988. Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* 242(4885):1551-1554.
- Kamradt MC, Lu M, Werner ME, Kwan T, Chen F, Strohecker A, Oshita S, Wilkinson JC, Yu C, Oliver PG, Duckett CS, Buchsbaum DJ, LoBuglio AF, Jordan VC, Cryns VL. 2005. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 280(12):11059-11066.
- Kanno Y, Matsuno H. 2006. The possibility of novel antiplatelet peptides: the physiological effects of low molecular weight HSPs on platelets. *Curr Pharm Des* 12(7):887-892.
- Kato K, Inaguma Y, Ito H, Iida K, Iwamoto I, Kamei K, Ochi N, Ohta H, Kishikawa M. 2001. Ser-59 is the major phosphorylation site in alphaB-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease. *J Neurochem* 76(3):730-736.
- Kato K, Ito H, Kamei K, Iwamoto I. 1999a. Selective stimulation of Hsp27 and alphaB-crystallin but not Hsp70 expression by p38 MAP kinase activation. *Cell Stress Chaperones* 4(2):94-101.
- Kato K, Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Ito H, Kamei K. 1999b. Responses of heat shock proteins hsp27, alphaB-crystallin, and hsp70 in rat brain after kainic acid-induced seizure activity. *J Neurochem* 73(1):229-236.
- Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Inaguma Y, Shimizu K, Ohshima K. 1991. Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive alpha B crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. *Biochim Biophys Acta* 1074(1):201-208.
- Kegel KB, Iwaki A, Iwaki T, Goldman JE. 1996. AlphaB-crystallin protects glial cells from hypertonic stress. *Am J Physiol* 270(3 Pt 1):C903-909.
- King J, Laemmli UK. 1971. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 62(3):465-477.
- Klemenz R, Andres AC, Frohli E, Schafer R, Aoyama A. 1993. Expression of the murine small heat shock proteins hsp 25 and alpha B crystallin in the absence of stress. *J Cell Biol* 120(3):639-645.
- Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A. 1991. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9):3652-3656.

- Kultz D, Chakravarty D. 2001. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1999-2004.
- Kuramochi G, Kersting U, Dantzler WH, Silbernagl S. 1996. Changes in the countercurrent system in the renal papilla: diuresis increases pH and HCO₃- gradients between collecting duct and vasa recta. *Pflugers Arch* 432(6):1062-1068.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* 109(1):7-15.
- Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275(5679):416-420.
- Launay N, Goudeau B, Kato K, Vicart P, Lilienbaum A. 2006. Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 312(18):3570-3584.
- Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. 1993. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268(32):24210-24214.
- Layton AT, Pannabecker TL, Dantzler WH, Layton HE. 2004. Two modes for concentrating urine in rat inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(4):F816-839.
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *Embo J* 16(3):659-671.
- Leppra S, Sistonen L. 1997. Heat shock response -. *Annals of Medicine* 29(1)(pathophysiological implications):73-78.
- Li GC, Kal HB. 1977. Effect of hyperthermia on the radiation response of two mammalian cell lines. *Eur J Cancer* 13(1):65-69.
- Liao JH, Hung CC, Lee JS, Wu SH, Chiou SH. 1998. Characterization, cloning, and expression of porcine alpha B crystallin. *Biochem Biophys Res Commun* 244(1):131-137.

- Lin LR, Carper D, Yokoyama T, Reddy VN. 1993. The effect of hypertonicity on aldose reductase, alpha B-crystallin, and organic osmolytes in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(7):2352-2359.
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
- Liu B, Bhat M, Nagaraj RH. 2004a. AlphaB-crystallin inhibits glucose-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321(1):254-258.
- Liu JP, Schlosser R, Ma WY, Dong Z, Feng H, Lui L, Huang XQ, Liu Y, Li DW. 2004b. Human alphaA- and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKCalpha, RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways. *Exp Eye Res* 79(6):393-403.
- Louapre P, Grongnet JF, Tanguay RM, David JC. 2005. Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet heart at birth. *Cell Stress Chaperones* 10(1):17-23.
- Lowe J, McDermott H, Pike I, Spendlove I, Landon M, Mayer RJ. 1992. alpha B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J Pathol* 166(1):61-68.
- Madin SH, Darby NB, Jr. 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98(3):574-576.
- Marsh DJ. 1970. Solute and water flows in thin limbs of Henle's loop in the hamster kidney. *Am J Physiol* 218(3):824-831.
- Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. 1997. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96(12):4343-4348.
- Matsuda S, Kawasaki H, Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E. 1995. Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J Biol Chem* 270(21):12781-12786.
- McLean IW, Nakane PK. 1974. Periodate-lysine-parafomaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22(12):1077-1083.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 271(28):16510-16514.
- Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. 2000. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(2):F209-218.

- Michl M, Ouyang N, Fraek ML, Beck FX, Neuhofer W. 2006. Expression and regulation of alphaB-crystallin in the kidney in vivo and in vitro. *Pflugers Arch* 452(4):387-395.
- Minowada G, Welch W. 1995. Variation in the expression and/or phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation. *J Biol Chem* 270(13):7047-7054.
- Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J Cell Biol* 106(4):1105-1116.
- Morimoto RI. 1991. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* 3(8):295-301.
- Muchowski PJ, Valdez MM, Clark JI. 1999. AlphaB-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5):951-958.
- Müller E, Neuhofer W, Burger-Kentischer A, Ohno A, Thurau K, Beck F. 1998. Effects of long-term changes in medullary osmolality on heat shock proteins HSp25, HSP60, HSP72 and HSP73 in the rat kidney. *Pflugers Arch* 435(5):705-712.
- Müller E, Neuhofer W, Ohno A, Rücker S, Thurau K, Beck FX. 1996. Heat shock proteins HSP25, HSP60, HSP72, HSP73 in isoosmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney. *Pflugers Arch* 431(4):608-617.
- Na KY, Woo SK, Lee SD, Kwon HM. 2003. Silencing of TonEBP/NFAT5 transcriptional activator by RNA interference. *J Am Soc Nephrol* 14(2):283-288.
- Nagaraj RH, Oya-Ito T, Bhat M, Liu B. 2005. Dicarbonyl Stress and Apoptosis of Vascular Cells: Prevention by {alpha}B-Crystallin. *Ann N Y Acad Sci* 1043:158-165.
- Nakamoto H, Vigh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64(3):294-306.
- Neuhofer W, Bartels H, Fraek ML, Beck FX. 2002a. Relationship between intracellular ionic strength and expression of tonicity-responsive genes in rat papillary collecting duct cells. *J Physiol* 543(Pt 1):147-153.
- Neuhofer W, Beck FX. 2005. Cell survival in the hostile environment of the renal medulla. *Annu Rev Physiol* 67:531-555.
- Neuhofer W, Fraek ML, Beck FX. 2002b. Heat shock protein 72, a chaperone abundant in renal papilla, counteracts urea-mediated inhibition of enzymes. *Pflugers Arch* 445(1):67-73.

- Neuhof W, Fraek ML, Ouyang N, Beck FX. 2005a. Differential expression of heat shock protein 27 and 70 in renal papillary collecting duct and interstitial cells - implications for urea resistance. *J Physiol* 564(Pt 3):715-722.
- Neuhof W, Lugmayr K, Fraek ML, Beck FX. 2001. Regulated overexpression of heat shock protein 72 protects Madin-Darby canine kidney cells from the detrimental effects of high urea concentrations. *J Am Soc Nephrol* 12(12):2565-2571.
- Neuhof W, Müller E, Burger-Kentischer A, Beck FX. 1998. Hypertonicity affects heat shock protein 27 and F-actin localization in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int Suppl* 67:S165-167.
- Neuhof W, Müller E, Burger-Kentischer A, Fraek ML, Thurau K, Beck FX. 1999a. Inhibition of NaCl-induced heat shock protein 72 expression renders MDCK cells susceptible to high urea concentrations. *Pflugers Arch* 437(4):611-616.
- Neuhof W, Müller E, Grünbein R, Thurau K, Beck FX. 1999b. Influence of NaCl, urea, potassium and pH on HSP72 expression in MDCK cells. *Pflugers Arch* 439(1-2):195-200.
- Neuhof W, Vastag M, Fraek ML, Beck FX. 2005b. Effect of ammonium on the expression of osmosensitive genes in Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol* 563(Pt 2):497-505.
- Nover L. 1984. Heat Shock Response of Eucaryotic Cells. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Odreman F, Vindigni M, Gonzales ML, Niccolini B, Candiano G, Zanotti B, Skrap M, Pizzolitto S, Stanta G, Vindigni A. 2005. Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas. *J Proteome Res* 4(3):698-708.
- Oosterwijk E, Van Muijen GN, Oosterwijk-Wakka JC, Warnaar SO. 1990. Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma. *J Histochem Cytochem* 38(3):385-392.
- Otto JJ. 1993. Immunoblotting. *Methods Cell Biol* 37:105-117.
- Pallone TL, Turner MR, Edwards A, Jamison RL. 2003. Countercurrent exchange in the renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(5):R1153-1175.
- Perng MD, Cairns L, van den IP, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA. 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* 112 (Pt 13):2099-2112.

- Pfaller W. 1982. Structure function correlation on rat kidney. Quantitative correlation of structure and function in the normal and injured rat kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 70:1-106.
- Pinder SE, Balsitis M, Ellis IO, Landon M, Mayer RJ, Lowe J. 1994. The expression of alpha B-crystallin in epithelial tumours: a useful tumour marker? *J Pathol* 174(3):209-215.
- Pummer S, Dantzler WH, Lien YH, Moeckel GW, Volker K, Silbernagl S. 2000. Reabsorption of betaine in Henle's loops of rat kidney in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(3):F434-439.
- Quinlan R. 2002. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. *Prog Mol Subcell Biol* 28:219-233.
- Rao PV, Huang QL, Horwitz J, Zigler JS, Jr. 1995. Evidence that alpha-crystallin prevents non-specific protein aggregation in the intact eye lens. *Biochim Biophys Acta* 1245(3):439-447.
- Rauchman MI, Pullman J, Gullans SR. 1997. Induction of molecular chaperones by hyperosmotic stress in mouse inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2):F9-17.
- Renkawek K, de Jong WW, Merck KB, Frenken CW, van Workum FP, Bosman GJ. 1992. alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 83(3):324-327.
- Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242(4877):433-436.
- Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced an temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Roger F, Martin PY, Rousselot M, Favre H, Feraille E. 1999. Cell shrinkage triggers the activation of mitogen-activated protein kinases by hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the Henle's loop. Requirement of p38 kinase for the regulatory volume increase response. *J Biol Chem* 274(48):34103-34110.
- Ruiz-Guinazu A, Arrizurieta EE, Yelinek L. 1964. Electrolyte, water, and urea content in dog kidneys in different states of diuresis. *Am J Physiol* 206(4):725-730.
- Sakuma Y, Nonoguchi H, Takayama M, Yang T, Terada Y, Inoue T, Nakayama Y, Kohda Y, Sasaki S, Tomita K. 2005. Differential effects of hyperosmolality on Na-K-ATPase and vasopressin-dependent cAMP generation in the medullary thick ascending limb and outer medullary collecting duct. *Hypertens Res* 28(8):671-679.

- Sands JM, Layton HE. 2000. Urine concentrating mechanism and its regulation. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 3rd. Ed.(ed. DW Seldin, G Giebisch):1175-1216.
- Santos BC, Chevaile A, Hebert MJ, Zagajeski J, Gullans SR. 1998. A combination of NaCl and urea enhances survival of IMCD cells to hyperosmolality. *Am J Physiol* 274(6 Pt 2):F1167-1173.
- Santos BC, Pullman JM, Chevaile A, Welch WJ, Gullans SR. 2003. Chronic hyperosmolarity mediates constitutive expression of molecular chaperones and resistance to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3):F564-574.
- Schlesinger M, Tissières, A, Ashburner, M (eds). 1982. *Heat Shock Proteins: from Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265(21):12111-12114.
- Sheikh-Hamad D, Di Mari J, Suki WN, Safirstein R, Watts BA, 3rd, Rouse D. 1998. p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273(3):1832-1837.
- Silbernagl S, Volker K, Dantzler WH. 2003. Tubular reabsorption of myo-inositol vs. that of D-glucose in rat kidney in vivo et situ. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(6):F1181-1189.
- Silbernagl S, Volker K, Lang HJ, Dantzler WH. 1997. Taurine reabsorption by a carrier interacting with furosemide in short and long Henle's loops of rat nephrons. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2):F205-213.
- Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao Ch M. 2007. Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *J Mol Biol* 366(3):756-767.
- Smoyer WE, Ransom R, Harris RC, Welsh MJ, Lutsch G, Benndorf R. 2000. Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. *J Am Soc Nephrol* 11(2):211-221.
- Somero G, Yancey, PH. 1997. Osmolytes and cell-volume regulation: physical and evolutionary principles. In: Hoffman JF, Jamieson JD (eds) *Handbook of physiology Structure Section 14: cell physiology* Oxford University Press, New York, pp 441-484.

- Somero GN. 1986. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am J Physiol* 251(2 Pt 2):R197-213.
- Somero GN YP. 1997. Osmolytes and cell-volume regulation: physical and evolutionary principles. In: Hoffman JF, Jamieson JD (eds) *Handbook of physiology Structure Section 14: cell physiology* Oxford University Press, New York, pp 441-484.
- Sone M, Albrecht GJ, Dorge A, Thurau K, Beck FX. 1993. Osmotic adaptation of renal medullary cells during transition from chronic diuresis to antidiuresis. *Am J Physiol* 264(4 Pt 2):F722-729.
- Spector NL, Hardy L, Ryan C, Miller WH, Jr., Humes JL, Nadler LM, Luedke E. 1995. 28-kDa mammalian heat shock protein, a novel substrate of a growth regulatory protease involved in differentiation of human leukemia cells. *J Biol Chem* 270(3):1003-1006.
- Stoevring B, Vang O, Christiansen M. 2005. (α)B-crystallin in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 356(1-2):95-101.
- Stone DE, Craig EA. 1990. Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10(4):1622-1632.
- Sun Y, Macrae TH. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*.
- Takayama M, Nonoguchi H, Yang T, Machida K, Terada Y, Owada A, Tomita K, Marumo F. 1999. Acute and chronic effects of hyperosmolality on mRNA and protein expression and the activity of Na-K-ATPase in the IMCD. *Exp Nephrol* 7(4):295-305.
- Takenaka M, Imai E, Nagasawa Y, Matsuoka Y, Moriyama T, Kaneko T, Hori M, Kawamoto S, Okubo K. 2000. Gene expression profiles of the collecting duct in the mouse renal inner medulla. *Kidney Int* 57(1):19-24.
- Tauck DL. 2006. Using a classic paper by Gottschalk and Mylle to teach the countercurrent model of urinary concentration. *Adv Physiol Educ* 30(2):63-66.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84(3):389-398.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.
- Valtin H. 1966. Sequestration of urea and nonurea solutes in renal tissues of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus: effect of vasopressin and dehydration on the countercurrent mechanism. *J Clin Invest* 45(3):337-345.

- van de Klundert FA, Gijsen ML, van den IPR, Snoeckx LH, de Jong WW. 1998. alpha B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells--differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 75(1):38-45.
- Vanhoudt J, Aerts T, Abgar S, Clauwaert J. 1998. Quaternary structure of bovine alpha-crystallin: influence of temperature. *Int J Biol Macromol* 22(3-4):229-237.
- Verschueren P, Croes Y, van den IPR, Quinlan RA, de Jong WW, Boelens WC. 2002. Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 34(2):117-128.
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20(1):92-95.
- Voos W, Gambill BD, Laloraya S, Ang D, Craig EA, Pfanner N. 1994. Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol Cell Biol* 14(10):6627-6634.
- Wang K, Spector A. 1994. The chaperone activity of bovine alpha crystallin. Interaction with other lens crystallins in native and denatured states. *J Biol Chem* 269(18):13601-13608.
- Wang K, Spector A. 2000. alpha-crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat-shock proteins to renature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner. *Eur J Biochem* 267(15):4705-4712.
- Wang R, Town T, Gokarn V, Flavell RA, Chandawarkar RY. 2006. HSP70 enhances macrophage phagocytosis by interaction with lipid raft-associated TLR-7 and upregulating p38 MAPK and PI3K pathways. *J Surg Res* 136(1):58-69.
- Wang X, Osinska H, Klevitsky R, Gerdes AM, Nieman M, Lorenz J, Hewett T, Robbins J. 2001. Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice. *Circ Res* 89(1):84-91.
- Waskiewicz AJ, Cooper JA. 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* 7(6):798-805.
- Watts BA, 3rd, Di Mari JF, Davis RJ, Good DW. 1998. Hypertonicity activates MAP kinases and inhibits HCO-3 absorption via distinct pathways in thick ascending limb. *Am J Physiol* 275(4 Pt 2):F478-486.

- Welch WJ. 1990. The Mammalian Stress Response: Cell Physiology and Biochemistry of Stress Proteins. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York:223-279.
- Welch WJ. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72(4):1063-1081.
- Welch WJ, Mizzen LA. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol* 106(4):1117-1130.
- Wistow G. 1985. Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins. *FEBS Lett* 181(1):1-6.
- Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM. 2002. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 22(16):5753-5760.
- Wu B, Hunt C, Morimoto R. 1985. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol* 5(2):330-341.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-1331.
- Yancey PH, Burg MB. 1990. Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. *Am J Physiol* 258(1 Pt 2):R198-204.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566):1214-1222.
- Yancey PH, Somero GN. 1979. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J* 183(2):317-323.
- Zhang X, Clark AF, Yorio T. 2006. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2):700-708.

7. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine; Serumalbumin vom Rind
CBB	Chromassie Brilliant Blue
cDNA	complementary DNA; komplementäre, anti-sense DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CX	cortex; Kortex
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat; modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin und führt dadurch u.a. zur Hemmung von Enzymen, insbesondere die Hemmung von RNAsen ist von Bedeutung da erst dadurch die Isolierung von großen RNAs möglich wurde.
DIG	Digoxigenin; bei RNA-Sonden üblicherweise an Uridintriphosphat (UTP) gekoppelt, da es für RNA spezifisch ist
DMSO	Dimethylsulfoxid; Gefrierschutzmittel
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DTT	Dithiotreitol; Proteinstabilisierer nach Zelllyse durch Oxidation von SH-Gruppen zu Disulfidbrücken
ECL	enhanced chemiluminescence
ERK	extracellular (signal) regulated kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase,
F _{ab}	Antigen-bindendes Immunglobulinfragment
FCS	fetal calf serum; fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Enzym der Glykolyse
GPC	Glycerophosphorylcholin, kompatibler organischer Osmolyt (Trimethylaminverbindung)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Säure; organischer chemischer Puffer zur Erhaltung eines physiologischen pH
H ₂ O bidest	destilliertes Wasser

HS	Henle-Schleife
Hsp(s)	Hitzeschockprotein(e)
IM	inner medulla; Innenmark
IMCD	inner medulla collecting duct; Sammelrohre des Innenmarks (s. SR)
IE	Internationale Einheiten
JNK	c-Jun N-terminal kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
kb	Kilobasen
KG	Körbergewicht
M	Molar
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK-Zellen	Madin-Darby canine kidney-Zellen; renale epitheliale Zelllinie mit Sammelrohreigenschaften
mM	Millimol
MOPS	4-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mosm	Milliosmomolar
MTAL	medullar thick ascending limb; dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife
n	Anzahl der Experimente
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
OD	optical density; optische Dichte (Extinktion)
OM	outer medulla; Außenmark
P	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	0,01% Tween-20 in PBS
RT	Raumtemperatur
SB203580	4-(fluorophenyl)-2-(4-methylsulphonyl)-5-(4-piridyl)-Imidazol; p38 MAP-Kinase Inhibitor
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natrium-Dodecylsulfat); anionisches Tensid (Detergens), das die Eigenladungen von Proteinen überdeckt

Abkürzungsverzeichnis

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH	Sulfhydril
SP600125	anthra[1-9cd]pyrazol-6(2H)-on; JNK MAP-Kinase Inhibitor
SR	Sammelrohr
SSC	Standard Salz-Citrat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin; „Polymerisationskatalysator“
U	unit; Einheit
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene; ERK MAP-Kinase Inhibitor
v/v	Volumen/Volumen

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Michl
Vorname: Marlies
Geburtsdatum: 12.03.1980
Geburtsort: Dachau
Wohnort: Lenzfrieder Str. 14, 80637 München

Schulbildung:

1986–1990 Grundschule Aufkirchen
1990–1999 Gymnasium Starnberg
1999 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1999–2000 Studium der Zahnmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
8/2000 Zahnärztliche naturwissenschaftliche Vorprüfung
2000–2007 Studium der Humanmedizin
2000–2001 Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2001–2002 Ludwig-Maximilians Universität München
9/2002 Ärztliche Vorprüfung
2002–2007 Technische Universität München
8/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 1.6.2007 Assistenzärztin an der III. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern,
Ludwig-Maximilians-Universität

Publikationen:

Marlies Michl, BASICS „Hämatologie“, München 2005, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, ISBN 3-437-42166-2

Michl M, Ouang N, Fraek ML, Beck FX, Neuhofer W (2006) Expression and regulation of α B-crystallin in the kidney in vivo and in vitro. Pfluegers Arch - Eur J Physiol 452(4):387-95