

Die Bedeutung des basolateralen Kalium-Kanals KCNJ10 für die Transportfunktion in der Niere



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Maria Ripper
aus Regensburg
im Jahr 2014

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2011 bis Juni 2014 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Richard Warth am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Richard Warth

Prüfungsausschuss: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner (Vorsitzende)
Herr Prof. Dr. med. Richard Warth (1. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. Rainer Schreiber (2. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann (3. Prüfer)

Unterschrift Doktorandin:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Niere.....	1
1.2	Das distale Nephron.....	2
1.3	Kalium-Kanäle in der Niere.....	5
1.4	Das EAST-Syndrom.....	6
1.5	Der Nierenphänotyp der konventionellen KCNJ10-Knockout-Maus.....	9
1.6	Mausmodelle.....	11
1.6.1	Das Cre/loxP-System.....	11
1.6.1.1	Die gefloxtete KCNJ10-Maus.....	13
1.6.1.2	Die Tomato-EGFP-Maus.....	13
1.6.1.3	Die KspCre-Maus.....	14
1.6.2	Das Tet-On-System.....	15
1.6.2.1	Die induzierbare Pax8Cre-Maus.....	16
2	Zielsetzung.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Geräte.....	20
3.2	Verbrauchsmaterial.....	20
3.3	Chemikalien, Enzyme und Substanzen.....	21
3.4	Kits.....	22
3.5	Primer.....	22
3.6	PCR-Programme.....	23
3.7	Lösungen und Puffer.....	25
3.8	Antikörper und Färbesubstanzen.....	27
3.9	Versuchstiere.....	28
3.9.1	Verwendete Versuchstiere.....	28
3.9.2	Verpaarungen.....	28
3.9.3	Induktion des Knockouts bei Pax8Cre-Mäusen.....	30
3.9.4	Kontroll-Tiere.....	30
3.10	Untersuchungen der Knockout-Mäuse.....	31
3.10.1	Probengewinnung und Analyse.....	31

4.1.2.1	Gewichtsmessungen und Urin-Elektrolyt-Analysen heranwachsender, nicht-induzierter Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäuse	48
4.1.2.2	Histologische Untersuchung der Pax8Cre-Mauslinie	48
4.1.2.3	Effizienz der Knockout-Induktion bei Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Tieren durch Doxycyclin-Gabe	51
4.1.3	Vergleich der beiden nierenspezifischen Cre-Mausmodelle	52
4.2	Wahl der Kontroll-Tiere	53
4.3	Phänotypisierung adulter Knockout-Mäuse	55
4.3.1	Urinanalyse	55
4.3.1.1	Elektrolytmessungen im Spoturin adulter Mäuse	55
4.3.1.2	Osmolalität des Urins	56
4.3.2	Durchschnittlicher Wasser- und Futtermittelverbrauch	57
4.3.3	Blut-Analyse	58
4.3.4	Blutdruck	60
4.3.5	Aldosteron-Messung	60
4.3.6	Messung der glomerulären Filtrationsrate	61
4.3.7	Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener renaler Transporter, Enzyme, Kanäle, Carrier und Proteine	62
4.4	Versuche im Stoffwechsellkäfig	63
4.4.1.1	Urinanalyse	63
4.4.2	Niedrig-Salz-Diäten	66
4.4.2.1	Niedrig-Natrium-Diät	66
4.4.2.2	Niedrig-Magnesium-Diät	69
4.4.2.3	Niedrig-Kalium-Diät	72
5	Diskussion	74
5.1	Wahl der KCNJ10-Knockout-Maus	74
5.1.1	Das KspCre-Mausmodell	74
5.1.2	Das induzierbare Pax8-Mausmodell	76
5.1.2.1	Einfluss der Transgene auf die Entwicklung von nicht-induzierten Pax8Cre-Mäusen	76
5.1.2.2	Histologische Untersuchung des Pax8Cre-Mausmodells	76
5.1.2.3	KCNJ10-mRNA-Expression von induzierten Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäusen ...	77
5.1.2.4	Analyse des Spontanurins	77

5.1.2.5	Entscheidung für das induzierbare Pax8Cre-Mausmodell für die Analyse des renalen Phänotyps des EAST-Syndroms	78
5.1.3	Wahl der Kontroll-Gruppe für die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Tiere	78
5.2	Phänotypisierung der adulten KCNJ10-Knockout-Maus.....	80
5.2.1	Vergleich der Urinalysen	80
5.2.2	Der Natrium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus.....	83
5.2.3	Der Calcium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus.....	85
5.2.4	Der Magnesium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus.....	85
5.2.5	Störungen im Säure-Basen-Haushalt führten zu einer metabolischen Alkalose bei der KCNJ10-Knockout-Maus.....	87
5.2.6	Der Kalium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus.....	88
5.2.7	Verringerung der glomerulären Filtrationsrate bei der nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus	89
5.2.8	Der Wasser-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus.....	91
5.2.9	Vergleich des Phänotyps der induzierten Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Maus mit der menschlichen EAST-Erkrankung.....	94
6	Zusammenfassung	96
7	Anhang	98
7.1	Herstellerinformationen.....	98
7.1.1	Futter-Zusammensetzung	98
7.1.1.1	Standard-Diät	98
7.1.1.2	Experimentalfutter	98
7.2	zusätzliche Messdaten	99
7.2.1	weitere Daten zu den KspCre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäusen	99
7.2.1.1	Gewichtsentwicklung der KspCre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäuse	99
7.2.1.2	Urin-Elektrolyt-Ausscheidung der KspCre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäuse während der ersten 35 Lebenstage.....	100
7.2.2	weitere Daten zu den induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäusen.....	102

7.2.2.1	Urinanalyse von induzierten Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäusen im Vergleich zu 2 verschiedenen Kontrollen	102
7.2.2.2	Blutanalyse von induzierten Pax8Cre/KCNJ10 ^{flox/flox} -Mäusen: Werte der bukalen Blutabnahme und des Aortenbluts	103

Literaturverzeichnis.....	104
----------------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis	119
------------------------------------	------------

Eidesstattliche Erklärung	121
--	------------

Danksagung.....	122
------------------------	------------

1 Einleitung

1.1 Die Niere

Die Nieren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts im Körper. Sie scheiden Stoffwechselendprodukte und Fremdstoffe aus und haben darüber hinaus endokrine Funktionen. Um diese Aufgaben erfüllen zu können, ist neben einer starken Durchblutung auch eine hohe Filtrationsleistung wichtig. Bewerkstelligt wird die Filtration durch eine Vielzahl an Nephrone. Diese kleinsten Funktionseinheiten der Niere bestehen jeweils aus einem Nierenkörperchen, das sich aus Glomerulus und Bowman-Kapsel zusammensetzt, und einem daran angeschlossenen Tubulussystem. Der Tubulus ist kann sowohl strukturell als auch funktionell in unterschiedliche Abschnitte eingeteilt werden und ermöglicht zusammen mit einem ebenso fein gestrickten Blutgefäßsystem um das Nephron herum eine hohe Resorptionsleistung.

Der Glomerulus besteht aus einem zuführenden Gefäß, dem Vas afferens, das sich in ein Knäuel aus Kapillarschlingen verzweigt und als wieder vereintes Gefäß (Vas efferens) die Bowman-Kapsel verlässt. Über dieses Kapillarknäuel aus etwa 25-40 Kapillarschlingen wird das zirkulierende Blut am glomerulären Filter aufgetrennt und so innerhalb der Bowman-Kapsel das Ultrafiltrat gebildet. Dabei ist die mechanische Filterbarriere im Nierenkörperchen dreischichtig aufgebaut. Der Glomerulus ist mit einem Endothel ausgekleidet, dessen Porenradius etwa 25-50 nm beträgt. Dem Endothel liegt eine Basalmembran auf, die zusammen mit den Podozyten der Bowman-Kapsel die eigentliche Filtrationsbarriere erzeugen. Dabei formen die Podozyten Fußfortsätze, die vielfach miteinander verzahnt sind und so Filtrationsschlitze mit einer Porengröße von etwa 4 nm bilden. Das Wasser und die gelöste Stoffe, die den glomerulären Filter passieren, werden als Ultrafiltrat oder Primärharn bezeichnet. Dessen Zusammensetzung ähnelt abgesehen von dem niedrigen Proteingehalt der Zusammensetzung des Blutplasmas. Anschließend wird entlang des Nephrons über regulierte trans- und parazelluläre Transportprozesse der Großteil der Elektrolyte und des Wassers wieder aus diesem Primärharn rückresorbiert. Harnpflichtige Substanzen verbleiben im Tubulussystem und gelangen schließlich mit dem Endurin zur Ausscheidung. Die verschiedenen Teilstücke des Tubulus haben verschiedene Funktionen, wobei in den frühen Abschnitten, dem proximalen Tubulus (PT) und der Henle-Schleife, der Hauptteil der Resorptionsarbeit geleistet wird. In den anschließenden distalen Abschnitten wird über genau regulierte Resorptionsvorgänge die endgültige Elektrolyt-Zusammensetzung des Endharns eingestellt bzw. an die Bedürfnisse des Körpers angepasst.

Im PT ist durch ein komplexes Zusammenspiel von transzellulärem Elektrolyttransport und osmotischen Gradienten, die über die Epithelien hinweg aufgebaut werden, zusätzlich eine passive, parazelluläre Resorption möglich. Dadurch können besonders ökonomisch Wasser und Elektrolyte resorbiert werden. In diesem ersten Abschnitt des Tubulussystems werden auch Stoffe wie Toxine und Medikamente sezerniert.

In der dicken Henle-Schleife wird über eine fehlende Wasserpermeabilität bei gleichzeitiger Salzresorption eine Harnverdünnung erreicht. Durch luminale Kalium-Kanäle und basolaterale Chlorid-Kanäle wird hier ein lumenpositives, transepitheliales Potential aufgebaut, das wiederum die Triebkraft für die parazelluläre Resorption von Kationen über Claudin-geformte Tight Junctions ist.

Der Aufbau eines jeden Nephrons sieht eine zweite Kontaktstelle des Tubulus mit dem "eigenen" Glomerulus vor. Dabei verläuft das Ende der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (thick ascending limb of Henle's loop, TAL) durch den Winkel, der von Vas afferens und Vas efferens gebildet wird. Diese Region am Gefäßpol des Nierenkörperchens wird auch juxtaglomerulärer Apparat (JGA) genannt. Seine Aufgabe ist unter anderem, einen übermäßigen Salz- und Wasserverlust zu verhindern, indem er die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) an die Resorptionsleistung der proximal davon gelegenen Tubulus-Abschnitte anpasst. Diese fein eingestellte Koordination zwischen glomerulärer Filtration und tubulärer Resorption wird auch tubuloglomerulärer Feedback (TGF) genannt. Der NKCC2-Transporter ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter) in der luminalen Membran der Macula Densa-Zellen des JGA registriert Änderungen in der Natrium-, Chlorid- und Kalium-Konzentration der tubulären Flüssigkeit und passt die GFR über eine Vasokonstriktion oder Vasodilatation der afferenten Arteriole an. Weiterhin wird am JGA aus spezialisierten Zellen in der Wand des Vas afferens Renin freigesetzt und somit das Renin-Angiotensin-System (RAS) aktiviert. Als Reiz für die Renin-Ausschüttung wird entweder ein niedriger Blutdruck in der afferenten Arteriole, eine Stimulation β -adrenerger Rezeptoren oder eine niedrige Salz-Konzentration im Bereich der Macula Densa gesehen. Angiotensin II hemmt die Renin-Freisetzung im Sinne des negativen Feedbacks.

1.2 Das distale Nephron

Nach der Macula Densa kommen die Abschnitte des Tubulus, die für die akkurate Feinabstimmung des Endharns verantwortlich sind (1). Sie bestehen aus dem distalen Tubulus (distal convoluted tubule, DCT), der oft zusätzlich in einen frühen (DCT1) und späten (DCT2) Abschnitt unterteilt wird, dem Verbindungsstück (connecting tubule, CNT) und dem Sammelrohr

(collecting duct, CD), das ebenfalls weiterhin in ein korticales (CCD) und medulläres (MCD) Segment aufgegliedert wird (Abbildung 1). Hier wird die renale Salz- und Wasser-Ausscheidung an physiologische Vorgänge im Körper und die über die Nahrung aufgenommenen Elektrolyte angepasst.

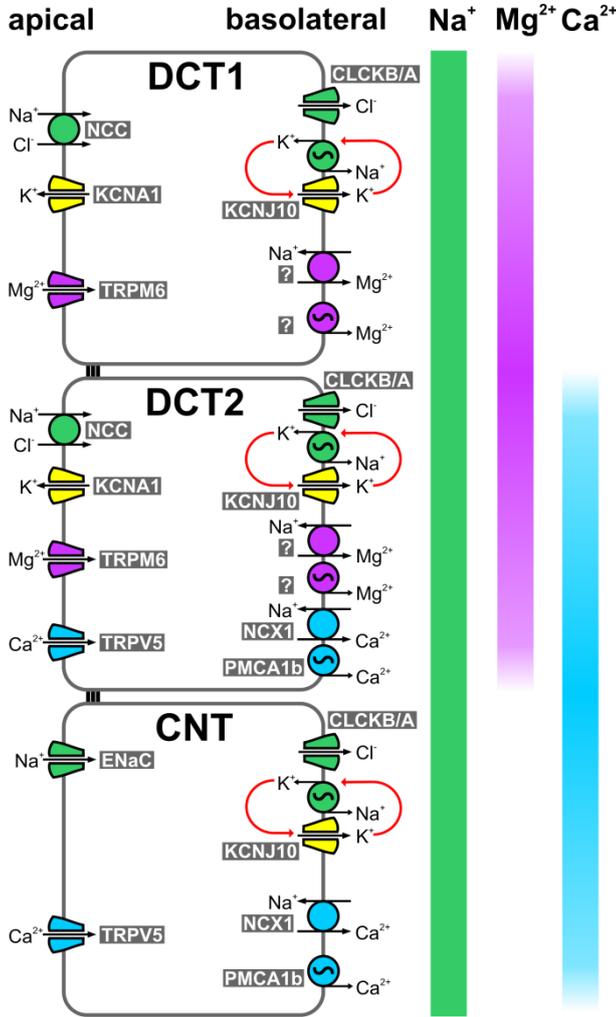


Abbildung 1 Schematische Darstellung von Zellen des frühen (DCT1) und späten (DCT2) distalen Tubulus und des Verbindungsstücks (CNT)

Über alle gezeigten Abschnitte des Nephrons hinweg wird Natriumchlorid (grün) resorbiert. Dabei spielt die Na⁺/K⁺-ATPase in der basolateralen Membran eine wichtige Rolle, indem sie die Triebkraft für die Resorptionsvorgänge liefert. Der basolateral exprimierte Kalium-Kanal KCNJ10 sorgt dabei für ein Kalium-Recycling (gelb). Weiterhin unterscheiden sich die Abschnitte in der Magnesium- (pink) und Calcium-Resorption (blau). Während im DCT Magnesium resorbiert wird, findet die Calcium-Resorption im DCT2 und CNT statt. (modifizierte Abbildung aus (2))

Entlang des distalen Nephrons sorgen viele verschiedene Transporter und Kanäle für eine transzelluläre Resorption, wobei deren Expression speziesabhängig variieren kann. Durch fließende Übergänge in deren Expressionsmuster ist allerdings eine genaue Abgrenzung zwischen den Abschnitten oft schwierig. Um diese energieaufwendige, transzelluläre Resorption zu bewerkstelligen, wird die Na⁺/K⁺-ATPase besonders stark in der basolateralen Membran des

distalen Nephrons (DCT und CNT, sowie den Hauptzellen des CCD) exprimiert (3). Im DCT ist die basolaterale Membran zur Oberflächenvergrößerung stark eingefaltet. Durch diese Pumpe werden pro ATP-Molekül gegenläufig drei Natrium-Ionen aus der Zelle und zwei Kalium-Ionen in die Zelle geleitet. Indem die intrazelluläre Natrium-Konzentration niedrig und die Kalium-Konzentration hoch gehalten wird, wird die primäre Triebkraft für den transzellulären Natrium-Transport geschaffen. Als limitierender Faktor der Na^+/K^+ -ATPase hat sich bei Zellen mit tiefen basolateralen Einfaltungen die extrazelluläre Kalium-Konzentration erwiesen. Deshalb gibt es einen "Recycling-Mechanismus", bei dem Kalium wieder die Zelle verlassen kann um erneut als Substrat für die ATPase zu fungieren. Bezeichnet wurde dieses Konzept als "Pump-Leak-Coupling" und im DCT, CNT und frühen CCD übernimmt der Kalium-Kanal KCNJ10 die Aufgabe des Kalium-Recyclings (4).

Der distale Tubulus hat im Vergleich zum proximalen Nephron nur einen mäßigen Anteil an der Wasser- und Natriumchlorid-Resorption in der Niere (5). Etwa 5-10 % des filtrierten Natriums werden hier resorbiert, abhängig von der Natriumchlorid-Konzentration im Tubulus-Lumen und dem Kalium-Haushalt. Da hier jedoch im Vergleich zum proximalen Nephron kaum parazelluläre Natrium-Resorption stattfindet, hat der DCT gegenüber allen anderen renalen Tubulus-Segmenten die höchste Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (6). Der Natrium-Gradient wird für die apikale Natriumchlorid-Resorption benötigt, die hauptsächlich über den Thiazid-sensitiven NCC (Na^+/Cl^- -Symporter) bewerkstelligt wird (7–9).

Während in den vorangehenden Tubulus-Abschnitten die Resorption von Magnesium vor allem parazellulär (PT: 20 %, TAL: 50-70 %) erfolgte, wird es im DCT ausschließlich transzellulär resorbiert. Hier liegt die Resorptionsleistung bei 5-10 % der filtrierten Menge, wobei sie von der Magnesium-Konzentration im Lumen und von hormoneller Regulation abhängig ist. Der DCT ist auch das Segment, in dem die Magnesium-Konzentration des Endharns festgelegt wird, da in späteren Tubulus-Abschnitten keine nennenswerte Resorption mehr stattfindet (10). Der apikale Magnesium-Transport im DCT wird vor allem über den TRPM6 (transient receptor potential melastatin 6) bewerkstelligt (11–13). Für die intrazelluläre Bindung und Beförderung wurden noch keine Bindungsproteine identifiziert (14). Der Mechanismus, der den basolateralen Ausstrom von Magnesium reguliert, ist ebenfalls nicht geklärt. Ein $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ -Austauscher und/oder eine $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase werden diskutiert (15).

Ebenso wie Magnesium wird auch Calcium im DCT transzellulär über drei Schritte resorbiert. Der Kanal, über den Calcium apikal passiv einströmt ist der TRPV5 (transient receptor potential vanilloid 5) (16). Basolateral verlassen die Calcium-Ionen die Zelle über NCX1 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger 1) oder PMCA1b (Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase 1b) (17, 18). Für die Diffusion

durch das Zytosol sind im DCT1 Parvalbumin und im DCT2 Calbindin als Carrier-Proteine bedeutend (19, 20). Die Regulation für die Magnesium- und Calcium-Resorption erfolgt entweder über calciotrophe (Vitamin D, Parathormon) und magnesiotrophe (EGF, epidermal growth factor) Hormone oder aber über eine Feedback-Kontrolle durch die intrazelluläre Konzentration von entweder Magnesium oder Calcium (16, 21, 22).

Im Anschluss an den DCT folgt das Verbindungsstück. Hier löst der ENaC (epithelial Na⁺-channel) den NCC als wesentlichen apikalen Natrium-Importweg ab (23). Eine Magnesium-Resorption findet hier nicht mehr statt, aber transzellulär wird weiterhin Calcium über TRPV5 resorbiert.

Das Sammelrohr hat die Aufgabe, die Feineinstellung des Endharns abzustimmen. Es besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den Hauptzellen und den Schaltzellen (24, 25). In den Hauptzellen werden über hormonelle Regulation die Urinkonzentration und der Natrium-Gehalt eingestellt. Das antidiuretische Hormon Vasopressin (ADH) sorgt für einen Einbau von Aquaporin-2 (AQP2) in die apikale Membran der Hauptzellen (26). Basolateral wird die transzelluläre Wasserresorption über AQP3 und AQP4 ermöglicht (27). Aldosteron sorgt im Sammelrohr vor allem für die Transkription und die Plasmamembranlokalisation des Natrium-Kanals ENaC und der Na⁺/K⁺-ATPase und führt damit zu einer erhöhten Natrium-Resorption (28). Die Schaltzellen (protonensezernierende A-Zwischenzellen oder bikarbonatsezernierende B-Zwischenzellen) hingegen sind an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts beteiligt.

1.3 Kalium-Kanäle in der Niere

Kalium-Kanäle werden in allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert und erfüllen dort verschiedenste Aufgaben. So kontrollieren sie z.B. das Zellvolumen, halten das Membranpotential aufrecht oder regulieren die Sekretion von Hormonen und Ionen. In der Niere findet man in den unterschiedlichen Segmenten des Nephrons verschiedene Kalium-Kanäle. Nicht alle sind an die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Plasma-Kalium-Homöostase beteiligt. Im proximalen Tubulus beispielsweise stabilisieren sie das Membranpotential, um die Triebkraft für die Resorption von gelösten Substanzen wie Glukose, Aminosäuren und Bikarbonat (z.B. der Kalium-Kanal TASK2) zu bewahren (29). In der dicken aufsteigenden Henle-Schleife wird Kalium von apikal exprimierten Kalium-Kanälen sezerniert, um die Natriumchlorid-Resorption über den NKCC2 aufrechtzuerhalten. Der dafür verantwortliche Kalium-Kanal, ROMK (renal outer medullary potassium channel) wird auch in den Hauptzellen des Sammelrohrs exprimiert, wo er für die Kalium-Sekretion in den Urin sorgt (30).

Ein weiterer wichtiger Kalium-Kanal in der Niere ist KCNJ10 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10, auch Kir4.1 genannt). Er gehört zur Familie der einwärtsgerichtenden Kalium-Kanäle (31). Zur weiteren Einteilung ist er Mitglied der 2-TM-Familie und besitzt dementsprechend neben zwei Transmembrandomänen auch eine porenbildende Domäne (P-Domäne). Sowohl N- als auch C-Terminus des Proteins sind dabei jeweils ins Zytosol gerichtet (32). Wie die meisten Kalium-Kanäle besteht KCNJ10 aus vier dieser Untereinheiten, wobei sich in der Niere das Tetramer entweder als homomere Kanal zusammenfügt, oder Heteromere mit einem anderen Kalium-Kanal dieser Familie, KCNJ16 (auch Kir5.1 genannt), bilden (33–35). Als Homomer hat KCNJ10 eine hohe Offenwahrscheinlichkeit (70-80 %), ist spannungsunabhängig und sein Gating wird über den zytosolischen pH-Wert oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) verändert (36). KCNJ16 selbst kann keine funktionsfähigen Kanäle bilden, modifiziert aber als Heteromer mit KCNJ10 die Offenwahrscheinlichkeit und die pH-Sensitivität im Vergleich zum homomeren KCNJ10-Kanal (37, 38).

Erstmals wurde KCNJ10 1995 von Takumi et al. in Gliazellen des Gehirns beschrieben (39). Später wurde seine Expression auch im Innenohr und in der Niere nachgewiesen (40–42). In der Niere wurde KCNJ10 beim C57BL/6-Mausstamm in der basolateralen Membran des DCT, CNT und des frühen Sammelrohrs entdeckt, während bei anderen Mausstämmen und im Menschen ebenso eine Expression in der kortikalen TAL nachgewiesen werden konnte (38, 40, 43, 44). Im distalen Konvolut ist das KCNJ10/KCNJ16-Heteromer, wie bereits erwähnt, für das Kalium-Recycling und damit für die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase notwendig, ein Phänomen, welches als Pump-Leak-Coupling bezeichnet wird (33, 36).

1.4 Das EAST-Syndrom

Ein partieller oder vollständiger Verlust der Kanalfunktion von KCNJ10 durch Mutationen im KCNJ10-Gen führt zum sogenannten EAST-Syndrom. Durch Genotypisierung und Linkage-Analyse wurde das betroffene Gen bei den erkrankten Patienten identifiziert und seit der Entdeckung wurde eine Reihe von Mutationen als Ursache für das EAST-Syndrom gefunden. Bislang sind 15 verschiedene Mutationen bekannt (Abbildung 2). Die meisten dieser Punktmutationen führen als sinnverändernde Mutationen ("missense" Mutationen) dazu, dass das Leseraster erhalten bleibt, aber an der Stelle durch ein verändertes Codon eine andere Aminosäure eingebaut wird. Bei zwei Mutationen (V91fsX197 und H184fsX197) kommt es aufgrund der Deletion einer einzelnen Base zu einem sogenannten Frameshift. Diese Verschiebung des Leserasters führt im weiteren Verlauf der Translation durch das Entstehen eines Stop-Codons zu einem frühzeitigen

Abbruch der Translation. Bei zwei weiteren Punktmutationen (R199X und V259X) kodiert das neu entstandene Basentriplett direkt für ein Stop-Codon. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Kanalaktivität durch diese Mutationen teilweise oder vollständig verloren geht (45–48). In Experimenten an HEK293- bzw. CHO-Zellen konnten z.B. Reichold et al. nachweisen, dass es abhängig von der Mutation zu einer verringerten Offenwahrscheinlichkeit oder zu einer veränderten pH-Sensitivität des Kanals kommen kann (38).

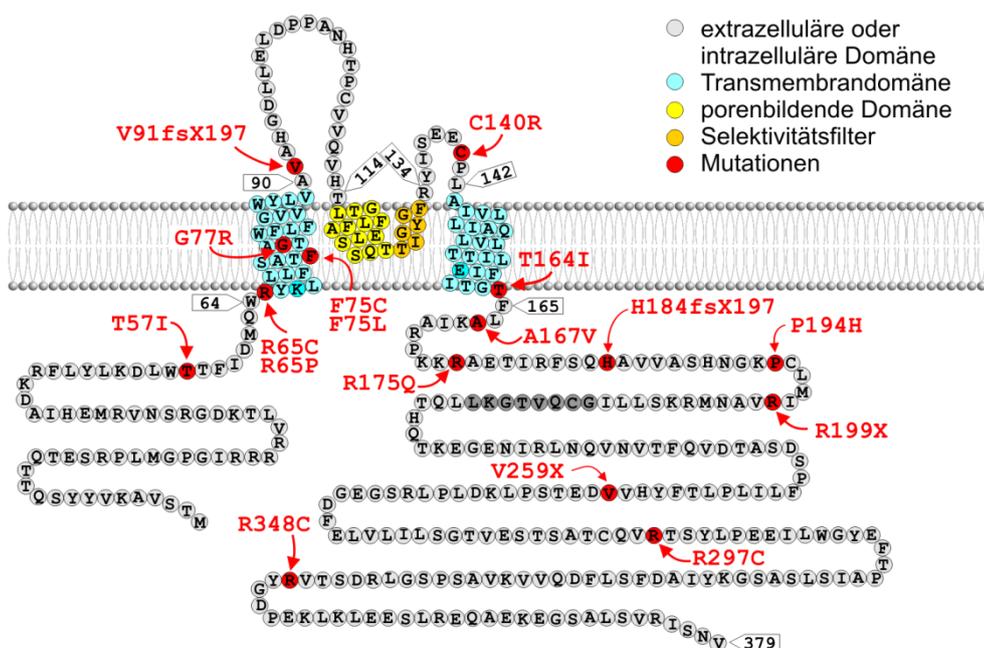


Abbildung 2 Schematische Darstellung des hKCNJ10-Monomers mit den bisher bekannten Mutationen (rot), die zum EAST-Syndrom führen

Schematische Membrantopologie von hKCNJ10 nach SwissProt P78508. Die verschiedenen Mutationen wurden sowohl im intrazellulären N- und C-Terminus des Proteins, als auch in der extrazellulären Domäne und in der Transmembrandomäne entdeckt. Im Bereich der porenbildenden Domäne (gelb) sind bisher noch keine Mutationen bekannt. (modifizierte Abbildung aus (38))

Im Jahr 2009 wurde die KCNJ10-assoziierte Erkrankung erstmals von zwei unabhängigen Studien beschrieben. Bockenbauer et al. bezeichneten die autosomal rezessiv vererbte Krankheit als EAST-Syndrom (43). Das Akronym steht für die wichtigsten Symptome, an denen die betroffenen Patienten litten: **E**pilepsie, **A**taxie, einer sensorineuralen **S**chwerhörigkeit und einer Salzverlust-Tubulopathie. Scholl et al. diagnostizierten zusätzlich eine mentale Retardierung und schlugen deshalb die Abkürzung SeSAME (**S**eizures, **S**ensorineural Deafness, **A**taxia, **M**ental Retardation, **E**lectrolyte Imbalance) vor (49). Die mentale Retardierung ist jedoch Diskussionsgegenstand, weil zentrale Phänotyp des EAST-Syndroms sehr variabel ist (50). Durch den Einfluss der früh einsetzenden und starken Ataxie sowie der Höreinschränkung ist die Beurteilung einer möglichen geistigen Retardierung schwierig. Strukturelle Veränderungen des Gehirns wurden nur bei einigen Patienten festgestellt.

Der Grund für die vielfältigen Symptome liegt darin, dass der Kalium-Kanal in ganz verschiedenen Geweben exprimiert wird. Der Funktionsverlust von KCNJ10 im Zentralnervensystem führt zur Epilepsie und Ataxie (51). KCNJ10 wird dort in den Gliazellen exprimiert und ist für die Hyperpolarisation der Zellen und das sogenannte "K⁺-spatial buffering" zuständig. Während der Repolarisation von Neuronen wird das in den Extrazellularraum ausgeschleuste Kalium über gliale Kalium-Kanäle wieder entfernt und damit eine Akkumulation verhindert. Durch den Funktionsverlust von KCNJ10, einem der wichtigsten Kalium-Kanäle in Gliazellen, kommt es zu einem verzögerten Abtransport von Kalium aus dem extrazellulären Raum und damit zu einer Übererregbarkeit der Neuronen (52).

Bei EAST-Patienten wurde auch eine Schwerhörigkeit festgestellt. KCNJ10 ist in der *Stria vascularis* der Cochlea an der Kalium-Sekretion und am Aufbau des endocochleären Potentials beteiligt. Kann dieses Potential durch den KCNJ10-Funktionsverlust nicht mehr generiert werden, fehlt auch die sensorische Signaltransduktion, was zu einer Einschränkung der Hörfähigkeit führt.

Zusätzlich zu dem schweren Hirnphänotyp und der Schwerhörigkeit haben die Patienten eine renale Tubulopathie, die im Kindesalter einsetzt. Der KCNJ10-Funktionsverlust im DCT, CNT und frühen CCD führt zu einem renalen Salzverlust, einer Aktivierung des RAS, einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose, einer Hypomagnesiämie und einer Hypocalciurie (43, 49). Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Kalium-Recycling über die basolaterale Membran eingeschränkt ist und folglich der Na⁺/K⁺-ATPase nicht ausreichend extrazellulär Kalium-Ionen für deren Transportaktivität zur Verfügung stehen. Dadurch steigt die intrazelluläre Natrium-Konzentration und beeinträchtigt sekundär aktive Natrium-abhängige Transportsysteme.

Durch die verringerte Triebkraft für den NCC in der apikalen Membran kommt es also zu einer verringerten Natriumchlorid-Resorption im DCT. Durch den Salzverlust wird das RAS aktiviert und Aldosteron erhöht die ENaC-vermittelte Salz-Resorption im CCD. Da in diesem Tubulus-Segment Natrium-Resorption und Protonen- bzw. Kalium-Sekretion gekoppelt sind, führt die gesteigerte Natrium-Aufnahme zu einem Verlust von Kalium- und Wasserstoff-Ionen über den Urin, was in einer Hypokaliämie und einer metabolischen Alkalose resultiert. KCNJ10-Kanäle sorgen weiterhin für eine starke Hyperpolarisation der Membran, die die Triebkraft für den spannungsabhängigen Ionen-Transport liefert (53). Beispielsweise sei hier der Calcium- und Magnesium-Transport über die basolaterale Membran zu nennen, der elektrogene, Natrium-gekoppelte Systeme nutzt. Durch die reduzierte Hyperpolarisation und die daraus resultierende, verminderte Triebkraft für die apikalen Kanäle TRPM6 und TRPV5 im DCT, erwartet man bei den EAST-Patienten auch eine eingeschränkte renale Resorption von Magnesium und Calcium. Da im Sammelrohr kein Magnesium mehr resorbiert werden kann, kommt es zu dessen renalem Verlust und zu einer

Hypomagnesiämie. Die vermehrte Ausscheidung von Calcium über den Harn scheint durch gesteigerte Resorptionsvorgänge im PT oder der TAL, die noch ungeklärt sind, überkompensiert zu werden, wodurch letztendlich zu wenig Calcium über den Urin ausgeschieden wird (Hypocalciurie).

Die meisten Patienten wurden aufgrund ihrer Krampfanfälle auffällig, während das EAST-Syndrom erst im Laufe der Behandlung diagnostiziert wurde. Blutanalysen von Patienten, die jünger als 3 Jahre waren, zeigten noch keine Auffälligkeiten. Im Alter von spätestens 6 Jahren bildeten sie jedoch eine hypokaliämische Alkalose aus, die durch erhöhte Bikarbonat- und niedrige Kalium-Konzentrationen im Blut charakterisiert war. Eine Hypomagnesiämie wurde erst bei Patienten diagnostiziert, die 7 Jahre oder älter waren. Während also EAST-Patienten bei der Geburt und im Laufe der ersten Lebensjahre keine Anomalien des Säure-Basen-Haushalts und des Elektrolyt-Haushalts aufwiesen, wurden die Symptome mit der Zeit schlimmer und die Patienten mussten ab etwa 5 Jahren diesbezüglich behandelt werden (54).

Mutationen in den Transportern und Kanälen des DCT führen oftmals zu schwerwiegenden Tubulopathien. Sie grenzen sich klinisch von Erkrankungen ab, die durch Störungen in den anderen Segmenten des Tubulussystems ausgelöst werden, ähneln sich aber untereinander bezüglich der Symptome. Ein weiteres Beispiel für eine derartige Erkrankung ist das Gitelman-Syndrom. Mit den beschriebenen Symptomen ähnelt der renale Phänotyp des EAST-Syndroms sehr dem Gitelman-Syndrom (55). Mutationen im SLC12A3-Gen, das für den NCC-Transporter im DCT kodiert, führen beim Gitelman-Syndrom zu dessen Funktionsverlust (56). Die mehr als 100 bisher entdeckten Mutationen in diesem Gen führen zu einem nicht oder nur eingeschränkt funktionsfähigen NCC. Die Gitelman-Patienten leiden wie die EAST-Patienten an einer Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, Hypocalciurie, einer metabolischen Alkalose und einem aktivierten RAS mit Hyperaldosteronismus. Im Gegensatz zum EAST-Syndrom haben die meisten Gitelman-Patienten aber keine veränderten Calcium-Konzentrationen im Serum (57).

1.5 Der Nierenphänotyp der konventionellen KCNJ10-Knockout-Maus

Es gibt viele Genmutationen, die beim Menschen zu schweren Krankheitsbildern führen. Die Analysen dieser Mutationen sind sehr informativ, um biologische Systeme besser zu verstehen. Neben Studien in Bakterien und anderen einfachen Organismen etablierte sich bald das Säugermodell Maus. Standardmäßig wird für eine Knockout-Maus das entsprechende Gen deletiert oder so modifiziert, dass ein funktionsloses Protein entsteht. Die anschließende

Betrachtung des Knockout-Modells lässt Rückschlüsse auf Funktion und Regulation des betroffenen Genprodukts zu und gibt Hinweise auf mögliche Kompensationsmechanismen.

Zur *in vivo* Funktionsanalyse von KCNJ10 wurde deshalb 2001 die konventionelle KCNJ10-Knockout-Maus von Neusch et al. generiert, jedoch nur der besonders auffällige Gehirn- und Retina-Phänotyp untersucht (58). Die Tiere nahmen nach der Geburt nicht mehr an Gewicht zu und starben sukzessive zwischen dem 8. und 24. Lebenstag. Neusch et al. gingen davon aus, dass die Tiere aufgrund eines schweren neurologischen Phänotyps bereits so früh starben. Die Stagnation in der Gewichtszunahme und eine Dehydratation wurden ebenfalls auf den zerebralen Phänotyp zurückgeführt, da die Tiere schwerer Nahrung aufnehmen konnten und bei der Konkurrenz um die Muttermilch den KCNJ10^{+/-}- und KCNJ10^{+/+}-Geschwister-Tieren unterlagen. Djukic et al. beschrieben 2007 die konditionale Gehirn-KCNJ10-Knockout-Maus. Im Gegensatz zur konventionellen Knockout-Maus, bei der ein inaktives Gen in die Keimbahn eingebracht wird, wird bei einer konditionalen Knockout-Maus das Gen entweder zeit-, oder wie bei dieser Maus, gewebsspezifisch inaktiviert. Auf diese Weise sollte die frühe Letalität der konventionellen Knockout-Mäuse umgangen werden. Aber auch diese Tiere starben ca. 3 Wochen nach der Geburt, jedoch damit etwas später als die konventionellen Knockout-Mäuse. Djovic et al. stellten deshalb die Vermutung auf, dass der zerebrale Phänotyp die Ursache für die frühe Letalität der Mäuse und der renale Salzverlust lediglich als ein verschlimmernder Faktor anzusehen sei (59).

Der Nierenphänotyp der konventionellen KCNJ10-Knockout-Mäuse wurde von Bockenbauer et al. 2009 analysiert (43). Um zu verhindern, dass Tiere untersucht werden, die bereits sehr krank waren, wurde die Phänotypisierung der Mäuse auf den dritten Tag nach der Geburt beschränkt. Diese Tiere wurden mit einem signifikanten Salzverlust über den Urin beschrieben, ebenso wie einer Retention von Calcium (60). Der Urin-Kreatinin-Wert der Knockout-Mäuse war aufgrund einer Polyurie niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen. Bockenbauer sieht die ZNS-Symptome jedoch ebenfalls als wichtigsten Grund für den frühen Tod.

Viele der Symptome der KCNJ10-Knockout-Maus, sofern an den Jungtieren bestimmbar, stimmten also mit dem Krankheitsbild der EAST-Patienten überein. Umfangreichere Experimente wie Blutanalysen und operative Eingriffe sind bei so jungen Tieren jedoch sehr schwer oder nicht durchzuführen. Generell ist eine Untersuchung an neugeborenen Knockout-Mäusen mit Gedeihstörung kompliziert, da die Tiere in deren Folge sekundäre Symptome zeigen und nicht ohne Weiteres mit den Kontroll-Tieren verglichen werden können. Weiterhin ist gerade eine Untersuchung der Nierenfunktion schwierig, da Mäuse in den ersten Lebenswochen dramatische physiologische Veränderung durchleben und die renalen Ausscheidungsprofile sich teilweise über wenige Tage komplett ändern (60). Deshalb können an diesen Jungtieren nur bedingt

Rückschlüsse auf den tatsächlichen renalen Phänotyp aufgrund eines konventionellen KCNJ10-Knockouts in der Maus gezogen werden. Für diesen Vergleich wäre also die Untersuchung einer adulten Maus die deutlich bessere Wahl. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den renalen KCNJ10-Knockout in adulten konditionalen Knockout-Mäusen zu untersuchen. Dafür musste vorab ein geeignetes Mausmodell gewählt werden.

1.6 Mausmodelle

Da viele Gene in mehr als einem Gewebe oder Organ exprimiert werden und der Verlust deren Funktion zu schweren Schäden führen kann, sterben konventionelle Knockout-Mäuse oft früh nach der Geburt oder sind bereits embryonal nicht lebensfähig. Dementsprechend suchte man nach einem neuen System, um genetische Modifikationen auf spezifische Zell- oder Gewebsarten einzugrenzen, während andere Gewebe davon unberührt blieben. Weiterhin suchte man nach einer Möglichkeit, ein Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung des Tieres zu deletieren, also z.B. erst, wenn das Tier adult ist. Über die letzten Jahre wurden diesbezüglich immer raffiniertere Methoden entwickelt, so z.B. das Cre/loxP- und das Tet-On-System. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Mäusen wurden beide Methoden angewandt, um einen nierenspezifischen und induzierbaren Knockout von KCNJ10 zu erzeugen.

1.6.1 Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System wurde in den 1980er Jahren entwickelt (61). Damals beschrieben Sternberg und Hamilton den Coliphagen P1, bei dem an spezifischen Stellen im Genom eine Rekombination möglich war (62). Sie identifizierten zwei nötige Komponenten. Die eine war die loxP-Stelle im Genom (locus of crossing over (x), P1), die den Ort der Rekombination festsetzte. Diese 34 bp lange loxP-Sequenz besteht neben der zentralen 8 bp-Kern-Sequenz (Spacer) aus zwei flankierenden palindromischen 13 bp-Sequenzen (63). Für eine erfolgreiche Rekombination muss sie zweimal im Genom vorkommen. Als zweite Komponente war ein Rekombinase Gen (Cre, causes recombination) vom Bakteriophagen P1 erforderlich. Das Cre-Gen kodiert für die Cre-Rekombinase aus der Familie der Integrasen, die nur auf loxP-Stellen im Genom beschränkt agieren kann (64). Das Enzym katalysiert als Homotetramer die Exzision des DNA-Abschnitts zwischen den loxP-Stellen. Dafür bindet je ein Cre-Monomer an eine der vier 13 Basenpaar-Sequenzen (65). Danach bildet es eine Schlaufe, bei der die loxP-Stellen aufeinanderliegen, um anschließend die Einzelstränge der DNA nacheinander an der Kern-Sequenz der loxP-Stellen

basenpaargenau zu öffnen und über Umesterung wieder zu verbinden. Die durch die Exzision herausgeschnittene DNA ist ringförmig und wird anschließend in der Zelle abgebaut (Abbildung 3).

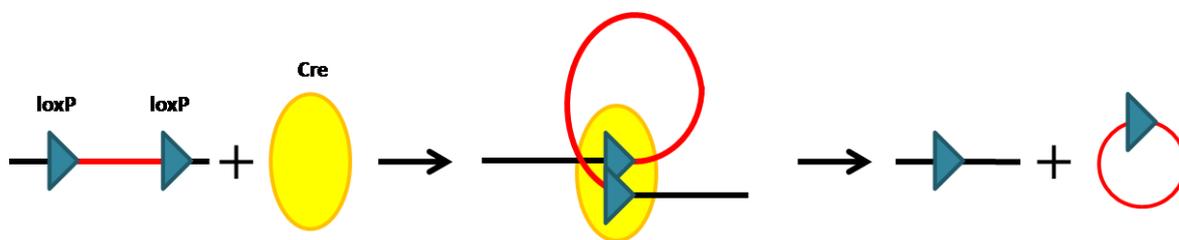


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Cre/loxP-Systems

Die Cre-Rekombinase (gelb) formt an den loxP-Stellen (petrol) eine DNA-Schleife und entfernt danach über Umesterung die DNA-Sequenz (rot) zwischen diesen kurzen loxP-Sequenzen. Nach der Exzision verbleibt eine loxP-Stelle im Genom, während sich die zweite in der ringförmigen, entfernten DNA befindet.

Das Cre/loxP-System wurde danach bei Hefen und Säugerzellen angewandt (61). Bereits 1988 wurde das System auf eine Mauszelllinie übertragen und mittlerweile ist es zur Herstellung gewebsspezifischer Knockout-Mäuse weit verbreitet (66, 67).

Wenn eine bestimmte DNA-Sequenz oder ein Gen aus der DNA entfernt werden soll, wird vor und hinter diesem DNA-Abschnitt eine loxP-Stelle gesetzt, das Gen ist damit gefloxt (floxed: flanked by loxP). Wenn die loxP-Sequenzen in die gleiche Richtung orientiert (*cis*) sind, kommt es zur Exzision, sind sie in entgegengesetzte Richtung orientiert, kommt es zur Inversion (68). In welchem Gewebe und zu welchem Zeitpunkt in einem Lebewesen ein Gen angeschaltet wird, hängt hauptsächlich von dem zugehörigen Promotor ab. Promotor und Cre-Gen werden dann zusammen als Transgen in das Mausgenom eingebracht. Bei der verwendeten KspCre-Maus wurde z.B. ein nierenspezifischer Promotor, der des Ksp-Cadherin-Gens, verwendet, um die Rekombinase-Expression auf die Niere einzuschränken (69). Bei der Entscheidung für einen Promotor muss bedacht werden, dass er möglichst nicht bereits in der Embryonalentwicklung aktiviert ist, da Tiere, bei denen ein wichtiges Gen schon früh ausgeschaltet wurde, oft nicht lebensfähig sind. Weiterhin wurde das prokaryotische Cre-Gen mit einem NLS (nuclear localization signal) aus dem SV40 T-Antigen fusioniert (70). Obwohl das Cre-Gen bereits Signale enthielt, die zur Lokalisation in den Zellkern von Säugerzellen führen, sollte damit die Rekombinationseffizienz in eukaryotischen Zellen erhöht werden.

Das Cre/loxP-System bietet viele Vorteile. Da es prokaryotischen Ursprungs ist und nicht nativ im Mausgenom vorkommt, kann so die Interaktion mit endogenen Prozessen minimiert werden. Darüber hinaus ist das Rekombinase-System überaus effizient, wenn die Erkennungsstellen eine

gewisse räumliche Nähe aufweisen. Das System funktioniert weiterhin auch ohne zusätzliche Cofaktoren, akzessorische Proteine oder ATP (71).

Für das vorgestellte Cre/loxP-System wurden zwei verschiedene gefloخته Mäuse verwendet, die gefloخته KCNJ10-Maus und die Reporter-Maus Tomato-EGFP (mT/mG). Es wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Cre-Mäuse getestet. Zur Wahl standen die nierenspezifische KspCre-Maus und die nierenspezifische, induzierbare Pax8Cre-Maus.

1.6.1.1 Die gefloخته KCNJ10-Maus

Die gefloخته KCNJ10-Maus wurde von McCarthy et al. 2007 generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abbildung 4) (59). Die loxP-Sequenzen wurden so im Exon 2 von KCNJ10 platziert, dass sie sich upstream und downstream von der kodierenden Sequenz des Gens befanden. Bei einer erfolgreichen Rekombination durch Cre wird diese also komplett herausgeschnitten und ein KCNJ10 Protein kann damit nicht biosynthetisiert werden.

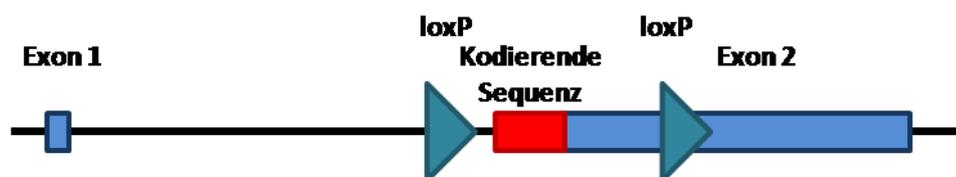


Abbildung 4 Schematische Darstellung des gefloختen KCNJ10 Gens

Für die gefloخته KCNJ10-Maus wurden die loxP-Stellen (petrol) so in das KCNJ10-Gen eingefügt, dass sich die erste im Intron 1 und die zweite im nicht-kodierenden Anteil von Exon 2 (blau) befindet. Der kodierende Sequenzanteil von Exon 2 (rot) wird bei erfolgreicher Rekombination komplett entfernt.

1.6.1.2 Die Tomato-EGFP-Maus

Um die Rekombinationseffizienz von KspCre- und induzierbaren Pax8Cre-Mäusen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie zu testen, wurden sie mit der Reporter-Maus Tomato-EGFP (auch mT/mG) gekreuzt (72). Diese Maus trägt zwischen den loxP-Stellen ein membrangerichtetes Tomato-Tandem-Dimer, eine Variante des dsRed (Anregungsmaximum bei 554 nm, Emissionsmaximum bei 581 nm). Nach einem anschließenden Poly(A)-Schwanz und der zweiten loxP-Stelle wurde ein membrangerichtetes Enhancend-Green-Fluorescent-Protein-Dimer (EGFP) platziert (Anregungsmaximum bei 484 nm, Emissionsmaximum bei 510 nm). In Zellen, in denen es nicht zur Rekombination mit Cre kommt, wird dementsprechend allein das Tomato-Protein exprimiert, welches bei einem grünen Anregungslicht eine orange Fluoreszenz in allen Membranen zeigt. Sofern es zur Exzision des DNA-Abschnitts zwischen den loxP-Sequenzen kommt, wird statt dessen das membrangerichtete EGFP-Protein exprimiert, dessen Gen direkt

nach der zweiten loxP-Stelle gesetzt wurde. Die Polyadenylierungssequenz im Anschluss an die Tomato-Sequenz ist notwendig, damit nach der Expression von Tomato nicht auch EGFP exprimiert wird. So wird in den Zellen eine Doppelfluoreszenz ausgeschlossen und jede Zelle fluoresziert entweder unter dem grünen oder blauen Anregungslicht (Abbildung 5).

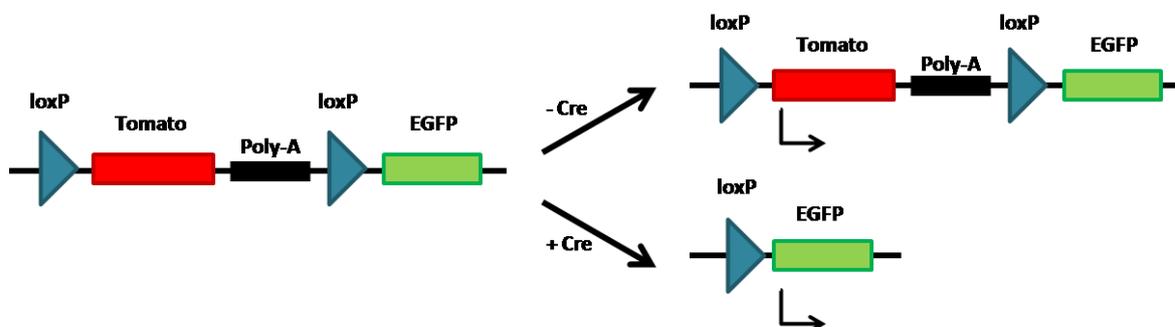


Abbildung 5 Schematische Darstellung des loxP-Systems bei der Tomato-EGFP-Maus

Das Tomato-EGFP-Konstrukt besteht aus einem Tomato-Gen (rot), das sich der ersten loxP-Sequenz (petrol) anschließt. Danach folgen eine PolyA-Sequenz (schwarz), die zweite loxP-Stelle und das EGFP-Gen (rot). In Abwesenheit der Cre-Rekombinase wird nur Tomato exprimiert, während in Anwesenheit des Enzyms die Tomato-PolyA-Sequenz ausgeschnitten und ausschließlich EGFP exprimiert wird. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann so untersucht werden, in welchen Zellen/Geweben die Cre-Rekombinase aktiv ist.

Muzumdar et al. zeigten, dass die Intensität der Tomato-Fluoreszenz zwischen verschiedenen Zelltypen und Organen variiert, abhängig von Eigenschaften wie Protein-Synthese und Membrantransport. Sie testeten die Eigenschaften des EGFP-Proteins mit einer Cre-Maus, deren Promotor ubiquitär aktiv ist, um zu bestätigen, dass das System in allen Geweben und Organen funktioniert. Weiterhin rieten sie, Tiere erst zwei Wochen nach Beginn der EGFP-Expression zu untersuchen, da der Abbau des Tomato-Proteins Zelltyp-spezifisch etwa 7 Tage dauern kann. Da die Proteine membrangerichtet sind, kann auch die Zellstruktur von bestimmten Geweben untersucht werden, wie z.B. der Bürstensaum von proximalen Tubuluszellen.

1.6.1.3 Die KspCre-Maus

Das Ksp-Cadherin gehört zur Superfamilie der Cadherine. Diese sind Calcium-abhängige, membranassoziierte Glykoproteine, die eine wichtige Rolle bei der interzellularen Interaktion während der Embryogenese, Morphogenese und Aufrechterhaltung von Geweben spielen (73). Im Gegensatz zu anderen Cadherinen hat das Cadherin 16 eine eindeutige Organ-Spezifität und ist ausschließlich in der Niere zu finden (deswegen auch Kidney-specific-Cadherin, Ksp). Thomson et al. analysierten adulte Kaninchennieren und beschrieben eine Ksp-Cadherin-Expression in der basolateralen Membran von Epithelzellen entlang der gesamten Länge des

Nephrons, vom proximalen Tubulus bis zum Sammelrohr, wobei ab dem Verbindungsstück nur eine Subpopulation von Zellen eine Expression zeigte (74).

Die Gruppe um Igarashi testete auf der Suche nach einem geeigneten nierenspezifischen Promotor verschiedene Sequenzabschnitte, die dem Maus-Ksp-Cadherin vorgeschaltet waren (75). Das Ziel war, eine möglichst effiziente Expression des nachgeschalteten Gens entlang des Nephrons zu erreichen. Der abschließend verwendete Promotor zeigte in transgenen Mäusen neben der Nierenspezifität die gleiche Nephron-Expression wie das Ksp-Cadherin in der Kaninchenniere. Dieser Promotor wurde zur Verwendung für ein nierenspezifisches Cre/loxP-System vor das Cre-Rekombinase-Gen gesetzt (70). Die daraus resultierende KspCre-Maus wurde für einige Versuche in dieser Arbeit verwendet.

1.6.2 Das Tet-On-System

Das Tet-System ist ein konditionales Expressions-System. Es basiert auf einer autoregulatorischen Tetracyclin-Resistenz, die z.B. im Bakterium *E. coli* zu finden ist (76). Diese "tet" Determinante auf Transposon 10 besteht aus zwei Operator-Einheiten, die zuerst für die Aktivierung und danach auch die Repression eines Resistenzproteins sorgen (Autoregulation), welches das Antibiotikum aus den Zellen schleust. Beide Operator-Einheiten bilden mit je einem tet-Promotor die regulatorische Einheit (77). In Abwesenheit von Tetracyclin binden die Tet-Repressor-Proteine an diesen Regulator und hemmen eine Transkription der nachgeschalteten Gene (78). In Anwesenheit des Antibiotikums bindet Tetracyclin an diese Repressor-Proteine und sie verlieren durch eine Konformationsänderung ihre Bindung zum Regulator. Dadurch wird zum einen die Synthese des Resistenzproteins induziert, zum anderen werden mehr Tet-Repressor-Proteine synthetisiert, die dimerisieren und zur Regulation des Systems an die regulatorische Sequenz des Transposons binden.

Als das Tet-System für die Verwendung in der Forschung adaptiert werden sollte, wurde zuerst das sogenannte Tet-Off-System für HeLa-Zellen konzipiert. Es bestand aus zwei Komponenten. Die eine setzte sich aus einer prokaryotischen Tetracyclin-Repressor-Sequenz (tetR) zusammen, die mit der aktivierenden Domäne des Virionproteins VP16 des Herpes simplex Virus kombiniert wurde. Daraus entstand der eukaryotische Transaktivator tTA (Tetracycline-controlled transactivator) (79). In Anwesenheit von Tetracyclin ist er inaktiv, sorgt aber in dessen Abwesenheit für die Transkription des 35 kDa große tTA-Proteins. Die zweite Komponente ist das Tetracycline-responsive promotor element (TRE). Es besteht aus einem Minimalpromotor des menschlichen Cytomegalievirus (human cytomegalovirus hCMV) und der tetO-Sequenz. Diese tet-Operator-Sequenz ist die 19 bp-inverted-repeat-Operator-Sequenz aus dem Transposon 10. Sie

wurde als Heptamer mit Abständen upstream des Minimal-Promotors gesetzt. Wird also beim Tet-Off-System Tetracyclin der Zellkultur zugesetzt, wird das permanent exprimierte tTA-Protein durch das Antibiotikum gebunden. In Abwesenheit des Antibiotikums kann das tTA jedoch an die TRE-Sequenz binden und diese aktivieren. Dementsprechend wird beim Fehlen von Tetracyclin das dem TRE-an anschließende Gen transkribiert.

Eine logische Weiterentwicklung des Tet-Off-Systems war das Tet-On-System, da die ständige Anwesenheit von Tetracyclin in der Zellkultur nicht für alle Versuche günstig war. Durch die Veränderung von 4 Aminosäuren in der tetR-Sequenz wurde aus tTA der "reverse Tetracycline-controlled transactivator" rtTA, der den entgegengesetzten Phänotyp verursachte (80). Das rtTA-Protein braucht durch eine veränderte Bindecharakteristik die Anwesenheit eines Tetracyclin-Moleküls, um an die TRE-Sequenz zu binden. In Abwesenheit dieses Effektors erkennt rtTA die tetO-Sequenz nicht (Abbildung 6). Gossen et al. haben ebenso verschiedene Tetracyclin-Derivate getestet und Doxycyclin hat sich als sehr effektiv herausgestellt.

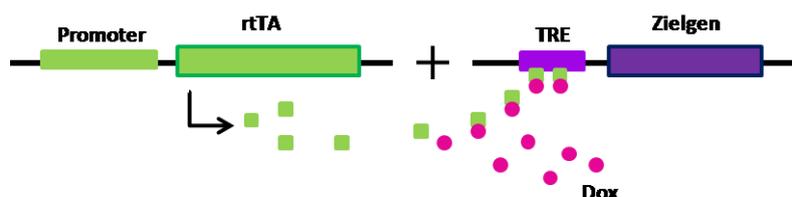


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Tet-On-Systems

Der Promotor reguliert, in welchem Gewebe und zu welchem Entwicklungsstand das ihm zugehörige Protein exprimiert wird. Ist er aktiv, wird rtTA (grün) transkribiert. Das rtTA-Protein erfährt jedoch erst durch die Bindung an Doxycyclin (pink) die nötige Konformationsänderung, um an das TRE-Element (violett) binden zu können. Durch diese Aktivierung des TRE wird anschließend das nachgeschaltete Zielgen exprimiert.

Ein Jahr später wurde das Tet-On-System bereits auf das Mausmodell übertragen (81). Als bester Transaktivator hierfür identifizierte Urlinger $rtTA2^S$ -M2-Konstrukt, das bereits bei niedriger Doxycyclin-Konzentration aktiviert wird und in eukaryotischen Zellen äußerst stabil ist (82). Es konnte durch die Kreuzung mit einer Indikator-Maus gezeigt werden, dass das System schnell und zuverlässig ist. Das Ausmaß der Aktivität in einem bestimmten Gewebe war dabei vor allem promotorabhängig.

1.6.2.1 Die induzierbare Pax8Cre-Maus

Ein Beispiel für das Tet-On-System im Säugermodell Maus ist die induzierbare, nierenspezifische Pax8Cre-Maus. Als Alternative zur KspCre-Maus sollte sie ebenfalls für die Analyse des KCNJ10-Knockouts in der Niere verwendet werden. Wie bereits vorher beschrieben, gingen Konfuji et al.

davon aus, dass der Grund für den frühen Tod der konventionellen KCNJ10-Knockout-Maus der schwere Gehirn-Phänotyp war (83). Dennoch konnten sie nicht auszuschließen, dass die nierenspezifischen KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse aufgrund eines möglichen Salzverlusts ebenfalls früh letal wären. Dementsprechend wurde für diese Arbeit alternativ zum konditionalen Knockout-System (KspCre-Maus) ein konditionales, induzierbares Knockout-System verwendet, welches Cre/loxP und Tet-On verbindet. Dabei wird der Knockout nicht nur auf die Niere eingegrenzt, sondern auch erst bei Doxycyclin-Gabe induziert. So kann ein entwicklungsbedingter Defekt umgangen und der Knockout erst bei den adulten Tieren herbeigeführt werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber einem Tet-Off-System ist die einmalige Induktion der Knockouts. So wird den Tieren einmal über einen längeren Zeitraum ein Antibiotikum verabreicht und die Deletion im Genom verursacht. Das DNA-Fragment, das durch die DNA-Exzision zwischen den geflochtenen Sequenzen entsteht, wird danach in der Zelle abgebaut. Dadurch ist dieser Vorgang nicht umkehrbar. Die Anzahl an Tubuluszellen, die auf die Doxycyclin-Induktion reagieren und die Exzision von KCNJ10 danach vorantreiben, bleibt also, wenn man Zellproliferation und Apoptose ausklammert, bis zum Tod der Tiere konstant.

Bei den verwendeten induzierbaren Pax8Cre-Mäusen handelt es sich um eine doppelt transgene Mauslinie. Sie entstand aus der Kreuzung der Pax8-rtTA2^S-M2-Linie und einer TetOCre-Linie, die aus einer Podozin-rtTA2^S-M2/TetOCre-Linie ausgekreuzt wurde (84, 85). Diese Mäuse sind aufgrund des Pax8-Promotors nierenspezifisch. Pax8 ist ein Paired-Box-Gen und ein transkriptioneller Aktivator (86). Während der Mausentwicklung spielt er eine wichtige Rolle in der Niere, im Gehirn und der Schilddrüse (87). In adulten Mäusen ist Pax8 in allen größeren Organen außer der Niere praktisch nicht vorhanden. Nach dem Pax8-Promotor wurde das rtTA2^S-M2-Konstrukt gesetzt. Zur Überprüfung wurden Mäuse generiert, bei denen β -Galactosidase dem Konstrukt nachgeschaltet war. Testfärbungen von Organschnitten zeigten hauptsächlich eine Lokalisation in der Niere, welche sich dort ausschließlich auf die Tubuli beschränkte, während Glomeruli und Blutgefäße keine Pax8-regulierte β -Galactosidase-Expression zeigten (84). Das tetOCre-Element besteht wie bereits oben beschrieben aus der tetO-Sequenz mit hCMV-Minimalpromotor, dem das Cre-Rekombinase-Gen nachgeschaltet ist (Abbildung 7).

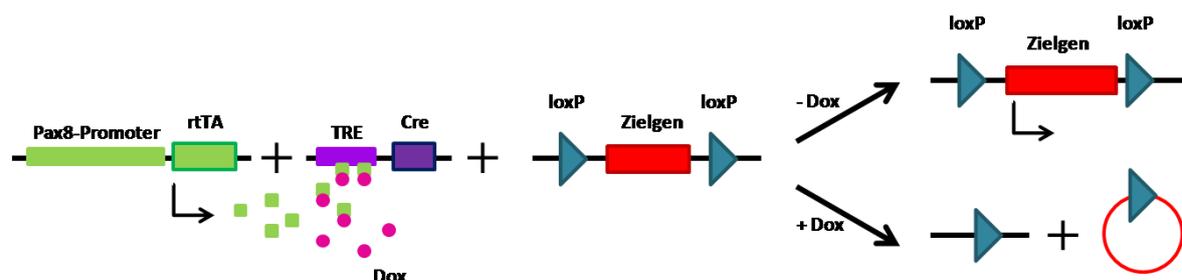


Abbildung 7 Schematische Darstellung des induzierbaren Pax8Cre-Knockout-Systems

Der Pax8-Promotor reduziert die Expression der nachgeschalteten Gene auf die Niere. Ist er aktiv, wird rtTA (grün) transkribiert, welches Doxycyclin (pink) bindet und anschließend über die Bindung an das TRE die Expression Cre-Rekombinase stimuliert. Somit kann das Zielgen zwischen den loxP-Sequenzen deletiert werden. Das System hängt also zum einen vom Promotor ab, zum anderen von der Anwesenheit eines Tetracyclin-Derivats.

Für diese Arbeit wurden die soeben beschriebenen Mausmodelle miteinander verglichen. Zuerst wurden beide Modelle auf ihre Cre-Rekombinase-Effizienz getestet. Nach der Gegenüberstellung wurde das nierenspezifische Knockout-System gewählt, das sowohl effektiv als auch einheitlich wirkungsvoll ist. Dieses Knockout-Maus-System wurde anschließend für die Untersuchungen des renalen Phänotyps in KCNJ10-Knockout-Mäusen verwendet.

2 Zielsetzung

2009 wurde erstmals ein neuartiges Syndrom zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Bockenbauer et al. nannten die autosomal rezessive Erbkrankheit EAST-Syndrom, wobei EAST als Akronym für die wichtigsten Leitsymptome der Erkrankung, nämlich **Epilepsie**, **Ataxie**, sensorineurale **Schwerhörigkeit** und eine renale **Tubulopathie** steht (43). Scholl et al. erkannten als weiteres Symptom eine mentale Retardierung und gaben der Erkrankung daher den Namen **SeSAME-Syndrom** (49). Die Erkrankung beruht auf einem teilweisen bis vollständigen Verlust der Kanalaktivität des einwärtsgerichtenden Kalium-Kanals KCNJ10 (38, 45–48). Da dieser Kanal in verschiedenen Geweben exprimiert wird, ist die Symptomatik der Erkrankung sehr komplex. Die verminderte Kanalfunktion in der Niere führt zu einer Salzverlust-Tubulopathie, die dem Gitelman-Syndrom sehr ähnlich ist. Die Patienten leiden neben dem renalen Salzverlust an einer Hypermagnesiurie, einer Hypocalciurie und einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose. Weiterhin haben die Betroffenen eine verringerte Urinkonzentrierung und ein stimuliertes Renin-Angiotensin-System.

Um die Symptomatik und die dahinter stehenden Kompensationsmechanismen des EAST-Syndroms besser zu verstehen, sollte an einem murinen $KCNJ10^{-/-}$ -Knockout-Modell die Bedeutung des Kalium-Kanals in der Niere untersucht werden. Bereits Neusch et al. berichteten, dass die konventionelle $KCNJ10^{-/-}$ -Knockout-Maus aufgrund des schweren Gehirn-Phänotyps eine maximale Lebenserwartung von zwei Wochen zeigte (58). Untersuchungen an dieser Maus waren deshalb nur in den ersten Lebenstagen möglich (43).

Ziel dieser Arbeit war es darum, ein geeignetes murines, nierenspezifisches Knockout-System zu finden, bei dem die Mäuse im adulten Stadium untersucht werden konnten. Dabei sollten zwei verschiedene nierenspezifische Knockout-Modelle, das KspCre-Mausmodell und das induzierbare Pax8Cre-Mausmodell, getestet und miteinander verglichen werden.

Weiterhin sollte mit dem geeigneteren nierenspezifischen Knockout-System der renale Phänotyp dieser Mäuse untersucht werden und mit den Symptomen der EAST-Patienten verglichen werden. Durch Funktionsmessungen sollten außerdem eventuelle kompensatorische Maßnahmen, die mit dem KCNJ10-Funktionsverlust einhergehen, aufgedeckt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Augenschere und weitere chirurgische Instrumente	F S T Fine Science Tools Inc., Foster City, CA, USA
Blutgasanalysegerät pHox plusM	Nova biomedical, Waltham, MA, USA
Fluorespektrometer Nanodrop 3300	Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, NC, USA
Gasmischeinheit für Isofluran-Verdampfer	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Ionenchromatograph ICS-1600 Dionex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isofluran-Verdampfer Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck, D
Kryostat Leica CM3050	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Light Cycler LC480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Metabolismuskäfig für einzelne Maus	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Rollerpumpe Ismatec REGLO analog	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld, D
Spectrophotometer Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop products, Wilmington, NC, USA
Thermocycler Biometra T Personal	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermocycler Biometra T Professional Basic Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, D
Zentrifuge Hereaus Fresco21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller, Ort
Begrenzungsstift (Fettstift)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
130 µl-Glaskapillaren (heparinisiert)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Mounting-Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Polysin Objektträger	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
Tissue-Tek Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL

3.3 Chemikalien, Enzyme und Substanzen

Substanz	Hersteller, Ort
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
Amilorid Hydrochlorid Hydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
BSA 100x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
dNTPs	QIAGEN GmbH, Hilden, D
EGTA	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Heparin-Lösung Liquemin N 25.000 I.E./5 ml	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Hydrochlorothiazid	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
M-MLV RT RNase Inhibitor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
M-MLV RT 5x Buffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
NH ₄ -Acetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Random Hexamer Primer (100 μ M)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
RNase Inhibitor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, D
TAE-Puffer (50 x)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA

3.4 Kits

Name des Kits	Hersteller
Aldosterone ELISA	IBL International GmbH, Hamburg, D
REDTaq Ready Mix	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
SYBR Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D

3.5 Primer

Genotypisierungs-Primer:

Konstrukt	Primer	Primer-Sequenz (5' nach 3')	Annealing-Temperatur	Amplikon-Länge
mKCNJ10	Sense: Antisense:	TGATGTATCTCGATTGCTGC CCCTACTCAATGCTCTTAAC	55 °C	wt: 424 bp flox: 559 bp
KspCre	Sense: Antisense:	CAGTGACAGACCAAGAGCT GCGCCTGAAGATATAGAAG	60 °C	750bp
Pax8- rtTA2 ^S -M2	Sense: Antisense:	CCATGTCTAGACTGGACAAGA CTCCAGGCCACATATGATTAG	55 °C	640 bp
TetO-Cre	Sense: Antisense:	CCGTAGCTCCAGCTTCACC ACTTGACAGTTCTTGACGGC	60 °C	668 bp

(m: Maus)

Primer für die quantitative Realtime PCR:

Zielgen	Primer	Sequenz	Annealing-Temp.	Amplikon-Länge
mβ-Actin	Sense: Antisense:	CCACCGATCCACACAGAGTACTT GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	57 °C	98 bp
mAQP2	Sense: Antisense:	GATGATCACTGGGTCTTCTG GGAACAGCAGGTAGTTGTAG	57 °C	79 bp
mCalbindin	Sense: Antisense:	CACAGACCTCATGCTGAAAC GGTAGTAACCTGGCCATCTC	57 °C	78 bp
mKCNJ10	Sense: Antisense:	AGTCTTGGCCCTGCCTGT TTAGCGACCGACGTCATCT	57 °C	131 bp
mKCNJ16	Sense: Antisense:	TACCGCTGTGTCACCGAAGA GCCAAGGCTGCTCCAATGAT	57 °C	104 bp

Zielgen	Primer	Sequenz	Annealing-Temp.	Amplikon-Länge
mNCC	Sense: Antisense:	CTGTGCGTGGCTACCTGC TGGAGGCATGGAAGCAGC	61 °C	141 bp
mNHE3	Sense: Antisense:	ATGCAGTGACTGTGGTCTTG CAGGCTCACCACGAAGAAGG	61 °C	116 bp
mNKCC2	Sense: Antisense:	TCTGCATCTGCTGCGAAG GGACACCGTCCCTGAAGC	61 °C	153 bp
mSGLT1	Sense: Antisense:	TAATCGTGGTACCGTTGGAG CTGCTCCTGTGCTGCCA	57 °C	128 bp
mTRPV5	Sense: Antisense:	TGACTTCCGGCAAAGAGGAG AGTATGGAGCAGCCTCCATC	61 °C	104 bp
mTRPM6	Sense: Antisense:	CACCACTCCAAGTACATTAGAAC GGCAGTCCATATTCCA	57 °C	89 bp

(m: Maus)

3.6 PCR-Programme

Genotypisierungs-PCR

m-KCNJ10

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
1	94 °C	3:00	-
2	94 °C	0:30	35 x (Schritt 2 bis 4)
3	55 °C	0:30	
4	72 °C	0:30	
5	72 °C	5:00	-
6	4 °C	∞	-

KspCre

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
1	94 °C	3:00	-
2	94 °C	0:30	35 x (Schritt 2 bis 4)
3	60 °C	0:30	
4	72 °C	1:00	
5	72 °C	5:00	-
6	4 °C	∞	-

Pax8-rtTA2^S-M2

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
1	96 °C	0:30	-
2	95 °C	1:30	-
3	94 °C	0:40	35 x (Schritt 3 bis 5)
4	55 °C	0:30	
5	72 °C	0:45	
6	72 °C	5:00	-
7	4 °C	∞	-

TetOCre

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
1	94 °C	2:00	-
2	94 °C	0:30	35 x (Schritt 2 bis 4)
3	60 °C	0:30	
4	72 °C	0:45	
5	72 °C	5:00	-
6	4 °C	∞	-

cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
1	20 °C	10 min
2	50 °C	50 min
3	70 °C	15 min
4	10 °C	∞

quantitative PCR

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
1	95 °C	10:00	-
2	95 °C	0:15	40 x (Schritt 2 bis 4)
3	x °C	0:20	
4	72 °C	0:20	
5	95 °C	0:05	-
6	x °C	1:00	-
7	97 °C	0:11	
8	40 °C	∞	-

x °C: Annealing-Temperaturen für jeweilige Primerpaare unter: 3.5 Primer für die quantitative Realtime PCR

3.7 Lösungen und Puffer**Antikörperverdünnungslösung**

Substanz	Menge
BSA	0,5 %
Triton-X100	0,04 %

in PBS

Blocklösung

Substanz	Menge
BSA	5 %
Triton-X100	0,04 %

in PBS

Fixierlösung 1

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,44	90,0
K ₂ HPO ₄	174,18	15,0
EGTA	380,40	1,0
MgCl ₂	203,40	2,0
Saccharose	342,30	100,0
Paraformaldehyd	30,03	3 %

in Aqua dest.

pH: 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Fixierlösung 2

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,440	90,0
K ₂ HPO ₄	174,180	15,0
EGTA	380,400	1,0
MgCl ₂	203,300	2,0
Saccharose	342,300	17 %
Paraformaldehyd	30,03	1 %

in Aqua dest.

pH: 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

PBS-Puffer

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,440	137,0
KH ₂ PO ₄	136,090	1,8
Na ₂ HPO ₄	141,960	10,3

in Aqua dest.

pH: 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Tailbuffer

Substanz	Menge
EDTA	0,1 M
SDS	0,5 %
Tris-HCl	50 mM
Aqua dest.	ad 50 ml

pH 8,0 (eingestellt mit 1 M NaOH -Lösung)

TE-Puffer

Substanz	Menge
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

in Aqua dest.

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

3.8 Antikörper und Färbesubstanzen

Art	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primär-AK	Anti-KCNJ10 (rabbit)	1:400	Alomone labs, Jerusalem, IL
Primär-AK	Anti-AQP2 (goat)	1:500	Alomone labs, Jerusalem, IL
Primär-AK	Anti-Calbindin (mouse)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA
Sekundär-AK	Alexa Fluor 488 Donkey anti rabbit	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Sekundär-AK	Alexa Fluor 555 Donkey anti goat	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Sekundär-AK	Alexa Fluor 647 Donkey anti mouse	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Sekundär-AK	Alexa Fluor 647 Donkey anti rabbit	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Farbstoff	HOE33342 (5 µM)	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK

3.9 Versuchstiere

3.9.1 Verwendete Versuchstiere

Die für die Untersuchungen verwendeten Mauslinien stammten von Prof. Dr. Ken D. McCarthy, Department of Pharmacology, University of North Carolina (KCNJ10^{flox/flox}) bzw. Prof. Dr. Tobias B. Huber, Nephrologie und Allgemeinmedizin, Universitätsklinikum Freiburg (KspCre, induzierbare Pax8Cre, Tomato-EGFP). Genaue Informationen zu den genetischen Veränderungen dieser Mauslinien finden sich unter 1.6 .

3.9.2 Mausmodelle

Die Mäuse wurden, wenn in den Versuchsbeschreibungen nicht anders angegeben, in einem konventionellen Tierstall unter einem 12-Stunden-Licht-Dunkel-Rhythmus mit freiem Zugang zu Leitungswasser und einer Standard-Mausdiät (vgl. Anhang 7.1.1 Futter-Zusammensetzung) gehalten.

3.9.3 Verpaarungen

Für die Vererbung des geflochtenen KCNJ10-Gen gelten die Mendelschen Regeln. Bei den Konstrukten Pax8-rtTA2^S-M2, TetO-Cre (beide in der doppelt transgenen induzierbaren Pax8Cre-Maus) und KspCre handelt es sich jedoch um Transgene, die einmal oder auch mehrmals an unterschiedlichen Positionen im Genom vorkommen und deswegen nicht nach den Mendelschen Regeln vererbt werden. Da sie auch durch Verpaarungen über die Generationen hinweg herausgekreuzt werden können, mussten sie über entsprechende Genotypisierungen bei jedem Versuchstier nachgewiesen werden. Auf das Konstrukt Tomato-EGFP wurde als Ausnahme nicht genotypisiert, da durch die Fluoreszenz der endogen produzierten Chromosomen bereits optisch unter dem entsprechenden Fluoreszenzlicht die Anwesenheit von Tomato- bzw. EGFP-Membran-Proteinen erkennbar war.

Tabelle 1 erläutert die Verpaarungen der verschiedenen Mauslinien, die für diese Arbeit relevant sind. Wie bereits erwähnt, war die Anwesenheit der einzelnen Transgene vorausgesetzt. Die geflochtenen Mäuse wurden jeweils so gewählt, dass ein funktionsfähiges Cre/loxP-System zustande kam.

Zum einen wurde die KspCre-Mauslinie getestet. Die untersuchten KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere stammen aus Heterozygotenverpaarungen (Tabelle 1, Verpaarung # 3).

Verpaarung	Kreuzung von		Genotypen der Nachkommen
	Genotyp 1	Genotyp 2	
# 1	KspCre	x Tomato-EGFP	KspCre/ Tomato-EGFP
# 2	Induzierbares Pax8Cre	x Tomato-EGFP	Induzierbares Pax8Cre/ Tomato-EGFP
# 3	KspCre	x KCNJ10 ^{flox/flox}	KspCre/KCNJ10 ^{flox/flox} KspCre/KCNJ10 ^{flox/wt} KspCre/KCNJ10 ^{wt/wt}
# 4	Induzierbares Pax8Cre	x KCNJ10 ^{flox/flox}	Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{flox/flox} Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{flox/wt} Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{wt/wt}
# 5	Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{flox/flox}	x Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{flox/flox}	Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{flox/flox}
# 6	Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{wt/wt}	x Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{wt/wt}	Induzierbares Pax8Cre/ KCNJ10 ^{wt/wt}

Tabelle 1 Übersicht über die Verpaarungen verschiedener Maus-Genotypen

Für das andere nierenspezifische Cre/loxP-System wurden induzierbare Pax8Cre-Tiere mit KCNJ10^{flox/flox}-Tieren (Verpaarung # 4, F₀-Generation) gekreuzt. Danach wurde eine Heterozygotenverpaarung bezüglich KCNJ10 (induzierbare Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}) aus der F₁-Generation angesetzt. Die heterozygoten, induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}-Tiere der F₂-Generation wurden nicht weiter für Zuchten oder Versuche verwendet, wohingegen die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere in Knockout-Zuchten (Verpaarung # 5) und die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere für Kontroll-Zuchten (Verpaarung # 6) verpaart wurden. Diese Homozygotenverpaarungen bezüglich KCNJ10 wurden angelegt, um die Zahl an Tieren so gering wie möglich zu halten.

3.9.4 Induktion des Knockouts bei Pax8Cre-Mäusen

Induzierbare Pax8Cre-Tiere benötigen Doxycyclin, um die Expression der Cre-Rekombinase zu starten und eine Rekombination an geflochten Allelen möglich zu machen. Für die Versuche wurden die Tiere 21 Tage mit 2 mg/ml Doxycyclin im Trinkwasser induziert. Der Doxycyclin-Lösung, die in dieser Zeit ausschließlich und *ad libitum* angeboten wurde, wurde 5 % Saccharose zugesetzt, um den bitteren Geschmack des Antibiotikums zu kaschieren. Nach Induktion der Tiere folgte jeweils eine "Auswaschphase" des Antibiotikums von 2 Wochen. Anschließend wurden die Tiere für Versuche verwendet (Abbildung 8).

Wurden Tiere mit Doxycyclin behandelt, sind diese mit "ind" (induziert) nach der Genotyp-Abkürzung gekennzeichnet (z.B. Pax8Cre/Tomato-EGFP/ind). Um nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse von den Knockout-Tieren unterscheiden zu können, werden diese entsprechend mit "nicht-ind" (nicht-induziert) gekennzeichnet. Doxycyclin-behandelte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse wurden als schein-induziert bezeichnet.

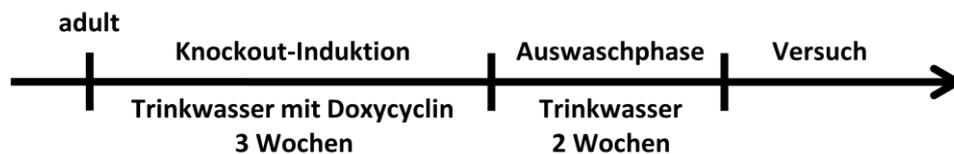


Abbildung 8 zeitlicher Ablauf der Knockout-Induktion von geflochten, induzierbaren Pax8Cre-Tieren

Für die Phase der Knockout-Induktion wurde das Trinkwasser der adulten Mäuse mit 2 mg/ml Doxycyclin und 5 % Saccharose versetzt. In der anschließenden Auswaschphase tranken die Tiere ausschließlich Leitungswasser ohne Zusätze. Erst danach wurden die Mäuse für Versuche eingesetzt. Für die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Kontrollen wurden die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse vergleichbar stimuliert.

3.9.5 Kontroll-Tiere

Für KspCre/Tomato-EGFP-Tiere waren keine direkten Kontrollen möglich. Dennoch konnte das Rekombinations-Verhalten in der Niere mit dem der Pax8Cre/Tomato-EGFP-Mäuse verglichen werden. Als Kontrollen für induzierte Pax8Cre/Tomato-EGFP-Tiere wurden nicht-induzierte Tiere verwendet. KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse wurden mit KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren verglichen.

Kontroll-Tiere für induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere waren entweder Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse, die ebenfalls mit Doxycyclin-Wasser behandelt wurden (schein-induziert) oder Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere, die nicht Doxycyclin behandelt wurden (nicht-induziert). Um gleiche Rahmenbedingungen für die Versuche zu schaffen, wurden beide möglichen Kontrollgruppen verglichen und unter "5.1 Wahl der KCNJ10-Knockout-Maus" (Seite 74) diskutiert.

3.10 Untersuchungen der Knockout-Mäuse

Alle unter 3.10 beschriebenen Tierversuche wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes beantragt und durch die Regierung der Oberpfalz genehmigt. Falls nicht anders angegeben, war die Verteilung von Männchen und Weibchen in den jeweiligen Versuchsgruppen ähnlich.

3.10.1 Probengewinnung und Analyse

3.10.1.1 Urinproben: Probengewinnung und Analyse am Ionenchromatographen und Osmometer

Für viele Fragestellungen mussten Urinproben von den Versuchstieren zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Dafür wurde durch leichten Druck auf die Bauchdecke oberhalb der Blase eine Blasenentleerung erzielt. Der Urin wurde mit einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Falls es beim Herausnehmen der Tiere aus dem Käfig zu einer Spontanentleerung der Blase kam, wurde der Urin von der vorher gesäuberten Arbeitsplatte pipettiert. Von einer Punktion der Blase wurde abgesehen, da der Stress und Schmerz für die Tiere und die Infektionsgefahr an der Einstichstelle bei der Häufigkeit der Urinabnahme als nicht verhältnismäßig angesehen wurde.

Für die Analyse von Elektrolyten im Urin wurden die Proben am Ionenchromatographen Dionex ICS-1600 vermessen. Die Präparation und Analyse der Proben erfolgte durch Dr. Sascha Bandulik und Ines Tegtmeier nach Angaben des Herstellers. Einige Proben wurden am Osmometer (Osmomat 030) vermessen. Hier wurde die Osmolalität der mit Wasser verdünnten Proben mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung ermittelt.

3.10.1.2 Blutproben: Probengewinnung, Analyse am Blutgasanalysator und Aldosteron-Messung

Wenn Blutproben von lebenden Tieren benötigt wurden, wurden diese über den submandibulären Venenplexus abgenommen. Die Maus wurde hierfür nicht narkotisiert. Durch einen festen Haltegriff am Nacken wurde bei den Mäusen das Blut im Kopfbereich gestaut und anschließend der Venenplexus mit einer Lanzette punktiert. Das herausfließende Blut wurde sofort mit einer 130 µl-Glaskapillare aufgesaugt und am Blutgasanalysator (NOVA pHoX plus M) vermessen.

Bei Letalversuchen wurden die Mäuse zuerst mit Isofluran narkotisiert. Die Blutabnahme wurde dann unterschiedlich durchgeführt. Musste das arterielle Blut für die Blutgasanalyse in eine 130 µl-Glaskapillare überführt werden, wurde in die *Aorta abdominalis* ein kurzer Katheter eingeführt und die Kapillare direkt an diesen gehalten, damit das Blut ohne Luftkontakt überführt werden konnte.

War es nebensächlich, ob arterielles oder venöses Blut abgenommen wurde, wurde im Bauchraum die *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* geöffnet und das Blut aus dem Bauchraum pipettiert. Nach der Hämostase wurde das Blut bei 8000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Serum anschließend für weitere Analysen verwendet.

Bei einigen Plasmaproben wurden mittels eines enzymatischen Immunadsorptionsverfahrens photometrisch die Aldosteron-Spiegel gemessen. Der Aldosteron-ELISA von IBL wurde nach dem Protokoll des Herstellers von Philipp Tauber durchgeführt.

Für die Bestimmung von Blutgasen und Elektrolyten wurde der Blutgasanalysator verwendet. Das Gerät kann die Elektrolyte, sowie den pH-Wert, pO_2 und pCO_2 entweder über ionenselektive Elektroden (pH, pCO_2 , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+), Amperometrie (pO_2) oder Konduktivität (Hämatokrit) messen. Weitere Werte wie die Bikarbonat-Konzentration oder die Basenabweichung im Blut wurden vom Blutgasanalysator berechnet.

Die Bikarbonat-Konzentration wurde über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet (Gleichung 1). Während der pH-Wert bei Abweichungen von der Norm angibt, ob es sich um ein Alkalose oder Azidose handelt, gibt das Bikarbonat einen Hinweis darauf, ob es sich um respiratorische oder metabolische Störung handelt. Das Standard-Bikarbonat ist z.B. bei einer respiratorischen Alkalose erniedrigt, bei einer metabolischen Alkalose erhöht.

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{\alpha(pCO_2)}$$

Gleichung 1 Berechnung der Bikarbonat-Konzentration im Blut

pH und pCO_2 wurden mit dem Blutgasanalysegerät gemessen. Sowohl die Säurekonstante ($pK = 6,091$) als auch der Löslichkeitskoeffizienten von CO_2 ($\alpha = 0,0307$ im Plasma bei $37^\circ C$) sind Konstanten.

Die Basenabweichung im Blut, auch Basenüberschuss oder Base Excess (BE), wurde vom Blutgasanalyse-Gerät berechnet (Gleichung 2). Dieser diagnostische Parameter trifft eine Aussage über das Säure-Basen-Gleichgewicht des Blutes.

$$BE [mmol/l] = (1 - 0,014 [Hb])([HCO_3^-] - 24 + (1,43[Hb] + 7,7)(pH - 7,4))$$

mit

$$\text{Hämoglobin [g/dl]} = \text{gemessener Hämatokrit}/3$$

Gleichung 2 Berechnung der Basenabweichung im Blut

Die Basenabweichung (BE, Base Excess) wird als Konzentration in mmol/l angegeben. Für die Berechnung wird neben dem gemessenen Wert für den pH auch das berechnete Bikarbonat und Hämoglobin verwendet.

Der Basenüberschuss wird als die Konzentration der titrierbaren Base definiert, die erforderlich ist, um Blut bei 37 °C und einem konstanten pCO₂ von 40 mm Hg auf einen pH-Wert von 7,40 zu titrieren. Während der Normalwert 0 mmol/l beträgt, ist ein positiver Wert ein Hinweis auf eine nicht-respiratorische Alkalose, ein negativer Wert deutet auf eine metabolische Azidose hin.

3.10.2 Wachstum und Entwicklungsverhalten

Die Entwicklung der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere wurde bezüglich des Gewichts und Urin-Ausscheidungsprofils überwacht. Zum einen wurden die Tiere jeden Tag ab Geburt (postpartum, pp1) gewogen, zum anderen wurde ihr Urin in regelmäßigen Abständen auf dessen Elektrolytgehalt hin untersucht.

Mit Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-, Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}- und Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren wurde ebenso verfahren. Allerdings wurde bei diesem Experiment nicht der Knockout mit Hilfe von Doxycyclin induziert. In der Wachstumsphase sollte lediglich festgestellt werden, ob die genetischen Veränderungen durch das Transgen zu einer andersartigen Entwicklung führen.

3.10.3 Ermittlung des durchschnittlichen Wasser- und Futterverbrauchs adulter Tiere

Für die Ermittlung der Wasser- und Futtermenge pro Tag wurden die Tiere für 1 Woche in Einzelkäfigen untergebracht. Sie hatten freien Zugang zu Leitungswasser und der Standard-Mausdiät (genaue Zusammensetzung, siehe 7.1.1.1 Standard-Diät, Seite 98). Sowohl die Trinkflaschen als auch das Futter wurden vor und nach dem Versuch gewogen. Anschließend wurde die durchschnittliche Wasser- und Futtermenge in 24 Stunden berechnet.

3.10.4 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung wurde mit Hilfe der Tail-Cuff-Methode durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in einer speziellen Röhre festgehalten. Diese Restrainer haben eine Öffnung, so dass der Schwanz der Tiere frei zugänglich bleibt. Damit die Durchblutung des Schwanzes gewährleistet war, wurde dieser mit einer Wärmelampe auf Körpertemperatur gehalten. Danach wurde eine Blutdruckmanschette möglichst körpernah positioniert. Über den Verschlussdruck der Schwanzarterie wurde der Blutdruck der Tiere bestimmt. Nach einer Gewöhnungszeit von 2 Wochen wurden die Tiere über 3 Tage täglich zur gleichen Tageszeit vermessen. Diese 3 Werte wurden pro Maus gemittelt.

Die Tiere wurden sowohl in der Eingewöhnungsphase als auch während den eigentlichen Blutdruckmessungen in Einzelkäfigen gehalten.

3.10.5 Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die Messung der glomerulären Filtrationsrate wurde von Frau Dr. Katharina Ebert durchgeführt. Das Messprinzip beruht drauf, dass eine fluoreszierende Substanz in den retrobulbären Venenplexus injiziert und anschließend die Elimination dieses Tracers verfolgt wird (88). Für diese GFR-Messung wurde das fluoreszierende FITC-Sinistrin verwendet. In Pflanzen dient dieses natürlich vorkommende Polysaccharid als Energiespeicher. Wie alle Substanzen für derartige GFR-Messungen es ist biologisch nicht aktiv, frei filtrierbar (durch den glomerulären Filter) und wird im Nierentubulus netto weder resorbiert noch sezerniert.

Vor der Injektion mit FITC-Sinistrin wurden die Tiere in eine Narkosebox gesetzt und dort leicht mit Isofluran narkotisiert. Während der etwa 20-sekündigen Narkose wurde den Mäusen fluoreszierendes FITC-Sinistrin als Einzel-Bolus retroorbital verabreicht. Die Injektionsmenge wurde an das Körpergewicht der Maus angepasst (3,74 µl/g KG). Danach wurde den Mäusen zu den Zeitpunkten 3, 7, 10, 35, 55 und 75 min nach Injektion jeweils 5 µl Blut abgenommen. Dafür wurde mit einer kleinen Kanüle die Schwanzvene punktiert, das Blut direkt in eine Kapillare aufgenommen und aufbereitet. Die Fluoreszenz von 1 µl Plasma wurde anschließend am Nanodrop gemessen. Während der Messung blieben die Tiere wach und konnten sich zwischen den Blutabnahmen frei im Käfig bewegen.

Für die Auswertung wurde die Fluoreszenz-Intensität gegen die Zeit aufgetragen. Man geht von einem Zwei-Kompartiment-Modell aus. Die erste Phase (A) beschreibt vor allem die Verteilung des Tracers im Extrazellularraum. Während dieser Umverteilung nimmt das Fluoreszenz-Signal der Blutproben rapide ab. Die zweiten Phase (B) spiegelt überwiegend die systemische Clearance von Sinistrin aus dem Plasma wider. Nach etwa 180 Minuten ist Sinistrin komplett vom Organismus ausgeschieden und das Plateau, das so erreicht wird, wird auf Null gesetzt. Mittels der Gleichung 3 kann über Verteilung und die Elimination des Tracers die GFR berechnet werden.

$$GFR = I / (A/\alpha + B/\beta)$$

Gleichung 3 Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit dem Zwei-Kompartiment-Modell

I: Konzentration des retroorbital injizierten FITC-Sinistrins; A, B: y-Achsenabschnitt der beiden Abbauraten der Initialphase (A) und der Eliminationsphase (B); α , β : Zerfallskonstanten der beiden Phasen; die Einheit der GFR wird in µl/min/g KG berechnet.

3.10.6 Versuche im Stoffwechselkäfig

Versuche im Stoffwechselkäfig ermöglichen die genaue Bestimmung des Urinvolumens und der ausgeschiedenen Stoffmenge einzelner Elektrolyte im Urin über einen bestimmten Zeitraum. Für die Untersuchungen in diesen metabolischen Käfigen wurden drei verschiedene Testsituationen gewählt. Zum einen die Kontrollphase (Phase 1), in der die Grundausscheidung der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere und der schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren bestimmt und miteinander verglichen werden sollten. Weiterhin sollte die Wirkung von einer Diuretika-Kombination aus Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) ermittelt werden (Diuretikaphase, Phase 2). In Phase 3 wurde die Fähigkeit der Tiere untersucht, in einer Wassermangel-Situation den Urin zu konzentrieren (Durstversuch, Phase 3).

Zu Beginn erfolgte eine Eingewöhnungsphase von 2 Tagen mit Standard-Mausdiät und Trinkwasser *ad libitum*, damit die Tiere mit den metabolischen Käfigen vertraut wurden. Anschließend wurden die Tiere für die Kontrollphase über 2 Tage (täglich von 10:00 -16:00 Uhr) in den Stoffwechselkäfig gesetzt. In dieser Zeitspanne hatten die Tiere Zugang zu Wasser, jedoch nicht zu Futter. Der Grund dafür ist, dass in Anwesenheit von Futter, konstruktionsbedingt, der Urin durch Futterreste verunreinigt und so eine Messung der Elektrolyte am Ionenchromatographen verfälscht würde. Im Anschluss an die Kontrollphase folgte die 3 Tage dauernde Diuretikaphase. Dafür wurden die Tiere vor Versuchsbeginn leicht mit Isofluran narkotisiert und im Anschluss erfolgte eine subkutane Injektion der Diuretika unter das Nackenfell. Beide Diuretika wurden vorher in DMSO gelöst (Amilorid: 10 µg/µl, HCT: 40 µg/µl) und anschließend in einer Dosierung von 5 µg/g KG Amilorid und 20 µg/g KG HCT verabreicht. Nach einer Erholungszeit von 5 Tagen im Einzelkäfig (Auswaschphase), in der die Wirkung der Diuretika wieder komplett aufgehoben wurde, wurde der Kurzzeit-Durstversuch im Stoffwechselkäfig durchgeführt. In dieser dritten Versuchsphase verblieben die Tiere ebenfalls 6 Stunden (10:00 - 16:00 Uhr) ohne Futter und Wasser im Käfig (Abbildung 9).

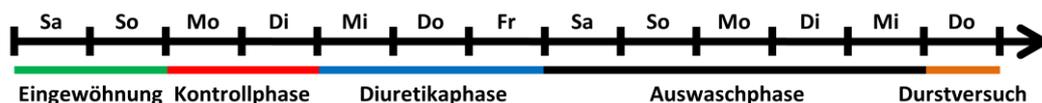


Abbildung 9 Zeitverlauf der Versuche im Stoffwechselkäfig

Die Tiere wurden 2 Tage an den Stoffwechselkäfig gewöhnt (grün). Anschließend verbrachten die Tiere dort täglich 6 Stunden ohne Futter: 2 Tage dienten als Kontrolle (rot), an den 3 folgenden Tagen wurden den Tieren Diuretika injiziert (blau). Nach einer Auswaschphase der Diuretika im Einzelkäfig (schwarz) wurde dann in einer weiteren 6-Stunden-Messung ein Durstversuch durchgeführt (orange).

Um die Trinkmenge während der Messzeiten zu ermitteln, wurden die Flaschen vor und nach dem Aufenthalt im Stoffwechsellkäfig gewogen. Um möglichst exakt das in 6 Stunden produzierte Urinvolumen bestimmen zu können, wurde den Mäusen über leichten Druck auf die Bauchdecke vor und nach den Messungen jeweils die Blase entleert. Aus dem Urin, der nach der Messung gesammelt wurde, und dem, der im metabolischen Käfig über Trichter aufgefangen wurde, wurde das Urinzeitvolumen bestimmt. Der Urin wurde später am Ionenchromatographen vermessen. Sowohl in den Stoffwechsellkäfigen als auch zwischen den Messungen wurden die Tiere einzeln gehalten. Zwischen den Messungen konnten sich die Tiere in Käfigen mit Streu, Futter und Wasser erholen. Vor und nach der 6-stündigen Messzeit wurden die Tiere gewogen.

3.10.7 Niedrig-Salz-Diäten

Für diesen Versuchsteil wurden die Versuchstiere auf drei verschiedene Niedrig-Salz-Diäten gesetzt, eine Niedrig-Natrium- ($< 0,03\%$, normal: $0,19\%$), eine Niedrig-Kalium- ($< 0,05\%$; normal: $0,97\%$) und eine Niedrig-Magnesium-Diät ($< 0,02\%$, normal: $0,21\%$). Für die genaue Zusammensetzung des Futters siehe Tabelle 4 (7.1.1.2 Experimentalfutter, Seite 98).

Vor Beginn der Diät wurde an 2 Tagen Spontanurin der Mäuse gesammelt, am Ionenchromatographen vermessen und die Werte dann gemittelt. Dieser Wert wurde nachfolgend als "Kontrolle" bezeichnet. Ebenso wurde den Tieren vor Beginn der Diät durch Punktion des submandibulären Venenplexus Blut entnommen und dieses auf Blutgase und Blut-Elektrolyte hin analysiert. Damit die Tiere die Hypovolämie durch den Blutverlust vor dem Diätbeginn kompensieren konnten, erfolgte die Umstellung auf die Niedrig-Salz-Diät erst eine Woche nach der Blutentnahme. Während dieser Zeit wurde an verschiedenen Tagen (Kontrolle, Diättag 2, 4, 7, 9, 11, 14) Urinproben gesammelt. Am Diättag 14 wurde den Mäusen erneut Blut über den submandibulären Venenplexus entnommen (Abbildung 10).

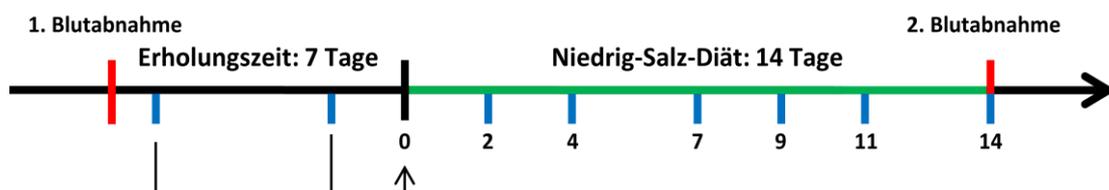


Abbildung 10 Zeitverlauf der Niedrig-Salz-Diäten

Eine Woche vor und direkt nach der Niedrig-Salz-Diät wurde den Tieren Blut über den submandibulären Venenplexus abgenommen (rot). An zwei beliebigen Tagen vor Diät-Beginn wurde von jedem Tier Spontanurin (blau) gesammelt und vermessen. Der Mittelwert dieses Urins wurde als Kontrolle bzw. Diättag 0 bezeichnet. Im Verlauf der Diät (grün) wurde an verschiedenen Tagen (2, 4, 7, 9, 11, 14) ebenfalls Spontanurin gesammelt.

Wurden Versuchstiere für zwei verschiedene Diäten verwendet, wurde nur einmal vor Diätbeginn Blut abgenommen und dieser Referenzwert auch für die zweite Diät verwendet. Zwischen den Diäten wurden die Tiere während einer dreiwöchigen Erholungsphase auf Standard-Diät gesetzt. Das Abbruchkriterium dieser Versuche war ein Gewichtsverlust der Tiere um 15 % des Körpergewichts vor Versuchsbeginn.

3.11 Histologische Untersuchungen

3.11.1 Perfusionsfixation von Mäusen

Um histologische Untersuchungen an murinen Nieren durchführen zu können, wurden die Tiere perfusionsfixiert. Dabei wurde das Tier in eine tiefe Isofluran-Narkose gelegt, auf dem Rücken fixiert und anschließend der Bauchraum geöffnet. Um eine gute Fixierung der Nieren sicherzustellen, wurde über die *Aorta abdominalis* fixiert, da so das Fixans zuerst direkt in die Nieren gepumpt wird. Nach dem Freipräparieren der Bauchvene und -aorta wurde die Aorta abgeklemmt und kaudal davon mit einem Schnitt versehen. Dort wurde ein Katheter eingeführt und mit einer weiteren Klemme fixiert. Die obere Klemme wurde daraufhin entfernt und die *Vena cava inferior* mit einem Schnitt geöffnet, damit das Perfusat darüber abfließen konnte. Anschließend wurden mit einer Pumpe die Perfusionsflüssigkeiten mit etwa 1 ml/ 4 sek über den Katheter in die Maus gespült.

Um das narkotisierte Tier zu euthanasieren, wurde das Blut durch Infusion einer isotonen Natriumchlorid-Lösung ersetzt, welcher Heparin zugesetzt wurde (100 I.E./10 ml NaCl-Lösung). Nach dem Töten durch Entfernen des Blutes erfolgte eine weitere Perfusion mit 40 ml Fixierlösung 1. Anschließend wurden die Nieren entnommen, transversal halbiert und etwa 3 Stunden in Fixierlösung 2 im Kühlschrank über Immersionsfixierung nachfixiert. Die darin enthaltene hohe Konzentration an Saccharose wirkte dabei als Gefrierschutz, wenn die Organe für die Aufbewahrung eingefroren wurden. Anschließend wurden die Nierenhälften in ein Becherglas mit -30 °C kaltem 2-Methylbutan überführt und dadurch eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Nieren bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Bei Doxycyclin-induzierten Mäusen, die das Pax8Cre-Konstrukt im Genom enthielten, wurde als Anhalt für die Effizienz der Geninaktivierung mittels Realtime PCR der KCNJ10-mRNA-Gehalt bestimmt. Für eine RNA-Aufreinigung war eine fixierte Niere jedoch ungeeignet, weshalb bei diesen Tieren vor der Fixativ-Perfusion eine Niere abgebunden wurde. Diese unfixierte Niere wurde direkt nach der Perfusion in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren. Um den Perfusionsdruck auf die andere, zu fixierende Niere zu senken und eine

Gewebsschädigung zu vermeiden, wurde die Perfusionsgeschwindigkeit der jeweiligen Lösungen auf etwa 1 ml/ 6 sek gesenkt.

3.11.2 Präparation von Gewebeschnitten

Alle Gewebeschnitte für immunhistochemische Aufnahmen wurden am Gefriermikrotom (Kryotom) geschnitten. Um dem perfundierten Gewebe eine bessere Schneidfähigkeit zu geben, wurden die Nierenhälften in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet. Dieses Einbettmedium, welches bei Raumtemperatur zähflüssig ist, härtet bei -10 °C zu einer festen Masse aus. Anschließend wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf die Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte 5 min bei Raumtemperatur trocknen konnten, wurden sie bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.11.3 Immunhistochemische Färbungen

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger mit den Nierenschnitten in PBS gewaschen, um das gut wasserlösliche Tissue-Tek zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in einer 0,1 %-SDS-Lösung in PBS zur Antigendemaskierung inkubiert. Während der Fixierung der Nieren waren die Proteine der Zellen quervernetzt und ihre räumliche Struktur verändert worden. SDS wiederum sorgte dafür, dass diese, sogenannten maskierten Proteine wieder entfaltet wurden und die Epitope für eine spätere Antikörperbindung leichter zugänglich waren. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um bei weiteren Färbeschritten mit einem geringeren Lösungsvolumen kostensparend arbeiten zu können. Im nächsten Schritt wurden am Gewebe mit Hilfe der Blocklösung für 10 min unspezifische Protein-Bindungsstellen abgesättigt. Nach dem darauffolgenden Waschschrift in PBS konnte der primäre Antikörper aufgetragen werden. Dafür wurden alle benötigten Antikörper in den entsprechenden Verhältnissen (vgl. 3.8 Antikörper, Seite 27) mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Um ein Austrocknen der Präparate während der Inkubationszeit (über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank) zu verhindern, wurden die Objektträger in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden ungebundene primäre Antikörper durch einen Waschschrift in PBS entfernt und anschließend die sekundären Antikörper aufgetragen. Neben den an die primären Antikörper angepassten sekundären Antikörpern wurde standardmäßig das in die DNA interkalierende Fluorophor HOE 33342 zu Visualisierung der Zellkerne verwendet.

Nierenschnitte von Tomato-EGFP-Mäusen, die entweder das fluoreszierende Tomato oder EGFP synthetisierten, wurden entweder nur auf Wellenlängenbereichen gefärbt, die nicht der der

endogenen Fluoreszenzproteine entsprach, oder sie wurden ohne weitere Färbung direkt eingebettet.

3.11.4 Herstellung von Dauerpräparaten

Nach der Färbung wurden die Gefrierschnitte eingebettet. Das verwendete Mounting-Medium von Dako war bei Raumtemperaturen gallertartig und konnte durch Erwärmen verflüssigt werden. Anschließend wurden 3 Tropfen des Mounting-Mediums auf den Objektträger gegeben und sofort mit einem Deckglas versiegelt. Danach wurden die Präparate im Kühlschrank ausgehärtet.

3.12 Molekularbiologische Methoden

3.12.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Alle Tiere, die für Versuche verwendet wurden, wurden auf alle Transgene und loxP-Stellen hin genotypisiert. Bei Tomato-EGFP-Mäusen, bei denen visuell eindeutig erkennbar war, ob eine Rekombination im Gewebe stattfand, wurden nicht auf die Anwesenheit der Transgene hin analysiert.

3.12.1.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde zuerst die genomische DNA isoliert. Eine Schwanzbiopsie von etwa 3 mm Länge wurde dafür mit 300 µl Tailbuffer und 1 µl Proteinase K-Lösung (100 mg/ml) über Nacht bei 55 °C geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 6000 rpm für 3 min wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt, danach mit 100 µl Ammoniumacetat und 600 µl Isopropanol gemischt und anschließend die DNA 20 min bei -20 °C gefällt. Dann wurde der Ansatz 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70 %-Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min wurde das Pellet an Luft für ca. 10 min getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Um das Pellet zu lösen wurde der Ansatz etwa 2 h bei 55 °C im Thermomixer inkubiert.

3.12.1.2 Qualitative PCR

Für die Genotypisierung der Mäuse mittels PCR wurde der "REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix" von Sigma-Aldrich verwendet. Für die Reaktion wurden Mastermix-Ansätze gemischt. Pro Ansatz wurden jeweils 1 µl aufgereinigte, genomische DNA aus den Schwanzbiopsien, 1 µM eines jeden Primers (sense und antisense) und 10 µl Red Taq Mix verwendet und mit Wasser auf 20 µl

aufgefüllt. Die PCR Reaktion erfolgte primerspezifisch mit verschiedenen Amplifikationsprogrammen. Die Proben wurden anschließend auf ein Agarose-Gel (2 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und bei 110 V etwa 30 min lang mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Standard wurde ein 1 kb-DNA-Leiter verwendet.

Verwendete Primer, Amplifikationsprogramme und Amplikongrößen finden sich unter 3. Material und Methoden, Seite 20.

3.12.2 Ermittlung des Expressionsgrades verschiedener Proteine in der Niere

3.12.2.1 RNA-Isolierung aus murinen Nieren

Für die RNA-Isolierung wurden den Mäusen die Nieren entnommen, transversal geschnitten und möglichst zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Jeweils eine halbe Niere wurde dann mit einem gut gekühlten Mörser und Pistill zermahlen. Etwa zwei Spatelspitzen des Pulvers wurden anschließend in ein Eppendorf-Cup mit Lysepuffer überführt und mit einem kleinen Plastikpistill weiter zerstoßen. Die RNA-Isolierung wurde mit dem "RNeasy Mini Kit" von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Um die Konzentration der Total-RNA zu bestimmen, wurde das Spectrophotometer Nanodrop verwendet.

3.12.2.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl Volumen gebracht und mit 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) gemischt. Der Ansatz wurde zuerst 5 min bei 70 °C und dann weitere 5 min auf Eis inkubiert, um anschließend 10 µl Mastermix zuzugeben. Der Mastermix bestand pro Probe aus 5 µl M-MLV RT 5x Puffer, 1,25 µl dNTPs (10 µM), 1 µl RNase Inhibitor und wurde auf 10 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Pro 25 µl-Ansatz wurden 4 µl als -RT-Ansatz (Negativ-Kontrolle) in ein separates Gefäß überführt, während die restlichen 21 µl als +RT-Ansatz mit 0,84 µl M-MLV Reverse Transcriptase gemischt wurden. Anschließend wurden beide Ansätze mit dem entsprechenden cDNA-Synthese Programm in den Thermocycler gegeben.

3.12.2.3 Quantitative PCR

Um die Menge der cDNA zu bestimmen, wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Für diese photometrische Realtime PCR wurde das "SYBR Green PCR Kit" von Qiagen verwendet. Pro Ansatz wurden dafür 5 µl SYBR Green PCR Mix mit jeweils 1 µM Primer und 1 µl cDNA gemischt und mit

Aqua bidest. auf 10 µl Ansatz gebracht. Anschließend wurde der Lauf im Light Cycler LC480 mit dem Primer-spezifischem Amplifikationsprogramm gestartet. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel (3 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und etwa 40 min bei 110 V der Größe nach aufgetrennt.

Verwendete Primer, Amplifikationsprogramme und Amplikongrößen finden sich unter 3. Material und Methoden, Seite 20. Alle Primer waren Intron-spanning. Für die Auswertung wurde die gemessene DNA-Menge des Zielgens auf die DNA-Menge des Housekeeping-Gens β -Actin normalisiert.

Alle Mäuse, die das Pax8Cre-Konstrukt im Genom enthielten, wurden auf die mRNA-Restexpression von KCNJ10 getestet. Dafür wurde die mittlere KCNJ10-Expression der Kontroll-Tiere mit der jeweiligen Restexpression der Knockout-Tiere verglichen. War diese über einem Schwellenwert von 30 % im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, wurde die Maus als nicht ausreichend induziert eingestuft und für die Versuchsauswertung nicht verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Wahl des geeigneten Mausmodells für die Untersuchung des nierenspezifischen KCNJ10-Knockouts

Um die Auswirkungen des KCNJ10-Knockouts auf die Nierenfunktion zu untersuchen, musste ein geeignetes Mausmodell ausgewählt werden. Konventionelle KCNJ10-Knockout-Mäuse sterben innerhalb von 8 Tagen nach der Geburt, wobei vermutlich ein schwerer Hirnphänotyp der Grund hierfür ist (83). Dementsprechend sollte für diese Arbeit eine Mauslinie verwendet werden, bei der der KCNJ10-Knockout nierenspezifisch und eventuell auch induzierbar ist. Dafür wurden zwei verschiedene Mauslinien verwendet. Die erste Linie, KspCre, wurde mit geflochten KCNJ10-Mäusen verpaart, um unter dem nierenspezifischen Promotor Ksp-Cadherin in allen KCNJ10-exprimierenden Zellen der Nieren einen Knockout zu erzeugen (59, 69). Da zu Beginn der Arbeit unklar war, ob die KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse aufgrund eines schweren Nierenphänotyps die adulte Lebensphase ebenfalls nicht erreichen würden, wurde eine weitere Maus-Verpaarung angesetzt, um diese Problematik zu umgehen. Dafür wurden induzierbare Pax8Cre-Mäuse mit geflochten KCNJ10-Mäusen gekreuzt. Die resultierenden, Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}/ind-Mäuse sollten den Knockout nur in der Niere zeigen, da der Promotor von Pax8 in adulten Mäusen ausschließlich dort aktiv ist (87). Die Tiere können somit ungestört heranwachsen und entwickeln erst durch Gabe von Doxycyclin den KCNJ10-Knockout.

Um zu testen, ob die KspCre-Mäuse oder die induzierbaren Pax8Cre-Mäuse das bessere Mausmodell für die Untersuchung des KCNJ10-Knockouts in der Niere sind, wurden beide Mausgruppen auf verschiedene Weise verglichen. Zum einen wurden beide Cre-Linien jeweils mit der Reporter-Maus Tomato-EGFP verpaart, um histologisch den Grad und die Lokalisation der Cre-Expression in der Niere abzuschätzen. Weiterhin wurden die nierenspezifischen Cre-Mauslinien jeweils mit den geflochten KCNJ10-Mäusen verpaart und die Gewichtsentwicklung und Urin-Elektrolytausscheidung der heranwachsenden Mäuse mit den jeweiligen Kontroll-Tieren verglichen. Anschließend wurde bei den adulten Tieren (bei Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen nach Induktion des Knockouts durch Doxycyclin-Gabe) das mRNA-Expressionslevel von KCNJ10 in der Niere über Realtime PCR ermittelt.

Nach diesen ersten Untersuchungen konnte die Effektivität der Cre-Mäuse abgeschätzt und die Wahl getroffen werden, mit welchem nierenspezifischen Tiermodell weitergearbeitet werden sollte.

4.1.1 Die KspCre-Mauslinie

4.1.1.1 Gewichtsmessungen und Urin-Elektrolytanalysen heranwachsender KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse

Nach der Verpaarung von KspCre-Mäusen mit geflochten KCNJ10-Mäusen wurde die F₁-Generation (KspCre/KCNJ10^{flox/wt}) untereinander gekreuzt. Aus diesen Heterozygotenverpaarungen stammen die KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere, die ab Geburt (pp1) gewogen wurden, um festzustellen, ob der KCNJ10-Nieren-Knockout einen Einfluss auf die Gewichtszunahme während der Entwicklung hat. In die Auswertung gingen nur Tiere ein, die ein Alter von mindestens 35 Tagen erreichten. Hierfür wurden insgesamt 86 Mäuse (33 KspCre/KCNJ10^{wt/wt}, 37 KspCre/KCNJ10^{flox/wt} und 16 KspCre/KCNJ10^{flox/flox}) aus 14 Würfen gewogen. Es wurde jeweils das Gewicht der Mäuse über 3 oder 5 Tage gemittelt (Abbildung 11 und Tabelle 5 im Anhang, Seite 99).

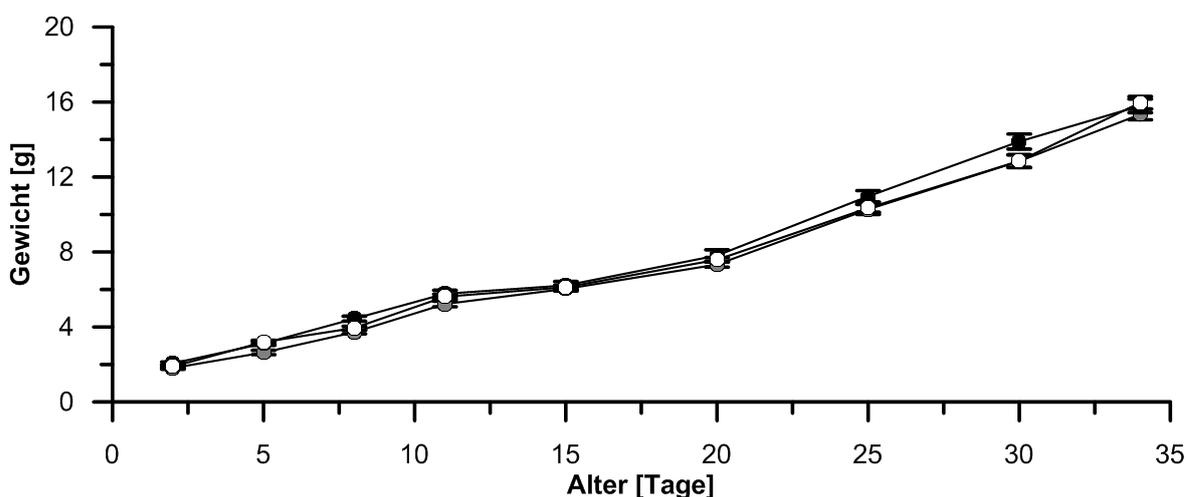


Abbildung 11 Gewichtsentwicklung der KspCre/KCNJ10^{wt/wt}- (weiß, n=33), KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- (grau, n=37) und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere (schwarz, n=16) von pp1 bis pp35

Alle Tiere zeigten ein dynamisches Wachstum ab Geburt. Im Alter von 13 bis 17 Tagen kam es bei allen Genotypen zu einer Stagnation des Wachstums aufgrund der Entwöhnungsphase. Erst nach der Umstellung von Muttermilch auf Pellet-Futter und Trinkwasser nahmen die Tiere wieder fast linear an Gewicht zu.

Zur besseren Übersicht wurden die Gewichtsmessungen von mehreren Tagen gemittelt (pp1-pp3, pp4-pp6, pp7-pp9, pp10-pp12, pp13-pp17, pp18-22, pp23-27, pp28-pp32, pp33-35).

Weiterhin wurden die Urine der ersten 35 Tage nach der Geburt analysiert, sofern Urinproben gesammelt werden konnten. Insgesamt wurden von 32 Tieren Urinproben (13 KspCre/KCNJ10^{wt/wt}, 8 KspCre/KCNJ10^{flox/wt} und 11 KspCre/KCNJ10^{flox/flox}) vermessen. Neben den Elektrolyten wurde auch das Stoffwechsellendprodukt Kreatinin bestimmt. Da Kreatinin frei in den Primärharn filtriert wird, konnten bei Spontanurinproben die gemessenen Elektrolyte darauf normalisiert werden. Die Werte der Elektrolytausscheidung wurden anschließend vergleichbar mit

der Mittelung des Gewichts über 3 oder 5 Tage zusammengefasst. Tabelle 2 zeigt die Elektrolyt-Konzentration im Verhältnis zur Kreatinin-Konzentration, Na^+ /Kreatinin und Cl^- /Kreatinin. Weitere Elektrolyte wurden im Anhang unter Tabelle 6 (Anhang, Seite 101) aufgeführt.

KspCre/KCNJ10	Kreatinin			Na^+ /Kreatinin			Cl^- /Kreatinin		
	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox
pp 1-3	0,64	0,48	0,71	9,54	23,56	11,36	116,44	161,68	104,05
SEM	0,07	0,07	0,09	2,73	12,42	4,28	16,24	31,18	14,96
pp 4-6	0,47	0,70*	0,52	5,13	2,93	4,09	116,25	86,88*	105,02 [^]
SEM	0,04	0,04	0,05	0,45	0,79	1,94	6,52	1,15	5,48
pp 7-9	1,00	0,99	0,81	3,72	4,89	5,55	65,30	56,49	66,56
SEM	0,10	0,14	0,07	0,71	2,44	1,68	10,75	8,22	8,10
pp 10-12	1,01	0,93	0,66°	6,63	7,67	17,43	51,25	63,39	95,52
SEM	0,04	0,09	0,10	2,55	2,71	5,62	5,36	12,69	19,53
pp 13-17	1,79	2,08	1,50	10,00	10,02	24,54	45,93	36,44	87,03
SEM	0,30	0,37	0,36	2,54	2,50	8,75	5,92	4,98	24,40
pp 18-22	2,88	2,74	1,82	24,81	23,41	28,15	88,01	76,94	81,62
SEM	0,26	0,44	0,38	7,02	6,38	10,90	18,69	19,69	18,24
pp 23-27	3,52	3,64	2,61	11,97	30,44	42,37°	51,45	65,95	80,64°
SEM	0,28	0,33	0,70	2,67	9,56	8,51	4,35	9,12	7,91
pp 28-32	2,85	2,61	2,25	15,94	37,35	23,85	67,16	98,39	88,51
SEM	0,25	0,44	0,46	4,42	9,84	3,73	9,84	13,86	6,11
pp 33-35	2,27	2,45	1,98	29,82	16,86	19,32	61,13	49,37	58,96
SEM	0,29	0,52	0,39	6,48	7,87	7,70	5,37	9,01	19,55

Tabelle 2 Renale Ausscheidung von Kreatinin, Na^+ /Kreatinin und Cl^- /Kreatinin bei heranwachsenden KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

Die Urin-Elektrolyt-Ausscheidung während der ersten 35 Lebenstage zeigte zwischen den drei Versuchsgruppen keine konsistenten Unterschiede.

*: signifikanter Unterschied (ohne Bonferroni-Korrektur) zwischen KspCre/KCNJ10^{wt/wt} und KspCre/KCNJ10^{flox/wt}; °: Unterschied zwischen KspCre/KCNJ10^{wt/wt} und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}; ^: Unterschied zwischen KspCre/KCNJ10^{flox/wt} und KspCre/KCNJ10^{flox/flox} (p-Wert: < 0,05)

Zur besseren Übersicht wurden die Urinmessungen von mehreren Tagen gemittelt (pp1-pp3, pp4-pp6, pp7-pp9, pp10-pp12, pp13-pp17, pp18-22, pp23-27, pp28-pp32, pp33-35). Abhängig davon, ob Spontanurin von den Tieren gesammelt werden konnte, wurden pro Mausgenotyp und zusammengefasste Messtage 2 bis 22 Proben analysiert (genau Angaben im Anhang unter Tabelle 7, Seite 101)

Die KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse zeigten während der Entwicklung weder bezüglich des Gewichts noch der Elektrolyt-Ausscheidung relevante Unterschiede zu den KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- oder

KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen. Teilweise sind an einzelnen Messpunkten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar, diese werden aber auf äußere Umstände (Wurfgröße, Geschlecht, Fressverhalten, mütterliche Fürsorge) und nicht den Genotyp zurückgeführt.

4.1.1.2 Histologische Untersuchung der KspCre-Mauslinie

Für die histologische Untersuchung wurden KspCre-Mäuse entweder mit Tomato-EGFP-Mäusen oder geflochten KCNJ10-Mäusen verpaart. Von den Nachkommen dieser Kreuzungen wurden jeweils Nierenschnitte angefertigt und diese mit verschiedenen Antikörpern gefärbt.

Beim Vergleich der Nierenschnitte (Immunfluoreszenz) von KspCre/KCNJ10^{wt/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen waren keine Unterschiede in der KCNJ10-Expression erkennbar (Abbildung 12). Auch die Nieren der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse zeigten eine deutliche KCNJ10-Expression (grün). Eine Abschätzung, wie viel KCNJ10-Protein tatsächlich im Vergleich zu den KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen produziert wurde, kann mit Hilfe einer Antikörperfärbung generell nur schwer gegeben werden. Die Anwesenheit von KCNJ10 in den Knockout-Mäusen ließ jedoch den Rückschluss zu, dass es trotz Cre/loxP-System weiterhin zur KCNJ10-Expression in der Niere kam.

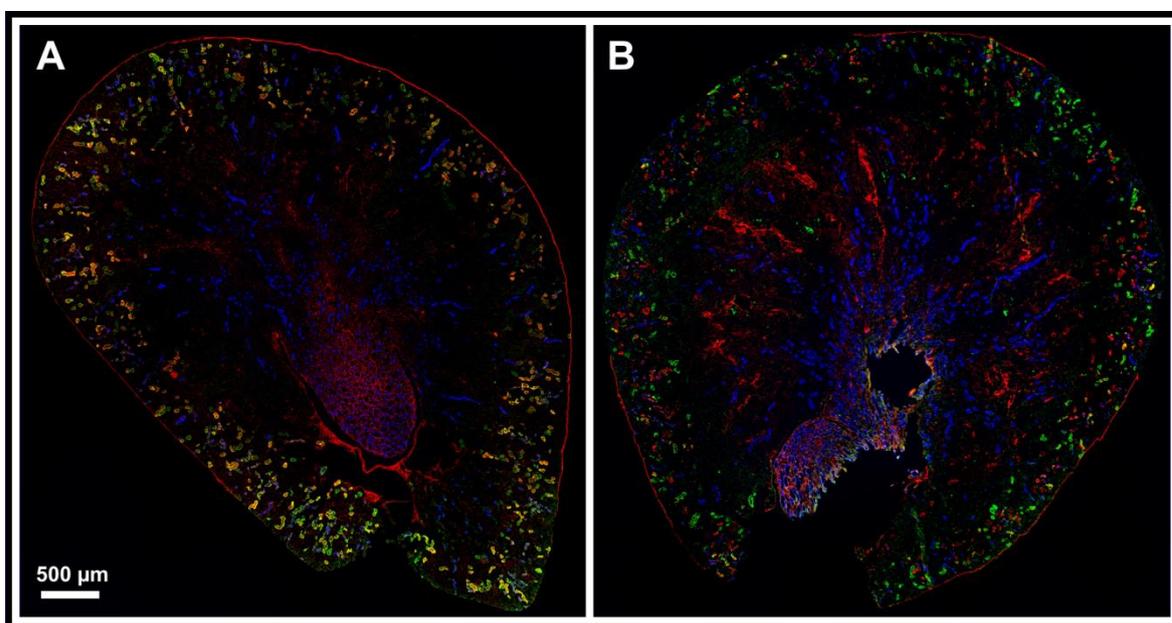


Abbildung 12 Übersichtsaufnahmen der Niere einer adulten KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Maus (A) im Vergleich zu einer KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus (B)

Calbindin (rot) und AQP2 (blau) wurden als Marker für den DCT, CNT und Sammelrohr verwendet. Eine Färbung von KCNJ10 (grün) ist nur im Nierenkortex zu sehen. Ein Unterschied in der KCNJ10-Expression zwischen den Kontroll- und Knockout-Tieren ist nicht erkennbar.

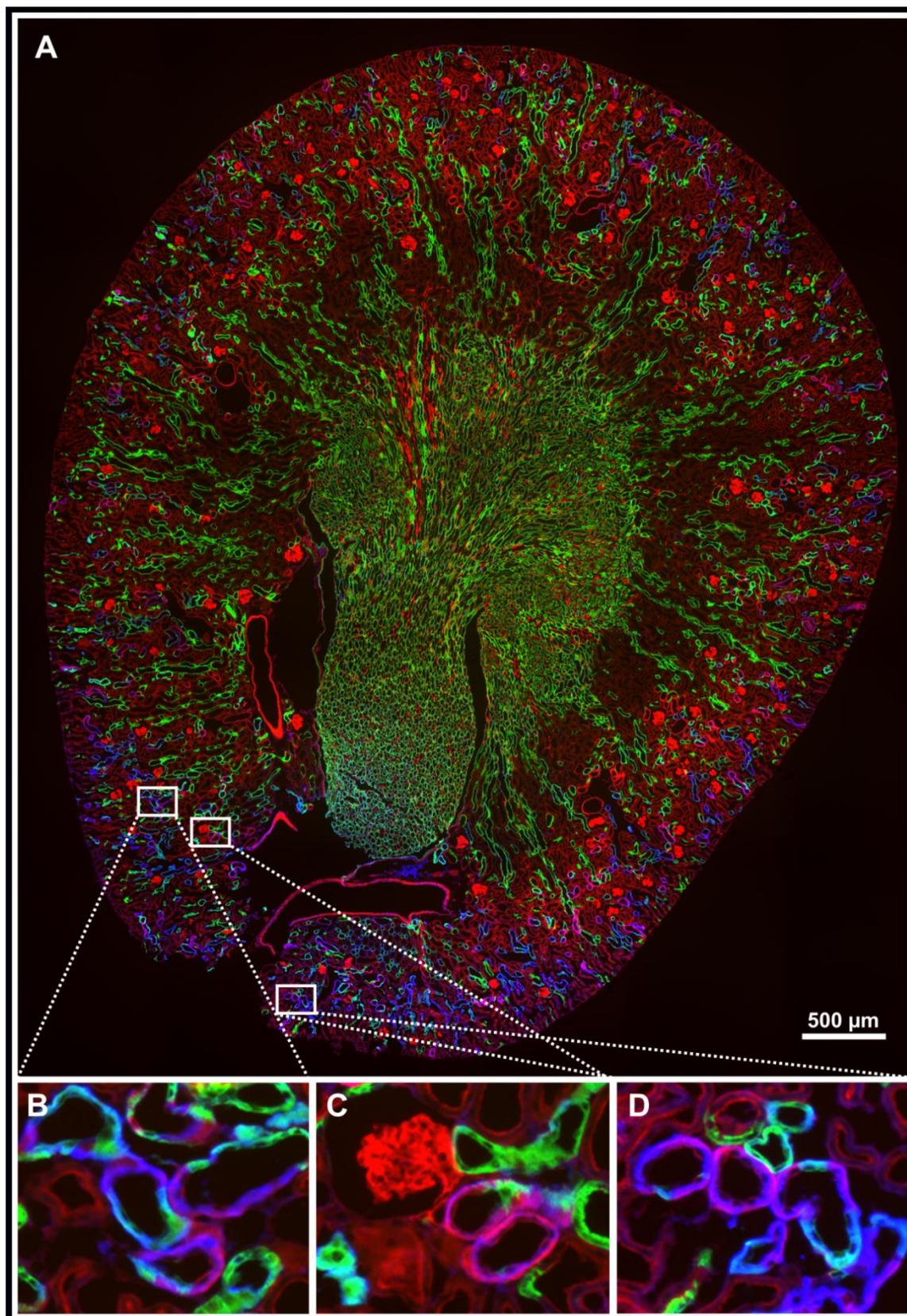


Abbildung 13 Nierenaufnahme einer adulten KspCre/Tomato-EGFP-Maus

Die Übersichtsaufnahme (A) zeigt eine Eigenfluoreszenz in allen renalen Zellen, entweder durch membrangebundenes EGFP (erfolgte Cre-Expression, grün) oder Tomato (ausgebliebene Cre-Expression, rot). Die KCNJ10-Immunofärbung (blau) ist in vielen Zellen zu sehen, die noch rot sind, das heißt, in denen Cre nicht aktiviert ist (B-D).

Die Übersichtsaufnahme der Niere einer der adulten KspCre/ Tomato-EGFP-Maus zeigt eine starke EGFP-Expression (grün) in Tubulus-Abschnitten des Nierenmarks aber nur eine sehr geringe im Nierenkortex (Abbildung 13). Neben den Glomeruli, Blutgefäßen und interstitiellen Zellen, in denen es erwartungsgemäß zu keiner Rekombination kam, fand aber offensichtlich auch in vielen Tubuluszellen keine Exzision des geflochtenen Tomato-Gens statt. Der Vergleich der EGFP-Expression mit der KCNJ10-Antikörperfärbung (blau) ließ weiterhin darauf schließen, dass der Rekombinationsvorgang bei $KCNJ10^{flox/flox}$ -Mäusen wohl nur in geringem Maß in KCNJ10-exprimierenden Zellen eintreten würde.

4.1.1.3 mRNA-Restexpression von KCNJ10 bei KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

Um zu untersuchen, wie effizient das KspCre-System zu einem KCNJ10-Knockout in der murinen Niere führt, wurde neben der histologischen Untersuchung der Nieren auch mittels Realtime PCR die Restexpression von KCNJ10-mRNA in der Niere bestimmt.

Für die Bestimmung der KCNJ10-mRNA-Expression wurden die KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse mit heterozygoten KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren verglichen. Pro Genotyp wurden 3 Tiere untersucht. Die Expressionsstärke von KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren wurde auf 100 % gesetzt und in Relation zu den anderen Gruppen dargestellt (Abbildung 14). Während die KspCre/KCNJ10^{flox/wt}-Tiere mit $88,0 \pm 14,0$ % nicht verschieden von den Kontroll-Tieren waren (p-Wert: 0,513), lagen die KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse mit einem Wert von $23,1 \pm 8,5$ % signifikant niedriger (p-Wert: 0,008).

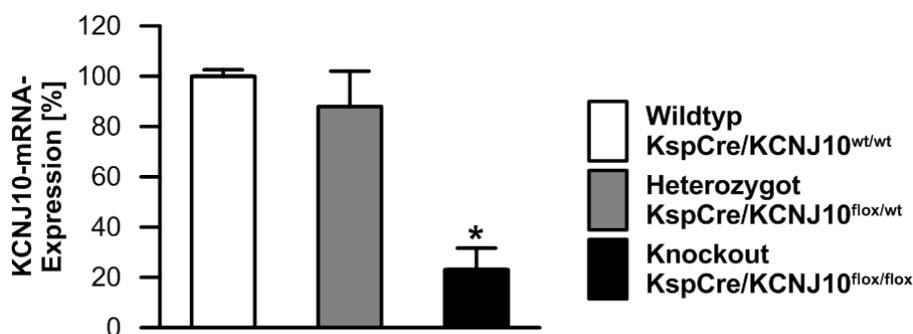


Abbildung 14 KCNJ10-mRNA-Expression [%] der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}- und KspCre/KCNJ10^{flox/wt}-Tiere in der Niere im Vergleich zu den KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren (jeweils n=3)

Die KCNJ10-mRNA-Expression der KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere wurde auf 100 % gesetzt. Während die heterozygoten KspCre/KCNJ10^{flox/wt}-Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen zeigten, war die KCNJ10-mRNA-Expression der Knockout-Mäuse (KspCre/KCNJ10^{flox/flox}) geringer.

4.1.2 Die induzierbare Pax8Cre-Mauslinie

4.1.2.1 Gewichtsmessungen und Urin-Elektrolyt-Analysen heranwachsender, nicht-induzierter Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse

Um ausschließen zu können, dass nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-, Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}- und Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse bereits aufgrund des Vorhandenseins von Transgenen (Pax8Cre-Konstrukt) einen Phänotyp besitzen, wurden nach Kreuzung von Pax8Cre-Tieren mit KCNJ10^{flox/flox}-Tieren Heterozygotenverpaarungen aus der F₁-Generation angesetzt und von diesen Zuchten drei Würfe untersucht. Um eine größere Anzahl an Kontroll-Tieren zu haben, wurde des Weiteren ein Wurf aus einer Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Zucht in die Analyse einbezogen.

Für die Gewichtsmessung wurden insgesamt 29 Mäuse (14 Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-, 5 Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}- und 10 Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere) untersucht und die Werte vergleichbar zu den KspCre-Mäusen gemittelt (Abbildung 15). Zusätzlich zur Gewichtsbestimmung der Tiere wurden Urinproben gesammelt. Die Auswertung dieser Proben zeigte, ebenso wie die Gewichtsmessung, keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Werte nicht gezeigt).

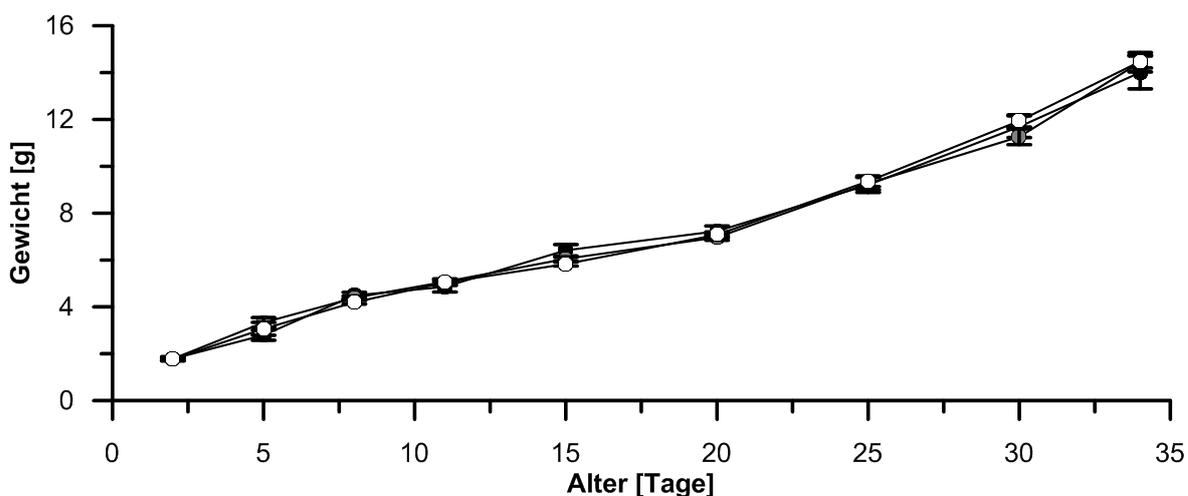


Abbildung 15 Gewichtsentwicklung nicht-induzierter Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- (weiß, n=14), Pax8Cre/KCNJ10^{flox/wt}- (grau, n=5) und Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere (schwarz, n=10) von pp1 bis pp35

Alle Tiere zeigten ein dynamisches Wachstum ab Geburt, wobei es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab.

Zur besseren Übersicht wurden die Gewichtsmessungen von mehreren Tagen gemittelt (pp1-pp3, pp4-pp6, pp7-pp9, pp10-pp12, pp13-pp17, pp18-22, pp23-27, pp28-pp32, pp33-35).

4.1.2.2 Histologische Untersuchung der Pax8Cre-Mauslinie

Für die histologische Untersuchung wurden Pax8Cre-Mäuse mit geflochten KCNJ10-Mäusen verpaart. Nach der Induktion des KCNJ10-Knockouts durch Doxycyclin-Gabe wurden die adulten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere perfundiert und Kryoschnitte der Nieren

angefertigt. Bei diesen wurden über indirekte Immunfluoreszenz-Färbung neben den KCNJ10-Proteinen auch Calbindin als Marker für den distalen Tubulus und Aquaporin-2 als Marker für das Sammelrohr nachgewiesen. Abbildung 16 zeigt Übersichtsaufnahmen von der Niere einer schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und einer induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus.

In beiden Übersichtsaufnahmen ist eine deutliche Färbung von Calbindin (blau) und AQP2 (rot) zu erkennen. Die Aufnahme der Kontroll-Maus (A) zeigt jedoch eine zusätzliche starke KCNJ10-Färbung (grün), die vor allem mit der roten AQP2-Färbung colokal ist (gelb). Bei der Nierenaufnahme der Knockout-Maus ist kaum noch eine KCNJ10-Restexpression zu erkennen. Im Vergleich zu den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren (Abbildung 12) ist die KCNJ10-Expression deutlich geringer.

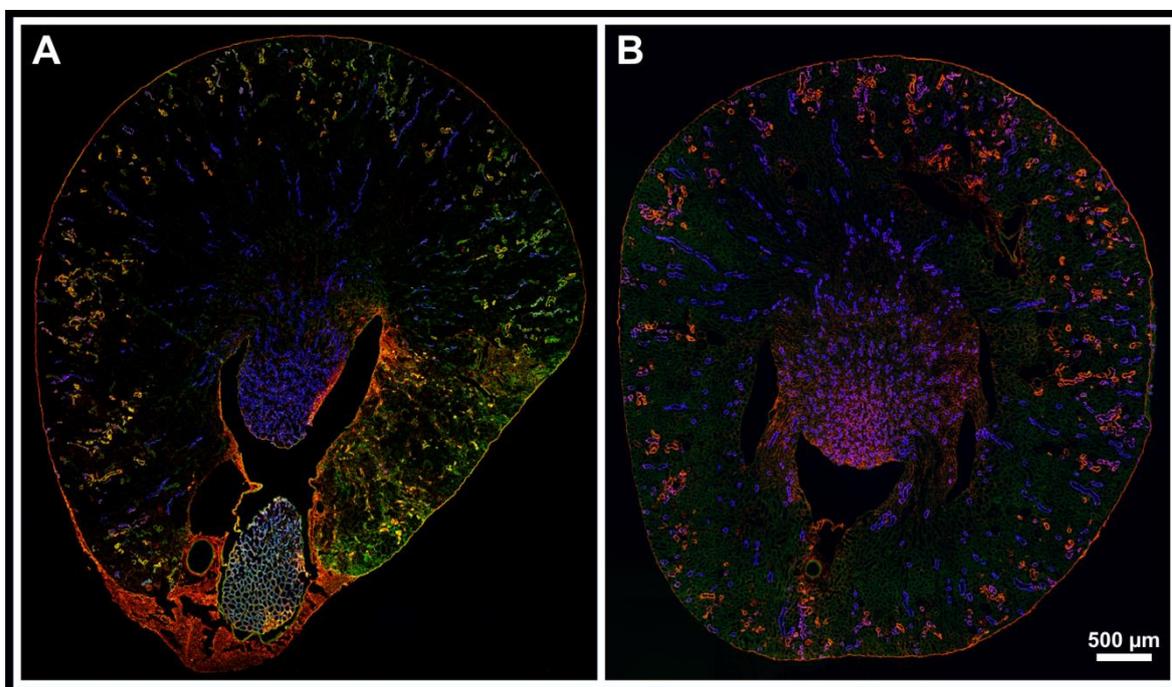


Abbildung 16 Übersichtsaufnahmen von Nierenschnitten einer adulten schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Maus (A) im Vergleich zu einer induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus (B)

Als Marker für DCT, CNT und CD wurden Calbindin (rot) und AQP2 (blau) verwendet. Eine deutliche Färbung von KCNJ10 (grün) ist nur bei der Kontroll-Niere in der Nierenrinde zu sehen. Die Knockout-Niere zeigt im Vergleich dazu fast keine KCNJ10-Restexpression.

Neben der Kreuzung von Pax8Cre-Mäusen mit geflochten KCNJ10-Mäusen wurde auch eine Verpaarung von Pax8Cre-Tieren mit den Tomato-EGFP-Reporter-Mäusen angesetzt. Auch von diesen Nachkommen wurden Nierenschnitte angefertigt (Abbildung 17). Aufgrund der endogen produzierten Fluoreszenzproteine Tomato und EGFP, die entlang des gesamten Tubulussystems exprimiert wurden, wurde von einer weiteren Färbung abgesehen und die Gefrierschnitte wurden direkt eingebettet.

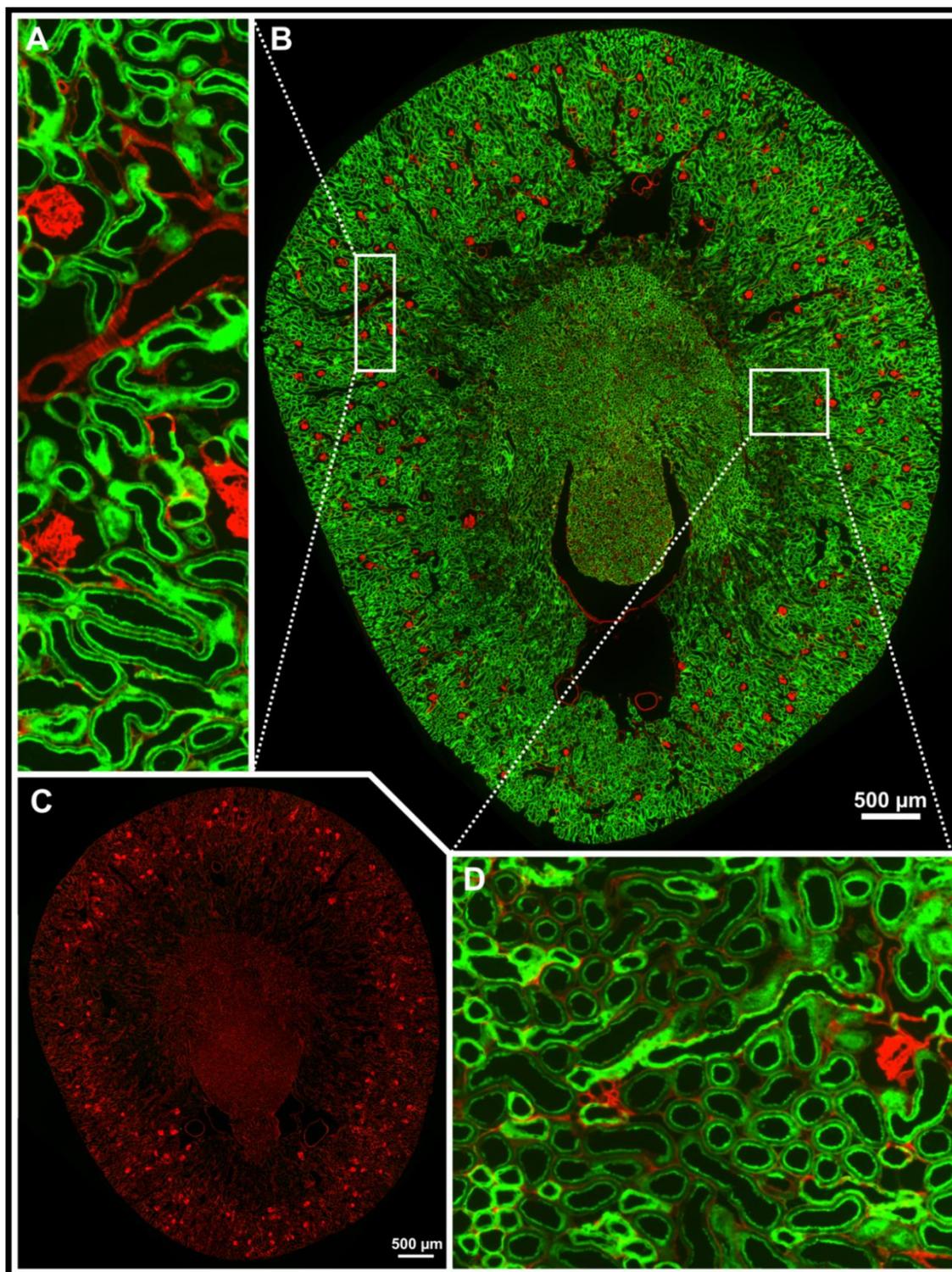


Abbildung 17 Übersichtsaufnahmen von einem Nierenschnitt einer induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus (A,B und D) im Vergleich zu einer nicht-induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus (C)

Die nicht-induzierte Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus (C) zeigt keinerlei EGFP-Fluoreszenz, was darauf schließen lässt, dass die Cre-Rekombinase ohne Doxycyclin-Gabe nicht aktiviert wird. In so gut wie allen Tubuluszellen der induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus ist ein Fluoreszenzsignal des endogenen, membrangebundenen EGFP (grün) zu erkennen (B), was beweisend für die pan-tubuläre Cre-Expression ist. Die Tomato-Färbung (rot) als Hinweis auf das Ausbleiben der Cre-Expression beschränkt sich auf die Glomeruli und Blutgefäße (A), sowie auf die interstitiellen Zellen (D).

Die Gewebeschnitte lassen erkennen, dass dieses Cre/loxP-System sehr exakt reguliert war (Abbildung 17). Bei der nicht-induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus (C) wurde in der Niere einzig Tomato exprimiert. Eine EGFP-Färbung konnte nicht erkannt werden, was darauf schließen lässt, dass die Cre-Rekombinase nicht ohne Stimulation aktiv war. Weiterhin beobachtete man in der induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Maus eine fast komplette EGFP-Expression in Tubuluszellen (B, D). Glomeruli und Blutgefäße waren von der Cre-Expression nicht betroffen, dort wurde weiterhin das rot fluoreszierende Tomato-Protein exprimiert (A). Nur sehr vereinzelt sind Zellen des Tubulussystems zu erkennen, bei denen es zu keiner Rekombination kam (A).

4.1.2.3 Effizienz der Knockout-Induktion bei Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren durch Doxycyclin-Gabe

Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere mussten vor deren Verwendung im Experiment einmalig mit Doxycyclin induziert werden, damit das gefloxtete KCNJ10-Gen in den entsprechenden Zellen deletiert werden konnte. Bei diesem Mausmodell sollte zunächst untersucht werden, ob bei der induzierbaren Pax8Cre-Mauslinie ein effizienterer Knockout erzielt werden konnte als bei der KspCre-Linie.

Dafür wurde die KCNJ10-mRNA-Expression von schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen mit induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen verglichen. Nicht jedes Versuchstier wurde für jedes Experiment verwendet. Abhängig von der Belastung und Dauer dieser Experimente wurden Versuchsgruppen aus Kontroll- und Knockout-Tieren gebildet. Der Vergleich der KCNJ10-mRNA-Expression wurde deshalb auch immer innerhalb einer Versuchsgruppe gezogen. Dieser Wert wurde mit einer Realtime PCR ermittelt und anschließend über die β -Actin-mRNA-Expression (Haushaltsgen) normiert. Die durchschnittliche KCNJ10-mRNA-Expression der Kontroll-Mäuse wurde auf 100 % gesetzt und die KCNJ10-Restexpression der Knockout-Tiere aus der Versuchsgruppe dazu in Relation gestellt. Einige der Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere zeigten trotz Doxycyclin-Behandlung keine erniedrigte KCNJ10-mRNA-Expression in der Niere. Sie wurden als "Non-Responder" bezeichnet und von der Auswertung ausgeschlossen. Die Grenze der mRNA-Restexpression wurde dabei auf 30 % festgelegt. Induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere, die bei der Realtime Analyse eine weniger als diese 30 %-ige KCNJ10-mRNA-Expression aufwiesen, wurden dementsprechend für die jeweilige Versuchsauswertung verwendet (Abbildung 18).

Insgesamt wurden 64 Kontroll-Tiere (schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}) verwendet (100,0 \pm 3,4 %). Die 34 Knockout-Tiere (induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}) hatten im Vergleich dazu eine KCNJ10-mRNA-Restexpression von 16,0 \pm 1,3 %. Die 13 Non-Responder-Mäuse zeigten zum Großteil keine Reaktion auf die 3-wöchige Doxycyclin-Behandlung. Ihre KCNJ10-Restexpression lag

durchschnittlich bei $102,5 \pm 9,8$ %. Die KCNJ10-Restexpression der Knockout-Tiere war im Vergleich zu den Kontroll-Tieren signifikant erniedrigt (p -Wert: $3,3 \cdot 10^{-37}$).

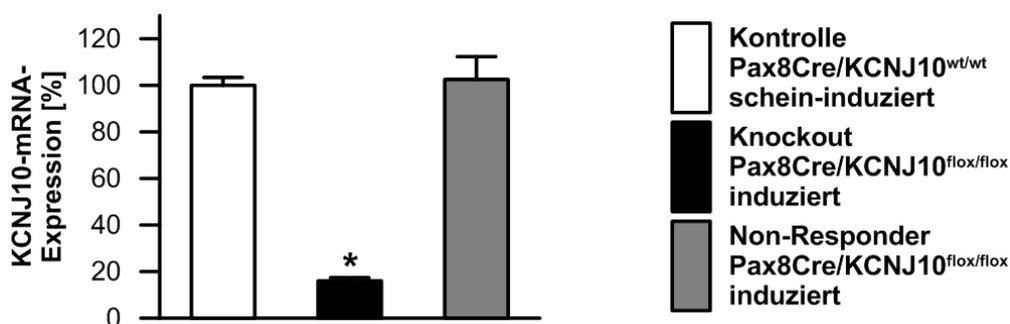


Abbildung 18 KCNJ10-mRNA-Expression von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren im Vergleich zu schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren

Die mittlere Expressionsstärke von KCNJ10 wurde für die Kontroll-Tiere (weiß, n=64) pro Versuchsgruppe auf 100 % gesetzt. Knockout-Tiere (schwarz, n=34) zeigten eine signifikant niedrigere Restexpression, während die sog. Non-Responder-Mäuse (grau, n=13) eine vergleichbare KCNJ10-mRNA-Expression wie Kontroll-Tiere aufwiesen.

4.1.3 Vergleich der beiden nierenspezifischen Cre-Mausmodelle

Nach den ersten histologischen und funktionellen Untersuchungen der KspCre- und induzierbaren Pax8Cre-Mauslinie sollte entschieden werden, welches Mausmodell besser für die Phänotypisierung des KCNJ10-Nieren-Knockouts geeignet ist. In der Diskussion (5.1 Wahl der KCNJ10-Knockout-Maus, Seite 74) wird genau darauf eingegangen, warum die Pax8Cre-Mauslinie bevorzugt wurde. An dieser Stelle werden lediglich die Ergebnisse verglichen und kurz ausgeführt, warum die Entscheidung auf die Pax8Cre-Mauslinie fiel.

Befürchtungen, der nierenspezifische KCNJ10-Knockout könnte ähnlich wie der konventionelle Knockout zu einer frühen Letalität führen, haben sich nicht bestätigt, da die KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere genau wie die KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere das Adultstadium erreichten. Weder in der Gewichtsentwicklung noch in der Elektrolyt-Ausscheidung gab es Unterschiede zwischen Knockout und Kontrolle. Beim Vergleich der Promotoren (Ksp und Pax8) mittels der Tomato-EGFP-Maus waren deutliche Unterschiede in der Expression der von ihnen regulierten Gen-Sequenz aufgefallen. Während sich bei den Pax8Cre/ Tomato-EGFP-Mäusen eine Cre-Aktivität in so gut wie allen Tubuluszellen der Niere erkennen ließ, war sie bei den KspCre/ Tomato-EGFP-Mäusen mosaikartig entlang der Nephrone. Die KCNJ10-mRNA-Expression war sowohl bei den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen als auch bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen signifikant niedriger als bei den jeweiligen Kontroll-Tieren.

Die Wahl fiel letztendlich auf das Pax8Cre-Mausmodell. Bereits die Reporter-Maus Tomato-EGFP bestätigte, dass bei diesem Modell eine deutlich homogenere Cre-Aktivität entlang des Tubulus

gewährleistet war. Ebenso war die KCNJ10-mRNA-Expression bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen niedriger. Eine Kompensation des renalen KCNJ10-Knockouts in den anderen Tubuluszellen erschien damit in den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen unwahrscheinlicher als in den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen.

4.2 Wahl der Kontroll-Tiere

In 4.1 wurde die KspCre-Mauslinie und die induzierbare Pax8Cre-Mauslinie verglichen und entschieden, dass für die weitere Phänotypisierung des KCNJ10-Nieren-Knockouts die induzierbare Pax8Cre-Mauslinie verwendet werden sollte. Alle weiteren Ergebnisse beziehen sich dementsprechend auf diese Mauslinie. Die Knockout-Tiere sind folglich immer induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse. Weiterhin musste aber eine geeignete Kontroll-Gruppe gewählt werden. Damit die Anzahl an Versuchstieren möglichst gering gehalten wurde, sollte nach einem Vergleich der zwei möglichen Kontrollen lediglich eine gewählt werden. Die eine Möglichkeit waren die nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse (Kontrolle 1), die den gleichen Genotyp hatten wie die Knockout-Tiere, aber nicht mit Doxycyclin behandelt wurden. Die Alternative waren schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse (Kontrolle 2), die zwar nicht gefloxt waren, hingegen ebenfalls drei Wochen lang mit der Antibiotikum-Lösung behandelt wurden.

Obwohl in der Literatur kein Hinweis gefunden wurde, dass eine längere Doxycyclin-Einnahme bei induzierbaren Mausmodellen zu einer veränderten Elektrolyt-Ausscheidung im Urin führt, wurde der Spontanurin von beiden Kontrollen mit dem der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse verglichen. Die Ausscheidungsdaten über den Urin von 23 Knockout-Tieren, 35 nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen und 45 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen wurden gegenübergestellt.

Abbildung 19 zeigt, dass die Kreatinin-Ausscheidung nur bei den Knockout-Tieren deutlich erniedrigt war, was auf ein dauerhaft erhöhtes Urinzeitvolumen dieser Tiere und damit einer Polyurie hinwies. Da Kreatinin Diurese-unabhängig recht konstant in den Primärharn filtriert wird, wurden die Urin-Elektrolyte auf das Kreatinin normalisiert. Durch diese Normalisierung lassen sich Veränderungen der ausgeschiedenen Stoffmenge eines Elektrolyten erkennen. Weiterhin lässt die Abbildung erkennen, dass es zwischen den Kontrollen bei der Chlorid- und Phosphat-Ausscheidung signifikante Unterschiede gab. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich nicht auf das gefloxt KCNJ10-Gen zurückzuführen, da sich die nicht-induzierten gefloxten Tiere bezüglich ihres Gewichts und der Urin-Elektrolyt-Ausscheidung vergleichbar entwickeln (Abbildung 15). Die Unterschiede waren demnach am ehesten Effekte der Doxycyclin-Behandlung. In den zusätzlich

gemessenen Urin-Elektrolyten (Natrium, Magnesium, Calcium, Kalium, Ammonium, vgl. Tabelle 8, Seite 102) verhielten sich die nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse im Gegensatz zu induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen nicht signifikant anders.

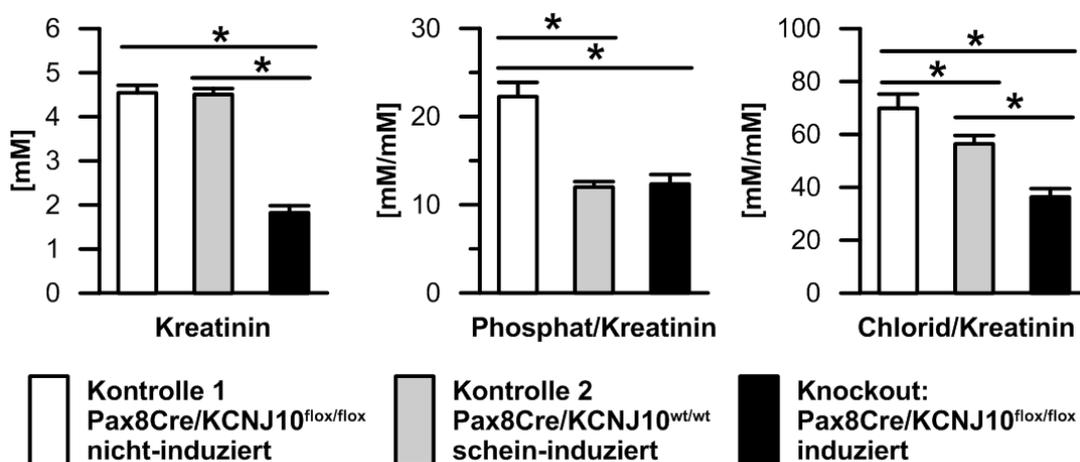


Abbildung 19 Renale Elektrolyt-Ausscheidung von nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (Kontrolle 1, n=35), schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (Kontrolle 2, n=45) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (Knockout, n=23)

Die Kreatinin-Konzentration wurde zur Normalisierung von Urin-Elektrolyten verwendet, da die Ausscheidung über den Harn zwischen den Versuchsgruppen nicht gleich war. Die Ausscheidung von Phosphat/Kreatinin und Chlorid/Kreatinin war bei Kontrolle 2 signifikant niedriger als bei Kontrolle 1.

Die Unterschiede zwischen den möglichen Kontrollen deuten darauf hin, dass das Antibiotikum renale Effekte hat. Als Schlussfolgerung dieser Urinalysen mussten deshalb die nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse als geeignete Kontrollen ausgeschlossen werden. Damit mögliche weitere Doxycyclin-Einflüsse nicht fälschlicherweise als Phänotyp des renalen KCNJ10-Knockouts gedeutet werden, wurde deswegen als Kontrolle für die Phänotypisierung der nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Mäuse schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse verwendet.

4.3 Phänotypisierung adulter Knockout-Mäuse

In 4.1 wurde das nierenspezifische KspCre- und das induzierbare, nierenspezifische Pax8Cre-System verglichen, wobei sich Pax8 als der passendere Promotor erwiesen hat und deswegen die induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus für die Untersuchung des EAST-Syndroms in der Niere verwendet wurde. In 4.2 wurden die geeigneten Kontroll-Tiere ermittelt. Da ein Einfluss von Doxycyclin auf den Maus-Phänotyp nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden für die Experimente Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse verwendet, die ebenfalls einer dreiwöchigen Doxycyclin-Behandlung unterzogen wurden (schein-induziert).

Nach der Wahl eines geeigneten nierenspezifischen Knockout-Systems mit der entsprechenden Kontrolle konnte der Phänotyp des renalen KCNJ10-Knockouts untersucht werden.

4.3.1 Urinanalyse

4.3.1.1 Elektrolytmessungen im Spoturin adulter Mäuse

Bei den EAST-Patienten führen die Mutationen im KCNJ10-Kanal zu einer Störung der renalen Elektrolyt-Ausscheidung (43). Dementsprechend wurde als erster, nicht-invasiver Schritt zur Charakterisierung der induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus eine Analyse der Elektrolyte des Spontanurins durchgeführt. Dafür wurden Proben von 45 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen vermessen und die Ergebnisse mit denen der 23 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere verglichen.

Neben zahlreichen Elektrolyten wurde zusätzlich der Kreatinin-Gehalt im Urin bestimmt. Wie schon beschrieben, eignet sich Kreatinin dazu, die Urin-Ausscheidung von Elektrolyten darauf zu normalisieren. Bereits hier war ein klarer Unterschied zwischen den Kontroll- und den Knockout-Tieren zu erkennen (Abbildung 20). Während die Kreatinin-Ausscheidung bei den Kontrollen bei $4,1 \pm 0,2$ mM lag, war der Wert der Knockout-Tiere um mehr als die Hälfte erniedrigt ($1,8 \pm 0,1$ mM).

Knockout-Tiere hatten im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren eine niedrigere renale Natrium- und Kaliumausscheidung. Die Ammonium-Ausscheidung über den Urin war erhöht. Ansonsten war die Magnesium- und Calcium-Ausscheidung über den Harn zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht verändert (Werte im Anhang, Tabelle 8, Seite 102).

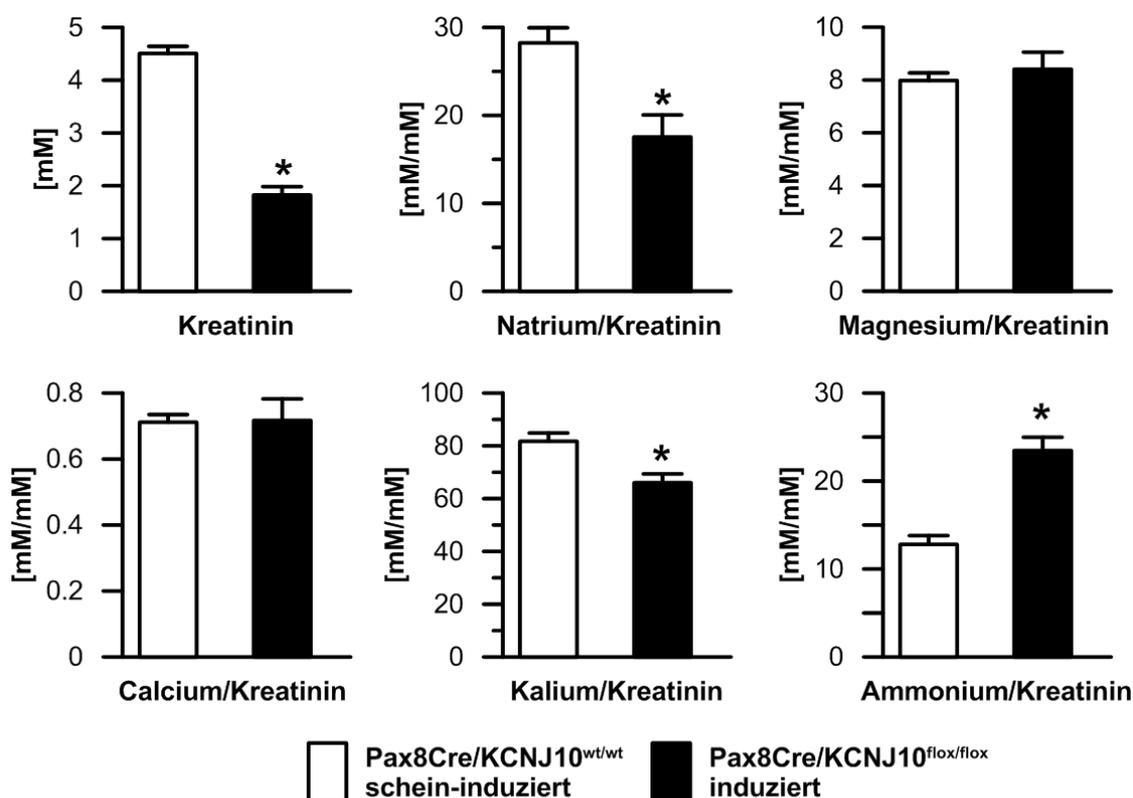


Abbildung 20 Renale Elektrolyt-Ausscheidung schein-induzierter Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere im Vergleich zu induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren

Die Urin-Elektrolyte wurden auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert. Die Kreatinin-Konzentration war bei den Knockout-Mäusen erniedrigt, genauso wie die Natrium/Kreatinin-Ausscheidung. Die renale Magnesium/Kreatinin- und Calcium/Kreatinin-Ausscheidung war nicht verändert, wohingegen die Ammonium/Kreatinin-Ausscheidung erhöht war.

4.3.1.2 Osmolalität des Urins

Ein weiterer Messwert der Urinanalyse war die Bestimmung der Urin-Osmolalität. Die Urine von jeweils 7 Mäusen pro Gruppe wurden über 6 Stunden im metabolischen Käfig gesammelt und kryoskopisch vermessen.

Schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse wiesen eine mittlere Osmolalität von 1864 ± 352 mosm/kg auf, während die der Knockout-Tiere (induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}) mit 621 ± 67 mosm/kg signifikant niedriger ausfiel (Abbildung 21, p-Wert: 0,01). Dieser Befund deutete auf einen renalen Konzentrationsdefekt bei den Knockout-Tieren hin, welcher sich bereits bei der erniedrigten Kreatinin-Konzentration im Urin zeigte.

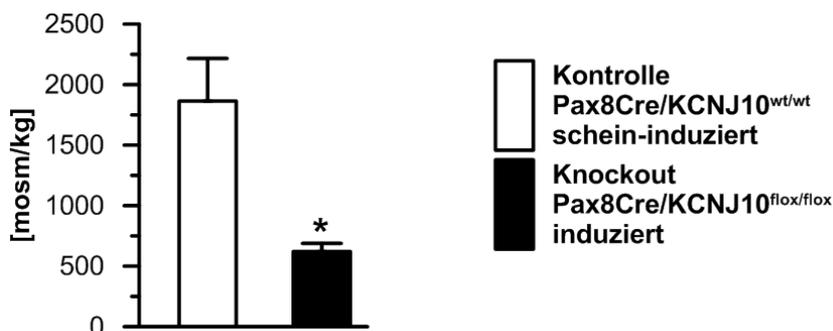


Abbildung 21 Urin-Osmolalität von schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren

Der Urin der Knockout-Tiere hatte eine deutlich geringere Osmolalität, was auf einen verdünnten Urin hinwies.

4.3.2 Durchschnittlicher Wasser- und Futterverbrauch

Da die extrem erniedrigte Urin-Kreatinin-Konzentration ungewöhnlich erschien, wurden 7 Mäuse pro Gruppe in Einzelkäfigen gehalten, um über einen längeren Zeitraum hinweg das Fress- und Trinkverhalten der Tiere zu beobachten. Der Futterverbrauch der Tiere lag bei Kontroll- und Knockout-Tieren etwa gleich (Abbildung 22). Die Trinkmenge der Mäuse unterscheidet sich jedoch deutlich (p-Wert: 0,0002). Während Kontroll-Tiere im Schnitt $5,7 \pm 0,2$ ml/Tag tranken, lag der Wert bei den Knockout-Tieren fast dreimal so hoch bei $14,1 \pm 1,3$ ml Wasser pro Tag. Diese Polydipsie passt zu der beobachteten Polyurie.

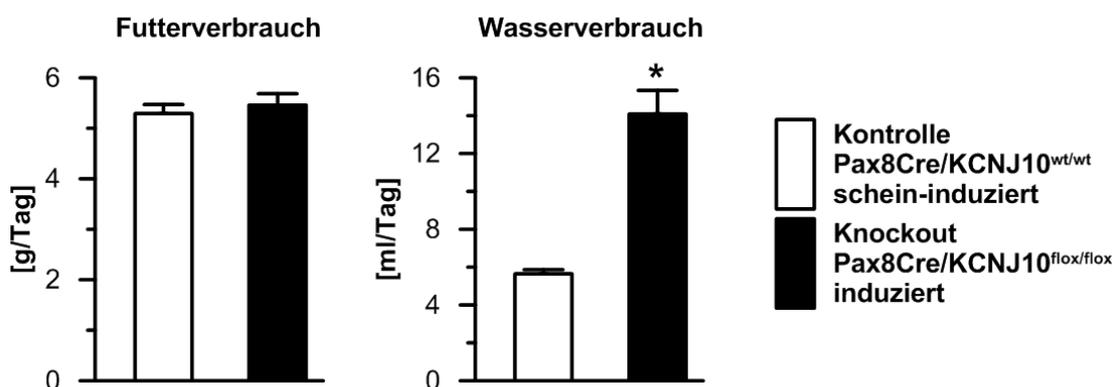


Abbildung 22 Durchschnittlicher Wasser- und Futterverbrauch von Kontroll- und Knockout-Mäusen im Einzelkäfig (jeweils n=7)

Während sich der Futterverbrauch zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht unterschied (Kontrolle: $5,2 \pm 0,2$ g/Tag, Knockout: $5,4 \pm 0,2$ g/Tag; p-Wert: 0,57), trank eine Knockout-Maus im Mittel fast dreimal so viel Wasser wie eine Kontroll-Maus.

4.3.3 Blut-Analyse

Als weiterer wichtiger Punkt bei der Phänotypisierung der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse wurde eine Blutanalyse durchgeführt. Da eine veränderte renale Ausscheidung von Elektrolyten beobachtet wurde, lag es nahe, dass diese Parameter auch im Blut verändert vorlägen. Ebenso zeigen EAST-Patienten mit einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose einen entgleisten Säure-Basen-Haushalt (43). Deshalb sollten die Blutgase der Knockout-Tiere mittels Blutgasanalyse ermittelt werden.

Die Blutabnahme wurde bei 41 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und 11 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren über den submandibulären Venenplexus durchgeführt (Abbildung 23). Die Auswertung von arteriellen Blutproben lieferte vergleichbare Ergebnisse und ist im Anhang dargestellt (Tabelle 9, Seite 103).

Die gemessenen Plasma-Elektrolyte (Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ und K⁺) zeigten überraschenderweise keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Bei der Messung des Hämatokrits stellte sich jedoch heraus, dass der Wert bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen deutlich erhöht war. Dieser Messwert bezeichnet den prozentualen Anteil der festen Bestandteile im Blut (v.a. Erythrozyten) bezogen auf das Gesamtvolumen und liefert wertvolle Hinweise über den Wasserhaushalt. Auch diese Befunde lassen vermuten, dass die Knockout-Tiere eine Störung der Harnkonzentrierung aufweisen. Da unphysiologisch viel Wasser über den Urin verloren geht und damit das Extrazellulärvolumen sinkt, steigt vermutlich der Hämatokrit-Wert der Knockout-Tiere an.

Bei den Blutgasen gab es wie erwartet Unterschiede zwischen den Mausgruppen. pH- und pO₂-Werte blieben bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen unverändert, aber die Werte für pCO₂- und das Bikarbonat waren jeweils deutlich erhöht. Beide Mausgruppen wiesen darüber hinaus einen deutlich negativen Basenüberschuss (Base Excess) auf, was eventuell auf die Methode der Blutabnahme zurückzuführen ist. Dennoch ist der Wert der Knockout-Tiere weniger negativ als der der Kontroll-Mäuse. Der erhöhte Bikarbonat-Wert, der höhere Basenüberschuss sowie der tendenziell erhöhte pH-Wert deuten darauf hin, dass die Knockout-Tiere wie die EAST-Patienten an einer metabolischen Alkalose litten. Der erhöhte CO₂-Wert könnte durch eine Alkalose-induzierte Verminderung des Atemantriebs bedingt sein.

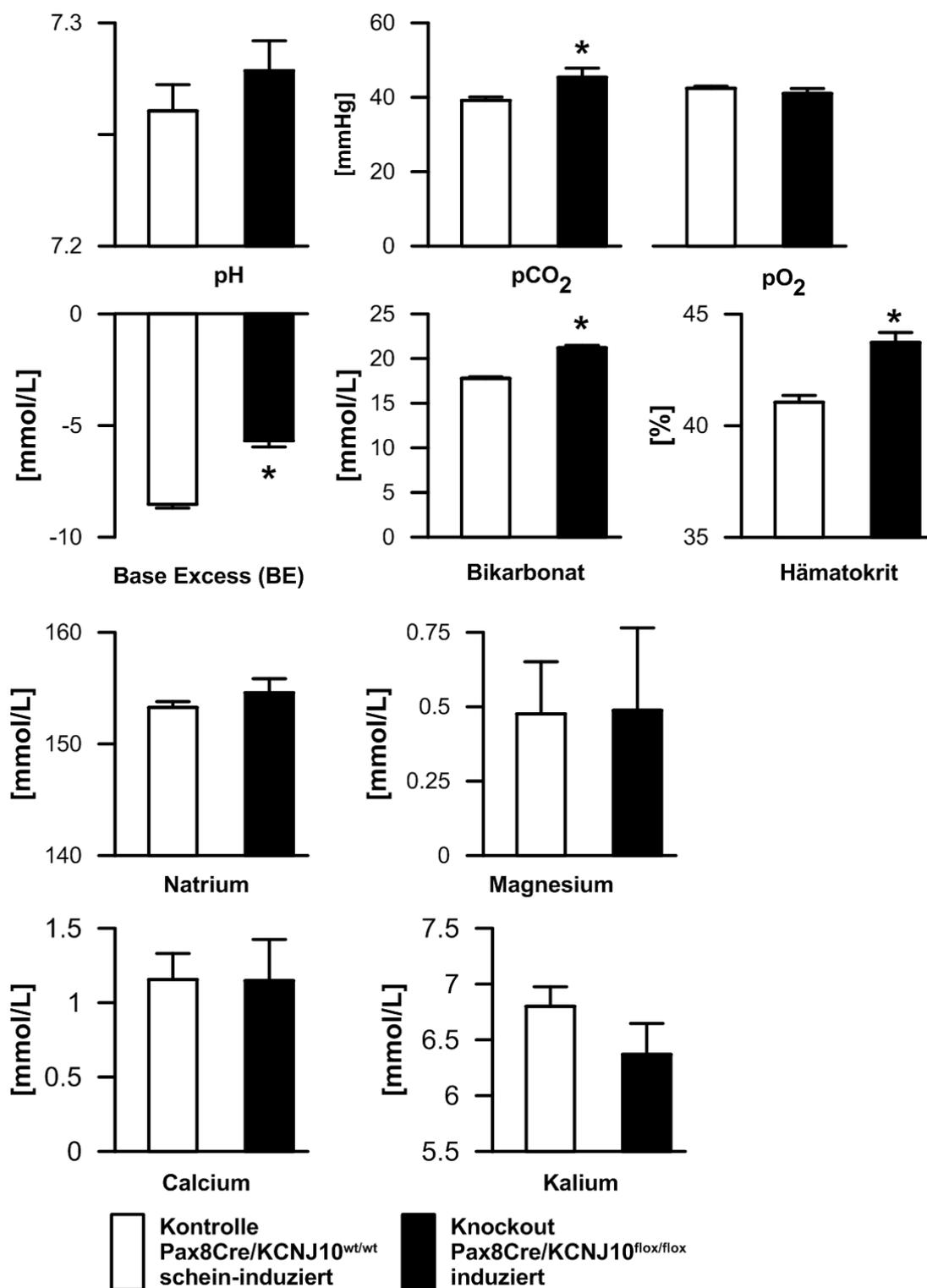


Abbildung 23 Blutgasanalyse und Blutelektrolyte von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flx/flx}-Tieren (n=11) und schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren (n=41)

Die Blutabnahme wurde über den submandibulären Venenplexus durchgeführt. Die Tiere unterschieden sich nicht in den Blutelektrolyten. Bei den Blutgasen zeigten die Knockout-Mäuse jedoch ein erhöhtes pCO₂, Bikarbonat und Hämatokrit, sowie einen positiveren Basenüberschuss im Vergleich zu den Kontroll-Tieren.

4.3.4 Blutdruck

Da die Niere entscheidend an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist, wurde mittels einer nicht-invasiven Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode) dieser Parameter ermittelt. Die Werte von 3 Messtagen wurden pro Maus gemittelt. In Abbildung 24 wurden die Messungen von jeweils 4 Männchen pro Gruppe aufgenommen, da sich die weiblichen Tiere trotz langer Eingewöhnungsphase nicht an die Messung gewöhnt haben.

Die Werte der schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere lagen bei durchschnittlich $92,7 \pm 2,6$ mm Hg. Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere zeigten im Vergleich dazu keinen veränderten Blutdruck ($94,31 \pm 3,2$ mm Hg; p-Wert: 0,7).

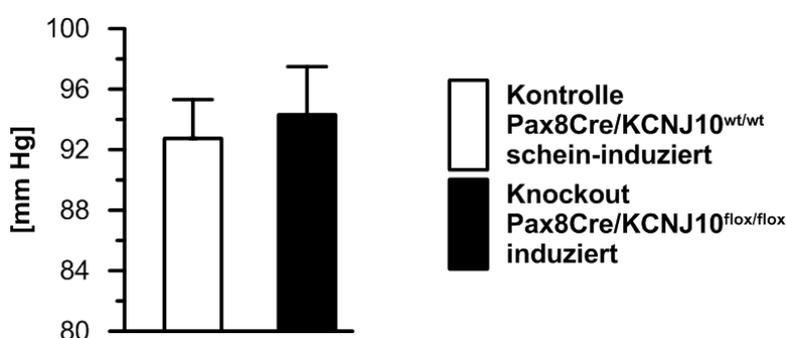


Abbildung 24 Mittlerer arterieller Blutdruck

Die Werte wurden mittels der nicht-invasiven Tail Cuff-Methode bestimmt. Jeweils 4 Kontroll- und Knockout-Männchen wurden über 3 Tagen vermessen. Die Versuchsgruppen wiesen keinen Unterschied im Blutdruck auf.

4.3.5 Aldosteron-Messung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) reguliert maßgeblich den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers. Einflüsse, wie eine niedrige Chlorid-Konzentration in der Tubulusflüssigkeit der Macula Densa, können zur Freisetzung von Renin führen, welches den Regelkreis in Gang setzt. Schließlich wird am Ende der Kaskade in der Nebenniere das Hormon Aldosteron freigesetzt, welches durch eine vermehrte Oberflächenlokalisierung von epithelialen Natrium-Kanälen (ENaC) und der Na⁺/K⁺-ATPase im Sammelrohr die renale Resorption von Natrium über das Epithel erhöht. Da die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse Hinweise für eine veränderte Salz-Ausscheidung gaben, wurde daher das Blutplasma auf eine veränderte Aldosteron-Konzentration hin untersucht.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, gab es keinen Unterschied in der Plasma-Konzentration des Steroidhormons. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Blutabnahme bei narkotisierten Mäusen im Letalversuch durchgeführt wurde. Da bekannt ist, dass sich bei Stress und nach Operationen der Aldosteron-Spiegel erhöht, könnte das auch die starken Schwankungen und die hohen Werte der Aldosteron-Konzentration im Plasma erklären. Hätten die Tiere jedoch sehr stark erhöhte Plasma-

Aldosteron-Werte gehabt, wäre der Unterschied vermutlich auch bei dieser Messung erkennbar gewesen.

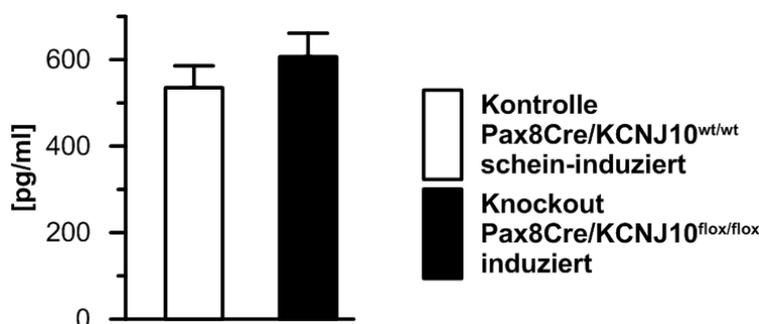


Abbildung 25 Aldosteron-Werte im Blutplasma von 13 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren im Vergleich zu 16 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren

Die Versuchsgruppen wiesen keinen Unterschied in ihrem Plasma-Aldosteron-Spiegel auf (Kontrolle: 535 ± 51 pg/ml; Knockout 607 ± 55 pg/ml; p-Wert: 0,4).

4.3.6 Messung der glomerulären Filtrationsrate

Als Ultrafiltrat des Plasmas entsteht im Glomerulus der Primärharn. Die Rate dieser Filtration (Volumen/Zeit), die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), ist ein wichtiger Parameter, um die Nierenfunktion abzuschätzen. Aus diesem Grund war es naheliegend, die GFR der KCNJ10-Knockout-Mäuse zu messen (Abbildung 26).

Für den Versuch wurde die GFR von 9 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen und 5 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren ermittelt. Der Wert der Kontroll-Mäuse lag im Mittel bei 13,6 ± 0,4 µl/min/g KG. Im Vergleich dazu hatten die Knockout-Mäuse eine signifikant geringere Filtrationsrate (9,4 ± 0,6 µl/min/g KG; p-Wert: 0,0005).



Abbildung 26 Glomeruläre Filtrationsrate von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren (n=5) im Vergleich zu induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren (n=9)

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde über die FITC-Sinistrin-Clearance berechnet. Sie war bei den Knockout-Tieren um 30 % niedriger.

4.3.7 Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener renaler Transporter, Enzyme, Kanäle, Carrier und Proteine

Die deutlich verringerte KCNJ10-Expression im distalen Nephron, auf die sowohl die KCNJ10-mRNA-Restexpression als auch die immunhistochemische Färbung in den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren hinwies, führte erwartungsgemäß zu einer gestörten Elektrolyt- und Wasser-Resorption in der Niere. Sowohl der Säure-Basen-Haushalt als auch die renale Elektrolyt-Ausscheidung ist bei den Tieren im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren verändert (Abbildung 20 und Abbildung 23). Es lag daher die Vermutung nahe, dass sich bei den Knockout-Tieren im Rahmen von Adaptationsprozessen die Expression von anderen renalen Transportern und Carriern ebenfalls änderte. Für eine Analyse der mRNA-Expression über Realtime PCR wurden deshalb Transporter, Enzyme, Kanäle, Carrier und Proteine gewählt, die entweder im distalen Nephron exprimiert werden oder an der Natrium-Resorption in der Niere beteiligt sind.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen von jeweils 6 Kontroll- und Knockout-Mäusen. Für eine relative Quantifizierung der jeweiligen Gene wurde die Expression der Kontroll-Tiere auf 100 % gesetzt. Der interne Standard, auf den normalisiert wurde, war jeweils β -Actin.

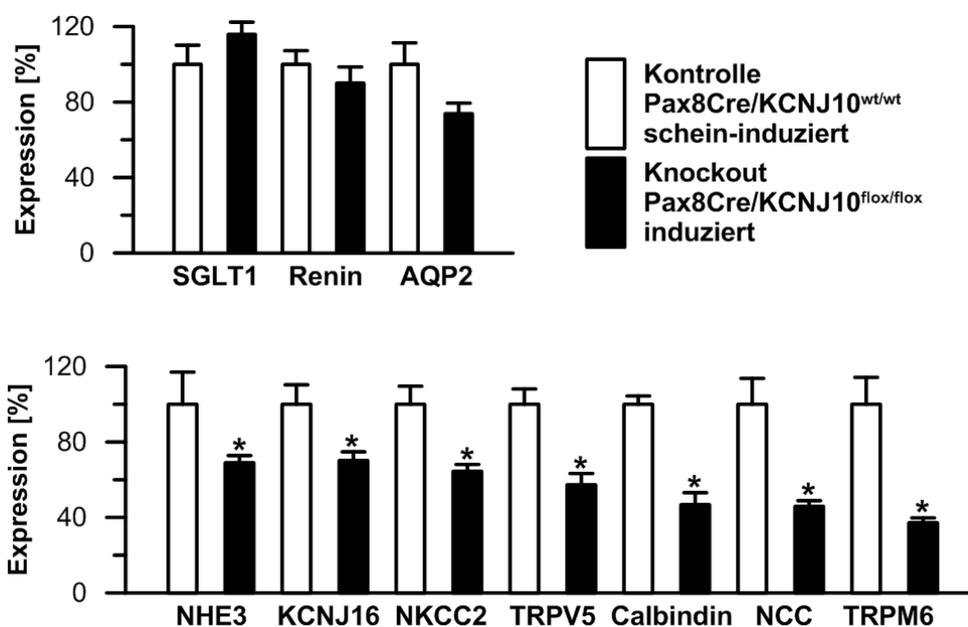


Abbildung 27 mRNA-Expression verschiedener Gene in der Niere bei schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (jeweils n=6)

SGLT1: Natrium/Glucose-Cotransporter 1; AQP2: Aquaporin-2; NHE3: Na⁺/H⁺-Antiporter; KCNJ16: einwärtsgerichteter Kalium-Kanal J16; NKCC2: Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Cotransporter; TRPV5 und TRPM6: Transient Receptor Potential Kationenkanal V5 bzw. M6; NCC: Na⁺/Cl⁻-Symporter

Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von SGLT1, Renin und Aquaporin-2. Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere zeigten jedoch eine niedrigere mRNA-Expression bei NHE3, KCNJ16, NKCC2, TRPV5, Calbindin, NCC und TRPM6.

4.4 Versuche im Stoffwechselkäfig

Für diese Messungen wurden die Tiere nach einer Eingewöhnungsphase im metabolischen Käfig zwei Tage lang unter Kontrollbedingungen gehalten (Kontrollphase, Phase 1), anschließend drei Tage lang mit einer Diuretika-Mischung aus Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) behandelt (Diuretikaphase, Phase 2) und nach einer Auswasch- und Regenerationszeit wurde abschließend ein sechsstündiger Durstversuch (Phase 3) durchgeführt. In der Auswertung wurden jeweils die Ergebnisse der Kontroll- und Diuretika-Tage gemittelt.

Die Kombination der Diuretika bestand zu einen aus Amilorid, der den epithelialen Na⁺-Kanal ENaC blockiert, über welchen die vorwiegende Natrium-Resorption in den distalen Abschnitten des Nephrons stattfindet. Ein Inhibieren dieses Kanals führt dazu, dass eine KCNJ10-vermittelte Störung der Salzresorption im distalen Tubulus nicht durch nachfolgende Nephron-Segmente kompensiert werden kann. Das HCT verhindert die Natriumchlorid-Resorption speziell im distalen Tubulus, indem es den Na⁺/Cl⁻-Symporter NCC hemmt. Paulais et al. hat KCNJ16-Knockout-Mäuse untersucht und dabei beobachtet, dass HCT unter anderem zu einer Normalisierung der ansonsten übermäßigen Calcium-Ausscheidung bei diesen Tieren führte (89).

Da die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse in vorangegangenen Experimenten eine starke Polyurie und Polydipsie gezeigt hatten, sollte festgestellt werden ob sie bei einem Wasserentzug die Diurese ähnlich gut reduzieren könnten wie die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse.

Da die Tiere während der jeweils 6-stündigen Messzeit keinen Zugang zu Futter und teilweise auch Wasser (Durstversuch) hatten, war eine Gewichtsabnahme über diesen Zeitraum zu erwarten. Jedoch zeigten die Tiere keinen Gewichtsverlust, der zu einem Versuchsabbruch geführt hätte (15 % des KG) und erreichten über die 18-stündige Erholungsphase in der Nacht im Einzelkäfig mit Futter und Wasser *ad libitum* eine fast komplette Regeneration bezüglich des Körpergewichts (Werte nicht gezeigt).

4.4.1.1 Urinanalyse

Die Urinproben wurden in jeder Testphase über ein Trichtersystem gesammelt, das Urinvolumen bestimmt und die Elektrolytkonzentrationen mittels Ionenchromatographie vermessen. Da die

Harnblase der Mäuse vor und nach der jeweiligen Versuchsphase möglichst vollständig geleert wurde, konnte das Urinvolumen über die sechsstündige Messung relativ genau ermittelt werden. Dementsprechend wurden die Elektrolytausscheidungen nicht wie bei der Messung des Spoturins über Kreatinin gemittelt (Abbildung 20, Seite 56), sondern es wurde die tatsächlich ausgeschiedene Stoffmenge in 6 Stunden berechnet (Abbildung 28).

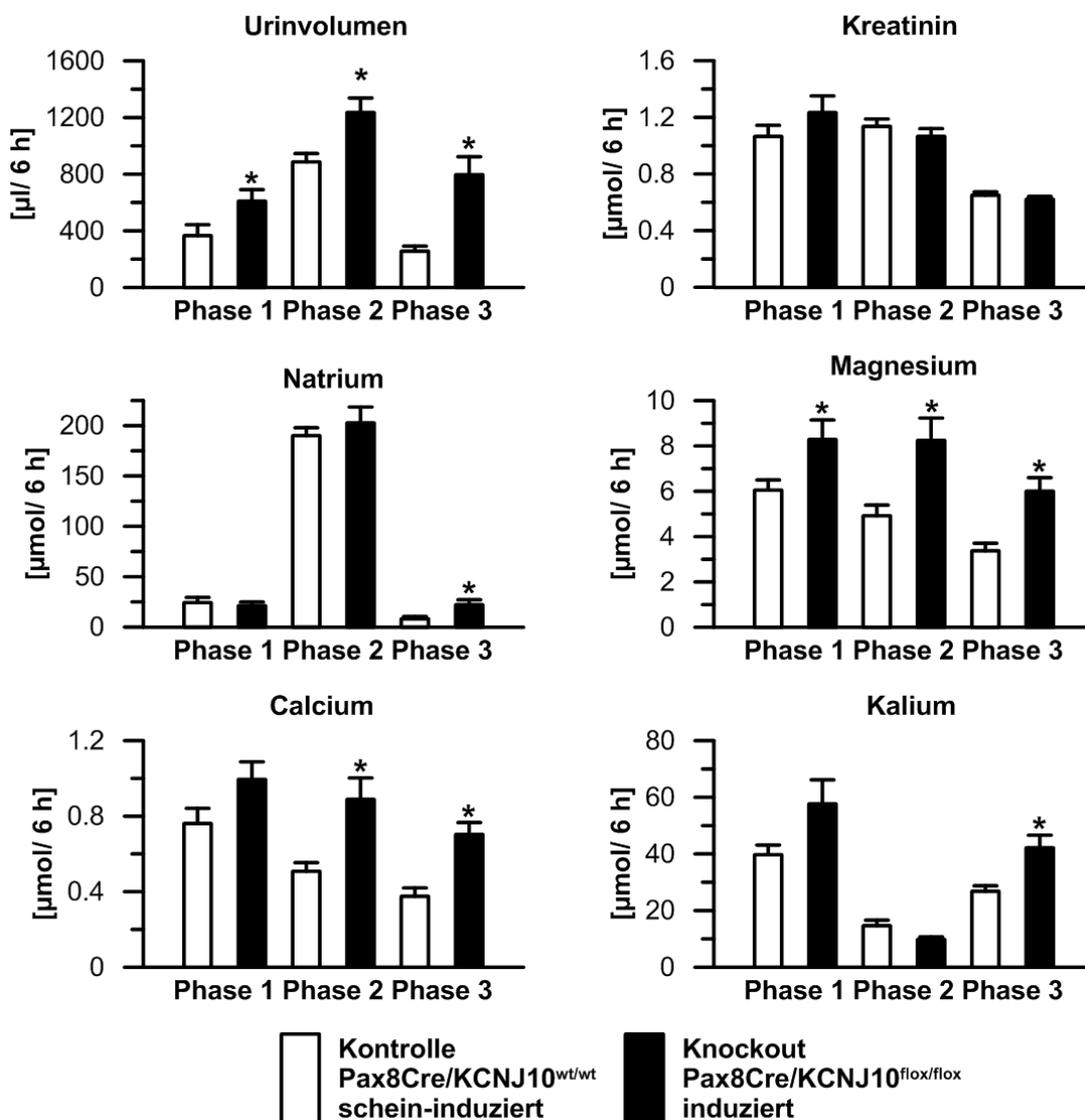


Abbildung 28 Urinvolumen und renale Elektrolytausscheidung von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen im metabolischen Käfig

Die Tiere wurden im Stoffwechselkäfig jeweils 6 Stunden gehalten. Phase 1 beschreibt die mittlere Urinausscheidung Ausscheidung zwei Kontrolltagen (13 Kontroll- und 15 Knockout-Tiere). In Phase 2 wurden die Tiere (pro Versuchsgruppe n=7) über 3 Tage hinweg mit Amilorid und HCT behandelt (ebenfalls Mittelwerte). Phase 3 zeigt die Ergebnisse des 6-stündigen Durstversuchs (pro Versuchsgruppe n=7).

Über das durchschnittlich ausgeschiedene Urinvolumen konnte abgeschätzt werden, ob die Behandlung mit den Diuretika und der Durstversuch erfolgreich waren. Bereits in Phase 1 schieden die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse deutlich mehr Harn aus als die schein-

induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse. Die Ergebnisse stimmen mit der erhöhten Trinkmenge, der geringen Urin-Osmolalität und Urin-Kreatinin-Konzentration der Knockout-Mäuse überein und bestätigen ihre Polyurie und Polydipsie. In Phase 2 führten die diuretischen Wirkstoffe über verschiedene Wirkmechanismen zu einer erhöhten Wasserausscheidung über den Harn. Dabei steigerte sich das Harnvolumen auch bei beiden Mausgruppen deutlich, wobei es sich bei den Kontroll-Mäusen um etwa die Hälfte erhöhte und sich bei den Knockout-Mäusen hingegen verdoppelte. Im Durstversuch hatten die Tiere über 6 Stunden keinen Zugang zu Wasser, was eine Antidiurese zur Folge hatte. Die wassersparende Maßnahme erniedrigte das Urinvolumen der Kontroll-Tiere auf ein Drittel, während die Knockout-Tiere sogar mehr Urin ausschieden als in der Kontrollphase. In beiden Experimenten veränderte sich die Urinausscheidung also zumindest bei den Kontroll-Tieren erwartungsgemäß.

Zusätzlich zu den Elektrolyten im Urin wurde die Kreatinin-Ausscheidung gemessen. Da Kreatinin als harnpflichtiges Stoffwechselprodukt mit relativ konstanter Rate ausgeschieden wird, gibt es keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren. Vergleicht man jedoch Phase 1 und 2 mit Phase 3, fällt der Abfall der Kreatinin-Ausscheidung bei beiden Mausgruppen auf (40 % bei Kontroll-, 50 % bei Knockout-Tieren). Der Wasserentzug führt vermutlich zu einem vorübergehenden Abfall der GFR, was zu einer verminderten glomerulären Filtration von Kreatinin und damit zu einer kurzzeitig geringeren renalen Ausscheidung führt.

Bei der Analyse der Urin-Elektrolyte erkennt man in der Kontrollphase einen signifikanten Magnesium-Verlust bei den Knockout-Mäusen. Ansonsten wurden keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockout-Mäusen beobachtet.

Verglichen mit Phase 1 stieg in Phase 2, bei beiden Versuchsgruppen ähnlich, die Ausscheidung von Natrium extrem an, während Kalium in hohem Maße resorbiert wurde. Diese Daten bestätigen die Wirksamkeit der verwendeten Diuretika, da beide Pharmaka die Natrium-Ausscheidung steigern und Amilorid als Kalium-sparendes Diuretikum die renale Kalium-Sekretion vermindern. Im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, schieden die Knockout-Mäuse im Einfluss der Diuretika vermehrt Magnesium und Calcium aus.

Im Durstversuch kommt es, im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren, bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen neben der erhöhten Wasserausscheidung auch zum vermehrten Verlust von allen dargestellten Elektrolyten, nämlich Natrium, Magnesium, Calcium und Kalium.

4.4.2 Niedrig-Salz-Diäten

Für die Diätversuche wurden die Tiere vor Versuchsbeginn und während des Versuchs im Abstand von einigen Tagen immer wieder gewogen. Als Abbruchkriterium für das Experiment wurde ein Gewichtsverlust von mehr als 15 % KG gesetzt. Weiterhin wurde den Tieren 7 Tage vor Versuchsbeginn Blut abgenommen, ebenso am letzten Tag der Niedrig-Salz-Diät. Darüber hinaus wurde bei den Tieren Spontanurin gesammelt, um die Elektrolytausscheidung während der 14-tägigen Diäten zu überwachen.

Tag 0 bei den jeweiligen Auswertungen bezieht sich auf einen Mittelwert aus 2 Spoturinen, die an verschiedenen Tagen vor Diätbeginn genommen wurden. Da es sich bei den Messungen vor und nach den Diäten jeweils um die selben Tiere handelte, wurde für die Auswertung von Blut- und Urinproben der gepaarte T-Test verwendet.

4.4.2.1 Niedrig-Natrium-Diät

In die Ergebnisse der Niedrig-Natrium-Diät gingen die Messwerte aus 11 Kontroll- und 5 Knockout-Mäusen ein. Das Körpergewicht vor und nach der Diät wurde miteinander verglichen. Im Durchschnitt nahmen die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tiere über die 2 Wochen $1,4 \pm 0,8$ % KG ab, die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse $4,6 \pm 1,1$ % KG. Im Vergleich zu den Kontroll-Tieren war diese Abnahme signifikant (p-Wert: 0,046).

Weiterhin wurden vor und nach der Diät Blutproben vermessen (Abbildung 29). Wie bei der bereits gezeigten Blutgasanalyse (Abbildung 23, Seite 59) gab es zwischen den beiden Versuchsgruppen vor der Diät keine Unterschiede in den Blut-Elektrolyten. Im Vergleich mit der vorherigen Messung waren aber auch die Blutgase nicht verändert.

Über den Zeitraum der Diät stieg der Plasma pH-Wert bei beiden Gruppen an, bei den Knockout-Tieren jedoch signifikant. Ebenso der Bikarbonat-Wert erhöhte sich. Im Laufe der Niedrig-Natrium-Diät erniedrigte sich im Blut Natrium, Magnesium und Kalium bei beiden Versuchsgruppen. Ein Unterschied zwischen den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen und den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen gab es hier aber ebenfalls nicht. Der Calcium-Wert im Blut wurde von der Diät nicht beeinflusst.

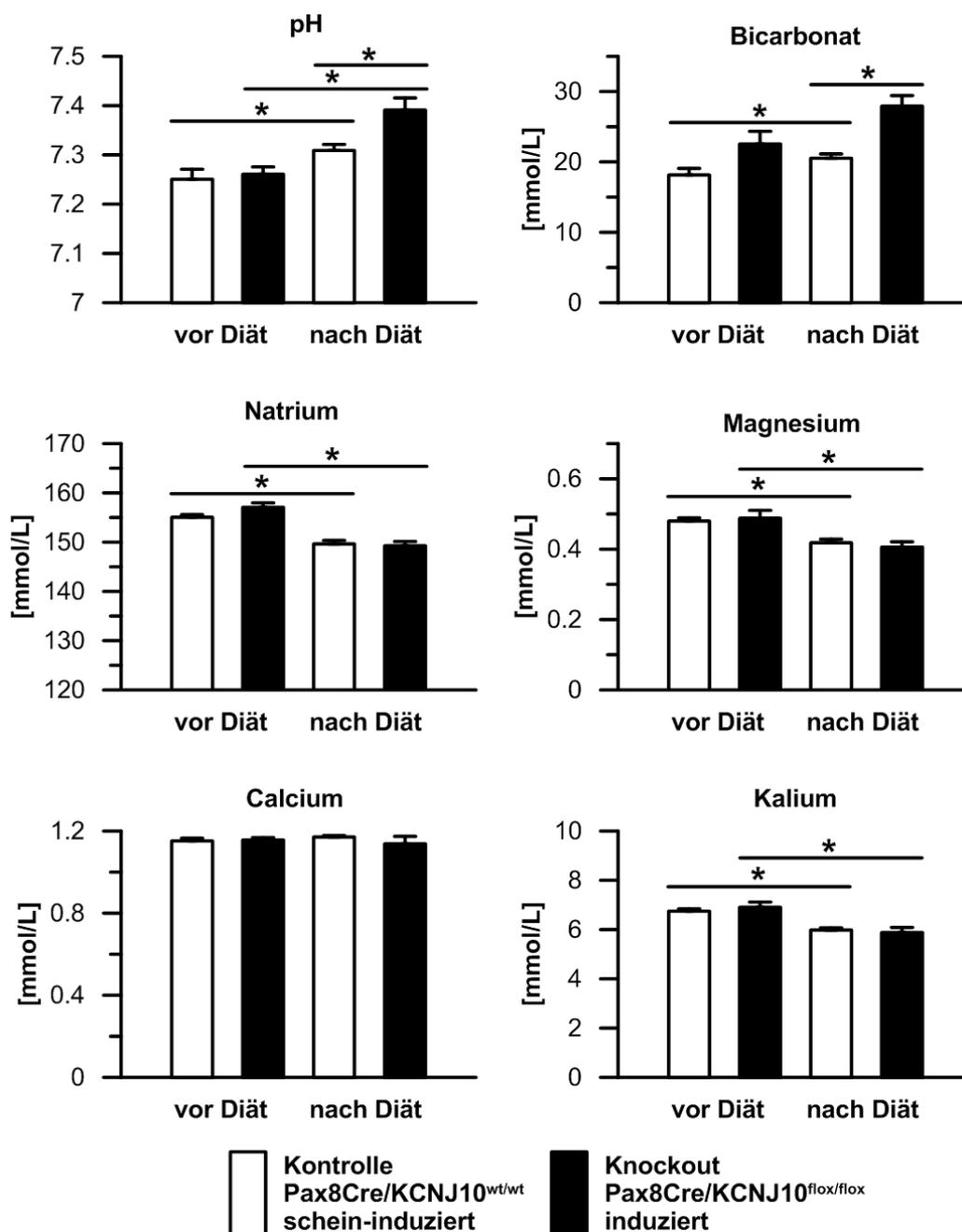


Abbildung 29 Blutanalyse vor und nach der Niedrig-Natrium-Diät von schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren (n=11) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren (n=5)

Die Diät führte zu einer Erhöhung von pH-Wert und Bikarbonat, ebenso zu einer niedrigeren Natrium-, Magnesium- und Kalium-Konzentration im Blut. Zwischen den Versuchsgruppen gab es, außer dem signifikant höheren pH-Wert nach der Diät, keine Unterschiede.

Für die Auswertung der Urin-Elektrolyte wurden diese erneut über die Kreatinin-Konzentration normalisiert (Abbildung 30). Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere zeigten während der Niedrig-Natrium-Diät wie auch in den vergangenen Versuchen konstant niedrige Kreatinin-Werte, die aus der starken Polyurie der Tiere resultierten.

Die Natrium-Ausscheidung über den Urin reduzierte sich, wie erwartet, während der Diätphase bei beiden Gruppen stark. Ein Unterschied zwischen Kontroll- und Knockout-Mäusen war jedoch nicht zu beobachten. Die Kalium-Ausscheidung sank ebenfalls bei beiden Gruppen. Während sie sich jedoch bei den Knockout-Tieren direkt nach Beginn stark verringerte, sank sie bei den Kontroll-Tieren erst zum Ende der Diät. Keine signifikanten Veränderungen konnten bei den Ausscheidungen von Magnesium und Calcium festgestellt werden. Die Werte blieben über den Zeitverlauf der Diät relativ konstant.

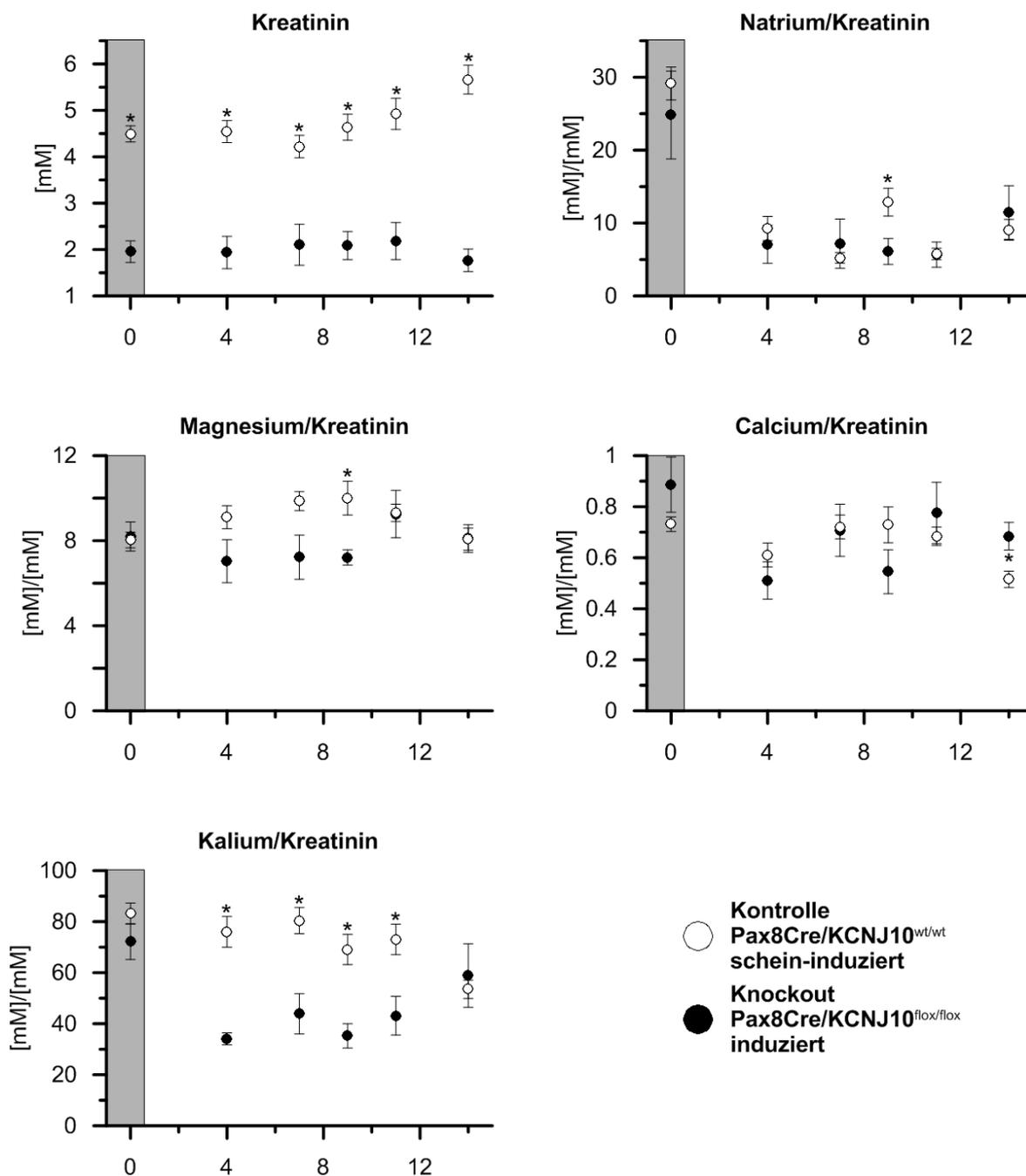


Abbildung 30 renale Elektrolyt-Ausscheidung vor (grau unterlegt) und während der Niedrig-Natrium-Diät von schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (n=11) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{lox/lox}-Mäusen (n=5)

4.4.2.2 Niedrig-Magnesium-Diät

Während der 2-wöchigen Niedrig-Magnesium-Diät nahmen die 10 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse und 5 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flx/flx}-Mäuse etwa gleich viel Körpergewicht ab (Kontrolle: 6,2 ± 0,8 %, Knockout: 6,5 ± 1,7 %, p-Wert: 0,9).

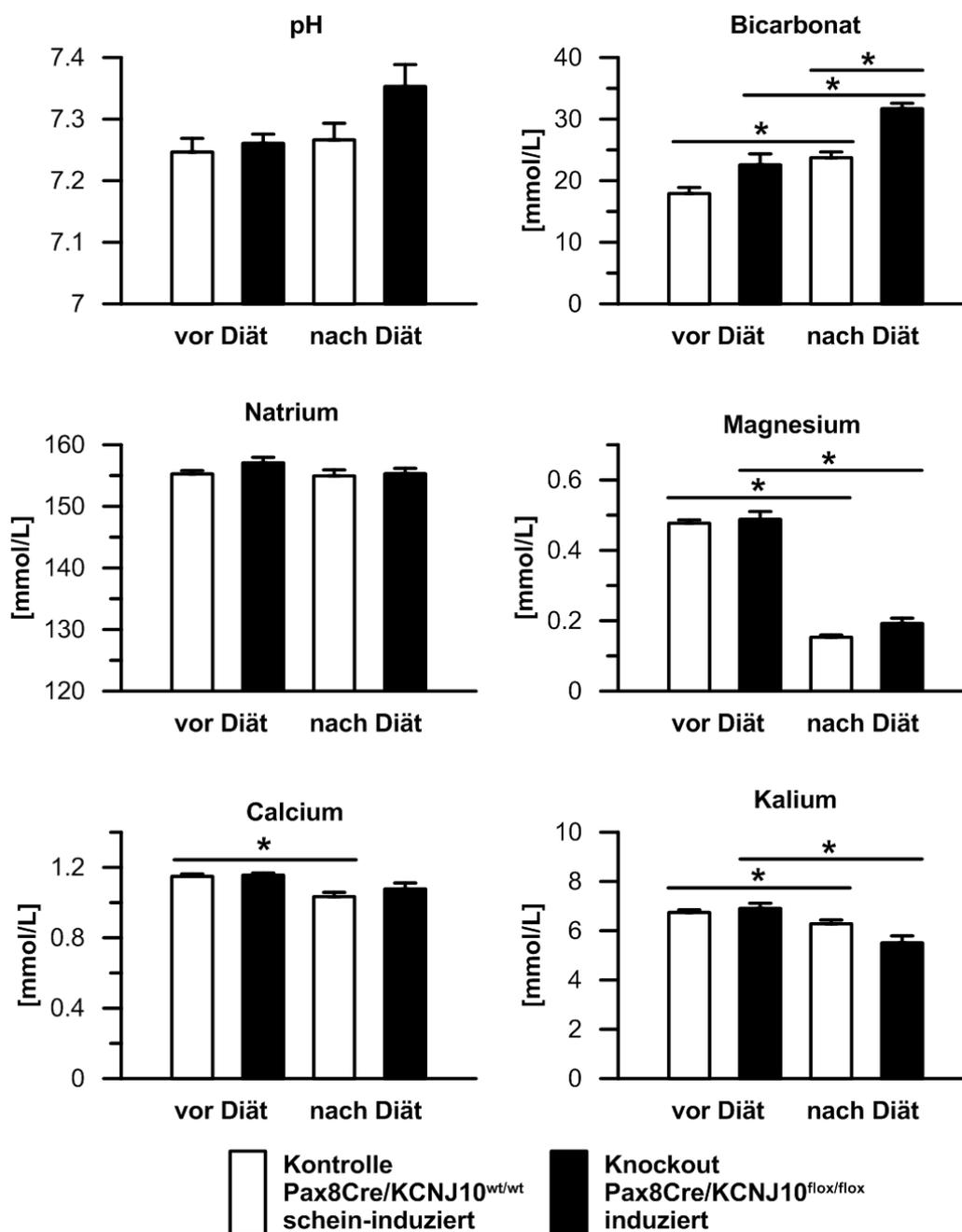


Abbildung 31 Blutanalyse vor und nach der Niedrig-Magnesium-Diät von schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren (n=10) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flx/flx}-Tieren (n=5)

Als Effekt der Diät stieg bei beiden Versuchsgruppen das Bicarbonat im Blut, ebenso sanken das Magnesium und Kalium. Das Calcium im Blut sank nur bei den Kontroll-Tieren.

Das Bikarbonat im Blut stieg bei beiden Versuchsgruppen stark an (Abbildung 31). Nach der Diät war der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen signifikant. Der Plasma pH-Wert der Knockout-Mäuse stieg ebenfalls deutlich an, war aber vermutlich aufgrund der Streuung zwischen den Messungen nicht signifikant.

Neben dem Magnesium im Blut sank bei beiden Versuchsgruppen das Kalium während der Diät ab, wobei die Abnahme bei beiden Gruppen vergleichbar war. Bei den Kontroll-Mäusen sank der Calcium-Spiegel im Blut signifikant ab, wohingegen sich das Natrium über die Dauer der Diät nicht veränderte.

Bei der Analyse des Urins konnte beobachtet werden, dass bei beiden Versuchsgruppen Kreatinin direkt nach Beginn der Diät absank (Abbildung 32). Wie aufgrund der Diät zu erwarten war, fiel die Magnesium-Ausscheidung bei beiden Mausgruppen drastisch ab. Die ursprünglichen Werte von $8,73 \pm 0,37$ mM/mM Kreatinin sanken auf $0,08 \pm 0,01$ mM/mM Kreatinin an Diättag 4. Auch die Knockout-Mäuse verringern die Magnesium-Ausscheidung (von $8,88 \pm 0,83$ auf $0,21 \pm 0,04$ mM/mM Kreatinin), doch während der Wert zu Kontrollbedingungen fast gleich war, lag die Magnesium-Ausscheidung der Knockout-Tiere an Diättag 4 bei mehr als der doppelten Menge.

Ebenso wie die Magnesium-Ausscheidung sank auch die Calcium-Ausscheidung bei beiden Versuchsgruppen drastisch. Die Kalium-Ausscheidung stieg während der 2-wöchigen Diät bei Kontrolle und Knockout an, sank aber zu Diättag 14 bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen wieder. Die Natrium-Ausscheidung schwankte bei beiden Versuchsgruppen während der Diät stark.

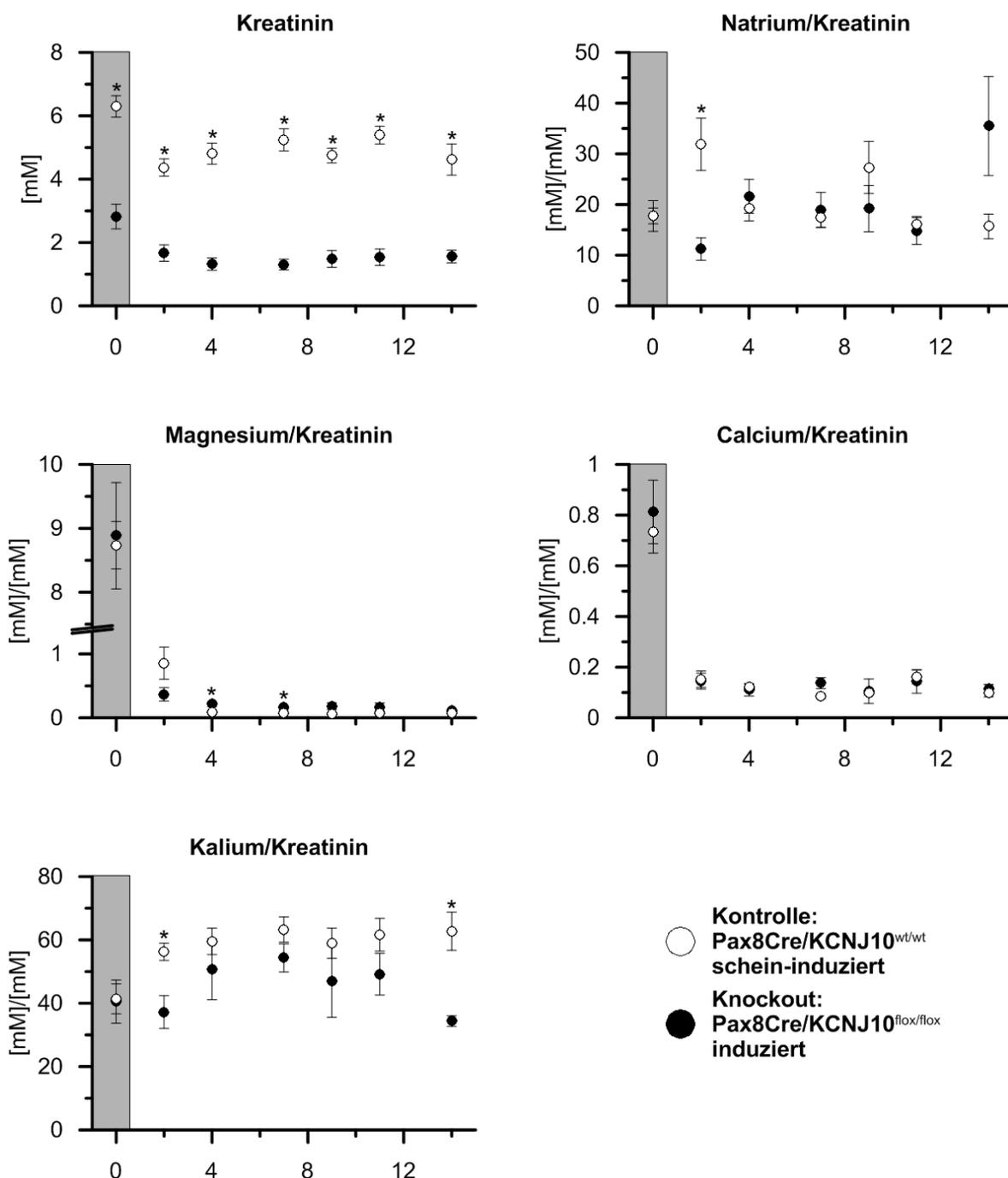


Abbildung 32 renale Elektrolyt-Ausscheidung vor (grau unterlegt) und während der Niedrig-Magnesium-Diät von schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (n=10) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (n=5)

4.4.2.3 Niedrig-Kalium-Diät

Bei den 13 schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen und 5 induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen, die für die Niedrig-Kalium-Diät verwendet wurden, wurde ebenso vorgegangen wie bei den anderen Niedrig-Salz-Diäten. Nach der Umstellung auf das Diätfutter wurden die Tiere an Diättag 4 erneut vermessen. Obwohl die Tiere nicht augenscheinlich krank waren, erkannte man einen deutlichen Gewichtsverlust. Während die Kontroll-Tiere im Schnitt $6,9 \pm 1,4$ % KG abnahmen, verloren die Knockout-Tiere $20,3 \pm 0,7$ % KG, also fast dreimal so viel (p-Wert: 0,0001). Da ein Gewichtsverlust von mehr als 15 % KG als Abbruchkriterium festgesetzt wurde, wurde der Versuch vorzeitig abgebrochen. Von einer weiteren Blutabnahme nach Ende des Versuchs wie bei den anderen Diäten wurde aufgrund der schlechten Verfassung der Knockout-Mäuse abgesehen.

Vor Abbruch des Versuchs wurde bei den Tieren einmal Spoturin gesammelt. Diese Proben wurden vermessen und konnten zumindest mit dem Kontrolltag (Tag 0) verglichen werden (Abbildung 33).

Vor allem war erkennbar, dass die Fähigkeit, Kalium zu resorbieren, unter der Niedrig-Kalium-Diät bei den Knockout-Tieren eingeschränkt war. Obwohl sie zu Kontrollbedingungen ähnlich viel Kalium ausschieden wie die Kontroll-Tiere (Kontrolle: $77,9 \pm 4,5$ mM/mM Kreatinin, Knockout: $68,0 \pm 9,8$ mM/mM Kreatinin), lag die Kalium-Konzentration an Diättag 4 mit $10,0 \pm 10,3$ mM/mM Kreatinin signifikant höher als die der Kontrollen ($3,6 \pm 0,2$ mM/mM Kreatinin).

Weiterhin verhielt sich das Ausscheidungsprofil der Knockout-Tiere bezüglich der Urin-Elektrolyte entgegengesetzt zu dem der Kontroll-Mäuse. Während sich bei den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen die Natrium-Ausscheidung erhöhte und die Magnesium- und Calcium-Ausscheidung sank, veränderten sich die der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere in umgekehrter Weise.

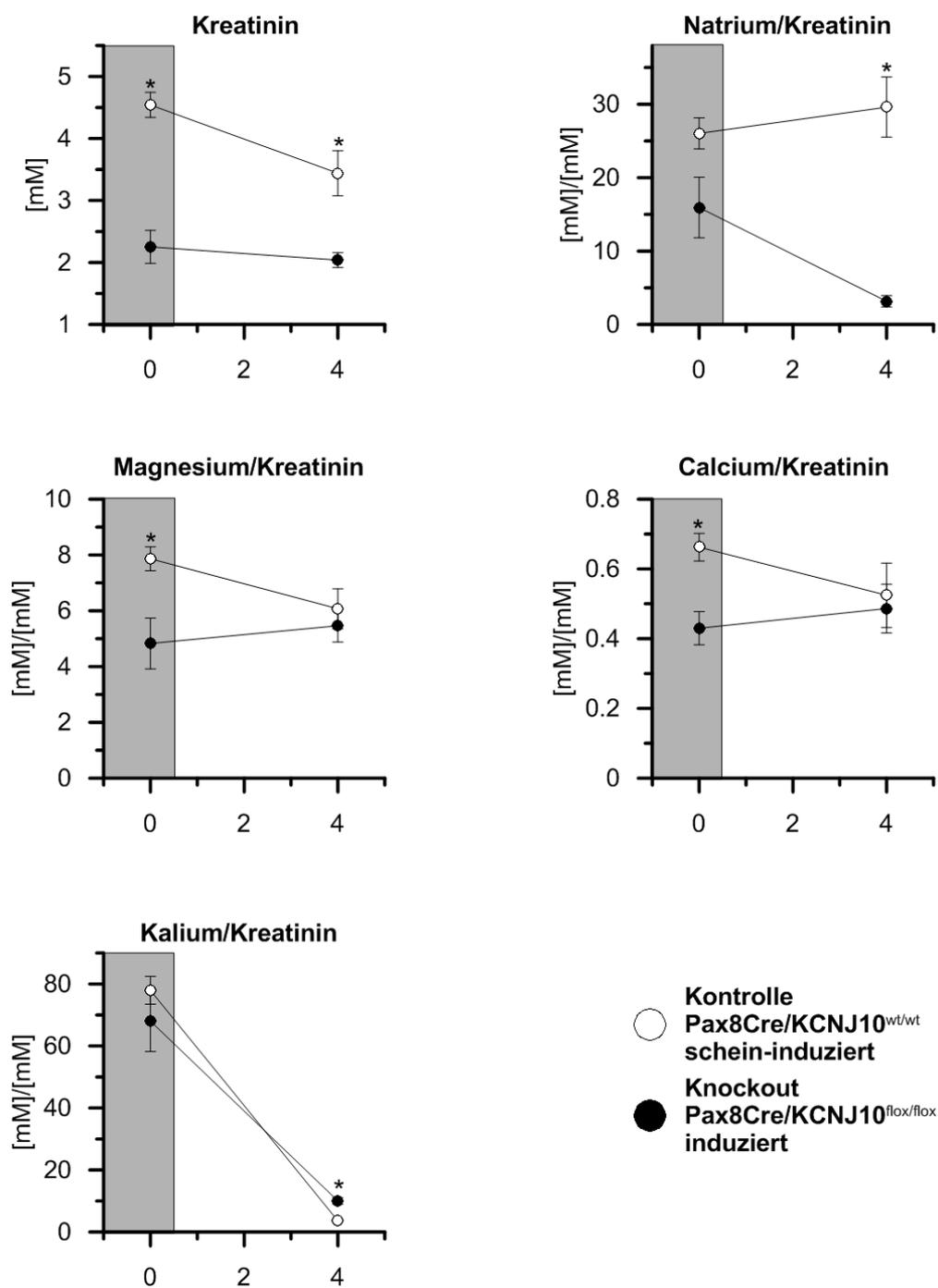


Abbildung 33 renale Elektrolyt-Ausscheidung vor (grau unterlegt) und während der Niedrig-Kalium-Diät von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (n=13) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{fllox/fllox}-Mäusen (n=5)

Die Diät musste bereits nach 4 Tagen abgebrochen werden, da die Knockout-Mäuse mehr als 20 % ihres Körpergewichts verloren hatten.

5 Diskussion

Nachdem die konventionelle KCNJ10-Knockout-Maus aufgrund der frühen Letalität als Modell zur Untersuchung der Nierenpathologie beim EAST-Syndrom ungeeignet war (58), war das Ziel dieser Arbeit, zuerst ein geeignetes nierenspezifisches und gegebenenfalls induzierbares Mausmodell zu finden. Anschließend sollte der Phänotyp dieses Mausmodells eingehend untersucht werden.

5.1 Wahl der KCNJ10-Knockout-Maus

Bei der Entscheidung für eine Cre-Maus für das Cre/loxP-System standen zwei verschiedene Mausmodelle zur Verfügung. Die Unterschiede bestanden zum einen darin, dass die Promotoren, hinter die das Cre-Rekombinase Gen geschaltet wurde, unterschiedlich waren (Ksp-Cadherin bzw. Pax8). Zum zweiten wäre das eine System (Ksp-Cadherin) ab dem Zeitpunkt aktiv, ab dem der Promotor unter natürlichen Bedingungen aktiv sein würde, während beim anderen System (Pax8) in Kombination mit dem Tet-On-System erst die Gabe eines Tetracyclin-Derivats zur Deletion des KCNJ10-Gens führen sollte.

5.1.1 Das KspCre-Mausmodell

Zuerst wurde das nicht-induzierbare System (KspCre) untersucht. Dieses Mausmodell war einfacher zu handhaben, weil es keine Behandlung der Tiere mit Tetracyclin voraussetzt. Außerdem würde ein Knockout, der bereits früh in der Entwicklung einsetzt, besser zum Krankheitsbild der EAST-Patienten passen, da das autosomal rezessiv vererbte Syndrom bereits im Kleinkindalter zu ersten Symptomen führt.

Das nierenspezifische Cre/loxP-System unter dem Ksp-Cadherin-Promotor wurde von Igarashi et al. generiert. Sie beschrieben die Expression von Reporter-Genen unter dem Ksp-Cadherin-Promotor als vergleichbar mit der Expression von Ksp-Cadherin (69). Dementsprechend schilderten sie dessen Lokalisation in allen Epithelzellen des Nephrons, außer in einigen Zellen von Verbindungsstück und Sammelrohr. Weiterhin beschrieben sie, dass keine Expression in Glomeruli, Blutgefäßen und interstitiellen Zellen der Niere zu sehen war. In einer vorherigen Publikation untersuchten sie einen anderen 5'-flankierenden Abschnitt des Ksp-Cadherin-Gens als Promoter (90). Obwohl sich bei diesem die Sequenz nur um einige Basen vom bisherigen Promoter unterschied, führte er zu einer ausschließlichen Expression im Sammelrohr. Der genaue Abschnitt und die Größe der 5'-flankierenden Sequenz des Ksp-Cadherin-Gens, die als Promotor-Sequenz verwendet wurde, hatte also einen großen Einfluss auf den Expressionsort in der Niere.

Auch bei der KspCre-Maus, die sie 2002 generierten, erkannten sie ein unvollständiges Expressionsschema (70). So beschrieben sie eine Effizienz von über 80 % im Sammelrohr und von weniger als 5 % im proximalen Tubulus. Über den distalen Tubulus und das Verbindungsstück trafen sie keine Aussagen, wobei man auf mehreren Färbungen keine einheitliche, sondern eine mosaikartige Expression des nachgeschalteten Reporter-Gens erkennt.

Die für diese Arbeit angefertigten Nierenfärbungen mit der KspCre-Maus zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Bei den Immunfluoreszenz-Aufnahmen der KspCre/Tomato-EGFP-Maus erkennt man, dass die Cre-Rekombinase nicht in der kompletten Niere aktiv war (Abbildung 13, Seite 46). Ferner sieht man bei den Bildern der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus noch eine deutliche KCNJ10-Expression (Abbildung 12, Seite 45).

Die Nierenfunktionsstörung, welche bei den EAST-Patienten und den konventionellen KCNJ10-Knockout-Mäusen zu starken Veränderungen in der renalen Elektrolytausscheidung führt, war bei den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen nicht zu erkennen. Sie zeigten weder in ihrer Gewichtsentwicklung bis zum 35. Lebenstag noch bei der renalen Elektrolytausscheidung relevant veränderte Werte. Allein die mRNA-Expression von KCNJ10 war bei den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen im Vergleich zu den KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren stark verringert (23 % KCNJ10-mRNA-Expression, Abbildung 14, Seite 47). Dies schien jedoch keine tiefgreifenden Auswirkungen auf die Nierenfunktion zu haben. Die Tiere zeigten in keiner Weise eine Ähnlichkeit mit den renalen Symptomen der EAST-Patienten oder der konventionellen Knockout-Mäuse, was darauf schließen lässt, dass bei den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen die Restexpression von KCNJ10 noch immer ausreichend war, um die erwartete Salzverlust-Tubulopathie zu kompensieren.

Eine Erklärung für die ungenügende Deletionsleistung dieses Cre/loxP-Systems wäre, dass es Unterschiede in der Cre-Aktivität oder in der Zugänglichkeit des Enzyms zum Chromatin gab. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der verwendete Ksp-Promotor im distalen Nephron unvollständig und nur mosaikartig in vereinzelt Zellen aktiv war, dass aber gerade dort der Funktionsverlust von KCNJ10 für die Entstehung der Symptome entscheidend ist. Dementsprechend wäre die Expression des KCNJ10-Kanals in diesen vereinzelt positiven Zellen zur Kompensation des Systems ausreichend gewesen. Die Ergebnisse zeigten auf, dass das KspCre-System in der Maus als Modell für die menschliche EAST-Erkrankung nicht geeignet ist.

5.1.2 Das induzierbare Pax8-Mausmodell

Als alternatives Mausmodell zur KspCre-Maus wurde das induzierbare Pax8-System getestet. Hier ist dem Pax8-Promotor eine rtTA-Sequenz nachgeschaltet, die für das entsprechende rtTA-Protein kodiert. Im nicht-induzierten System kann dieses nicht an ein TRE-Element binden. In Anwesenheit eines Tetracyclin-Derivats bindet jedoch das Antibiotikum das rtTA-Protein, was zu dessen Konformationsänderung führt und es das TRE-Element binden kann. Erst dadurch kann die Cre-Rekombinase exprimiert und KCNJ10 über die loxP-Stellen deletiert werden (ausführlich beschrieben auf Seite 15, 1.6.2 Das Tet-On-System). Solche induzierbaren Systeme sind vor allem dann sinnvoll, wenn das Ausschalten eines Gens zu embryonal-letalen Phänotypen führt oder die Jungtiere sterben, bevor die Organe und Gewebe voll entwickelt sind. Bei der konventionellen KCNJ10-Knockout-Maus gingen Kofuji et al. davon aus, dass die Tiere aufgrund des gravierenden Hirn-Phänotyps innerhalb der ersten Woche sterben (83). Es wäre jedoch ebenso vorstellbar, dass der renale Phänotyp ein normales Heranwachsen der Tiere unmöglich macht. Als alternativer Promotor zu Ksp-Cadherin erschien daher ein weiterer Versuchsansatz mit dem induzierbaren Pax8-System sinnvoll.

5.1.2.1 Einfluss der Transgene auf die Entwicklung von nicht-induzierten Pax8Cre-Mäusen

Zuerst sollte festgestellt werden, ob nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- und Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse vergleichbar heranwachsen (Abbildung 15, Seite 48). Die Gruppen zeigten untereinander während der Entwicklung keine Unterschiede im Gewicht und der renalen Elektrolyt-Ausscheidung, was darauf schließen lässt, dass die ins Genom eingefügten Transgene keine negativen Einflüsse auf das Gedeihen der Tiere hatten.

5.1.2.2 Histologische Untersuchung des Pax8Cre-Mausmodells

Ebenso wie die KspCre-Mäuse wurden die induzierbaren Pax8Cre-Tiere mit der Reporter-Mauslinie Tomato-EGFP gekreuzt. Bereits auf den Fluoreszenzaufnahmen ist gut erkennbar, dass das System sehr genau reguliert ist (Abbildung 17, Seite 50). Ohne Doxycyclin-Gabe ist nur Tomato-Fluoreszenz detektierbar. Das lässt darauf schließen, dass die Cre-Rekombinase unter diesen Umständen in der Niere nicht aktiv ist. Nach Induktion mit Doxycyclin ist die EGFP-Fluoreszenz in so gut wie allen Zellen des Tubulussystems gut erkennbar. Das entspricht der in der Literatur beschriebenen Pax8-Aktivität in der Niere (84). Glomeruli, Blutgefäße und interstitielle Zellen waren von der Cre-Expression ausgenommen und fluoreszierten rot. Gelegentlich waren auch einzelne Tubuluszellen im Nephron nicht induziert worden.

Wahrscheinlich war bei diesen Zellen das Pax8-System durch somatische Mutation verändert oder die Chromatinstruktur nicht für eine Deletion durch das Enzym zugänglich (91). Der letztere Effekt, welcher Positionseffekt-Variegation (PEV) genannt wird, wird auch von Igarashi et al. diskutiert (90). Er könnte erklären, dass nach der Integration von einem oder mehr nacheinander geschalteter Transgene in der Nähe von Heterochromatin die Stilllegung eben dieses Transgens kontrolliert wurde. Da diese epigenetische Regulation über z.B. Methylierung oder Packung des Chromatins in verschiedenen Zelltypen variiert, könnte es einen Teil der Unterschiede in der Cre-Rekombinase-Aktivität erklären.

Übersichtsaufnahmen von Nierenschnitten einer induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus zeigen im Vergleich zu einem Nierenschnitt einer schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Maus eine deutlich geringere KCNJ10-Protein-Expression (Abbildung 16, Seite 49). Während bei der Kontroll-Maus im Nierenkortex deutlich eine Coexpression von KCNJ10 mit Calbindin und auch teilweise mit AQP2 zu erkennen ist, lässt die Immunfluoreszenz der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mausniere darauf schließen, dass die Effizienz der Cre-regulierten Rekombination in so gut wie allen Tubuluszellen des DCT und CNT sehr groß war und demnach eine Expression von KCNJ10 dort nicht mehr möglich war.

5.1.2.3 KCNJ10-mRNA-Expression von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

Sämtliche Pax8Cre-Mäuse, die in Versuche gingen, wurden vorab auf alle Transgene genotypisiert, und nach Versuchsende wurde aus einer nicht-perfundierten Niere die Restexpression von KCNJ10 mittels Realtime PCR ermittelt. Die durchschnittliche Expression von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren lag mit 16 % niedriger als die der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere (23 %) (Abbildung 14, Seite 47 und Abbildung 18, Seite 52). Dennoch gab es auch einige induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse, die nicht auf die Doxycyclin-Behandlung reagiert haben (sog. "Non-Responder"). Es ist unwahrscheinlich, dass diese Tiere nicht ausreichend Doxycyclin bekamen, da in der Phase der Knockout-Induktion ausschließlich das Doxycyclin-Wasser gegeben wurde und die Non-Responder zusammen mit Respondern in einem Käfig saßen. In der 3-wöchigen Induktionsphase hätte vermutlich auch ein nur einfach vorkommendes Transgen ausreichend aktiviert werden müssen, um die Deletion zu erreichen.

5.1.2.4 Analyse des Spontanurins

Beim Vergleich des Spoturins von Kontroll-Tieren (nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}- oder schein-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse) sind deutliche Unterschiede zu den Knockout-Mäusen (induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse) zu erkennen (Abbildung 19, Seite 54 und Abbildung 20, Seite 56). Im Gegensatz zur KspCre-Linie ist hier also offenkundig ein renaler Phänotyp vorhanden.

5.1.2.5 Entscheidung für das induzierbare Pax8Cre-Mausmodell für die Analyse des renalen Phänotyps des EAST-Syndroms

Die Immunfluoreszenzfärbungen von Reporter- und Knockout-Mäusen wiesen zusammen mit der niedrigen KCNJ10-Restexpression und der sich deutlich unterscheidenden renalen Elektrolyt-Ausscheidung demzufolge darauf hin, dass die Pax8Cre-Mauslinie das geeignetere Modell zur Untersuchung des EAST-Syndroms ist. Generell wäre eine Restexpression von KCNJ10 in der Niere kein Ausschlusskriterium, da auch EAST-Patienten aufgrund der verschiedenen Mutationen im KCNJ10-Gen nicht unbedingt einen völligen Funktionsverlust des Kalium-Kanals haben (38). Zusammenfassend ist also zu sagen, dass der nierenspezifische Knockout bei den induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen erfolgreich war und im Vergleich zu den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen die deutlich bessere Wahl für weitergehende Untersuchungen des renalen EAST-Syndroms.

5.1.3 Wahl der Kontroll-Gruppe für die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere

Drei verschiedene Mausmodelle waren als Kontrollen für die induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse denkbar: nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-, schein-induzierte (schein-induziert bedeutet: mit Doxycyclin behandelt, aber ohne Effekt auf das KCNJ10-Gen) Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}- oder nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere. Um die Tierzahlen für weitere Experimente möglichst klein zu halten, sollte jedoch nur eine Kontrollgruppe für weitere Versuche gewählt werden.

Da die Anwesenheit des Transgens keinen Einfluss auf die Tiere hatte, waren nicht-induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse als Kontrollen überflüssig (Abbildung 15, Seite 48). Dann stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit Doxycyclin dauerhafte Folgen für die Tiere hatte. Deswegen wurden die Urin-Elektrolyte von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}- (Knockout) mit nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}- (Kontrolle 1) und schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (Kontrolle 2) verglichen (Abbildung 19, Seite 54). Obwohl nach der 3-wöchigen Doxycyclin-Phase eine mindestens 2-wöchige Auswasch-Phase folgte, schieden die induzierten Mäuse deutlich mehr Chlorid und Phosphat aus als die nicht-induzierten Tiere, was darauf schließen lässt, dass es sich um einen reinen Doxycyclin-Effekt handelt. Bezüglich Tetracyclin- bzw. Doxycyclin-induzierter Maus-Modelle wurden in der Literatur keine Hinweise auf derartige Veränderungen gefunden. Bereits 1958 wurde beobachtet, dass nach Tetracyclin-Gabe alle Gewebe, in die das Antibiotikum eindringen kann, unter UV-Licht fluoreszieren (92). Eine anhaltende Fluoreszenz in den Knochen und Zähnen ließ Milch et al. darauf schließen, dass sich

Tetracyclin die Knochen einlagert. Später wurde festgestellt, dass Tetracyclin über Calcium an den Phosphatsauerstoff des Apatit im Knochen bindet (93). Die fortdauernde Einlagerung von Doxycyclin in die Zähne wurde auch bei den induzierten Pax8Cre-Mäusen entdeckt, bei denen das Antibiotikum zu gelb-braunen Verfärbungen, den sogenannten "Tetracyclin-Zähnen" führte. Eine Begründung für die veränderte renale Elektrolyt-Ausscheidung nach der Doxycyclin-Behandlung der Mäuse gab es allerdings nicht. Es wäre jedoch möglich, dass im Zug der Osteolyse oder des Knochenumbaus Doxycyclin frei wird und den Phosphat-Stoffwechsel stört.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Vorhandensein des Pax8Cre-Konstrukts keinen Einfluss auf die Tiere hat, was die nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse als Kontrolle überflüssig macht. Die Induktion durch Doxycyclin dagegen hatte sehr wohl einen Einfluss auf die renale Elektrolyt-Ausscheidung. Daher wurden die nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tiere als mögliche Kontrollgruppe verworfen und stattdessen die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse verwendet.

5.2 Phänotypisierung der adulten KCNJ10-Knockout-Maus

Für die Phänotypisierung des renalen KCNJ10-Knockouts in adulten Mäusen wurde, wie gerade diskutiert, das induzierbare Cre/loxP-System unter dem Pax8-Promoter verwendet. EAST-Patienten leiden durch den Funktionsverlust des KCNJ10-Kalium-Kanals im DCT, CNT und frühen CCD an einem renalen Salzverlust, einer Aktivierung des RAS, einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose, einer Hypomagnesiämie und einer Hypocalciurie (43). Nachfolgend werden die Veränderungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen erörtert und mit den Symptomen der EAST-Patienten verglichen.

5.2.1 Vergleich der Urinalysen

Für die Betrachtung der renalen Elektrolyt-Ausscheidung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Auswertungsmethoden verwendet. Zum einen wurden Proben von Spontanurin untersucht und die gemessenen Konzentrationen der Urin-Elektrolyte auf die Kreatinin-Konzentration normalisiert (Abbildung 20, Seite 56). Zum anderen wurden die Tiere 6 Stunden im metabolischen Käfig gehalten und die absolute Stoffmenge in diesem Zeitraum ermittelt (Kontrollphase, Abbildung 28, Seite 64).

Eine Normalisierung der Elektrolyte auf die Kreatinin-Konzentration ist im Spontanurin notwendig, da die alleinige Betrachtung von Elektrolyt-Konzentrationen den Urinfluss bzw. die Menge an ausgeschiedenem Wasser nicht berücksichtigt. Deshalb wurden die Proben auf das relativ konstant produzierte und ausgeschiedene Kreatinin, ein harnpflichtiges Stoffwechselendprodukt des Muskelmetabolismus, normalisiert. Kreatinin wird fast ausschließlich renal eliminiert, ungehindert in den Primärharn filtriert und im Tubulus kaum resorbiert, allerdings bei Mäusen auch tubulär sezerniert. Seine Ausscheidung ist aber recht unabhängig vom distal tubulären Wasser- und Salztransport, und die Kreatinin-Konzentration ist daher ein Surrogatmarker für die Harnkonzentrierung. Diese Methode zur Vergleichbarkeit der renalen Elektrolyt-Ausscheidung zwischen verschiedenen Versuchstieren ist gängig und wird vor allem deshalb gerne verwendet, weil Kreatinin endogen produziert wird.

Durch die Haltung der Versuchstiere im Stoffwechsellkäfig konnte die über den Harn ausgeschiedene absolute Stoffmenge an Elektrolyten ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Kenntnis der Harnflussrate keine Normalisierung durchgeführt werden muss und Werte nicht durch Veränderungen der Kreatinin-Ausscheidung beeinflusst

werden können. Allerdings stellt der Stoffwechselläufig eine gravierende Stresssituation für das Tier dar und dies kann sich maßgeblich auf die Ausscheidungsdaten auswirken.

Beim Vergleich der beiden Auswertungen fällt auf, dass die Ergebnisse nicht vollständig übereinstimmen. Während die Resultate der normalisierten Spontanurine bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen auf eine renale Retention von Natrium und Kalium und einem Verlust von Ammonium hindeuten (Abbildung 19, Seite 54 und Abbildung 20, Seite 56), weisen die Ergebnisse der Urinalysen aus dem Stoffwechselläufig auf einen signifikanten Verlust von Magnesium und eine leichte Erhöhung der renalen Calcium- und Kalium-Ausscheidung (Abbildung 28, Seite 64) hin. Auch bei den Analysen der Niedrig-Salz-Diäten wurden Spontanurine ausgewertet. Während bei dem Kontrollwert zwischen den Versuchsgruppen vor der Niedrig-Natrium- und Niedrig-Magnesium-Diät keine Unterschiede in den Urin-Elektrolyten zu erkennen waren (Abbildung 30, Seite 68 und Abbildung 32, Seite 71), zeigten die Knockout-Tiere, die vor der Niedrig-Kalium-Diät untersucht wurden, eine verringerte Magnesium- und Calcium-Ausscheidung (Abbildung 33, Seite 73).

Bei der Diskussion dieser unterschiedlichen Ergebnisse sollte bedacht werden, dass bei den einzelnen Experimenten verschiedene Mäuse in unterschiedlichem Alter mit einem unterschiedlich großen Abstand zur Knockout-Induktion bzw. Doxycyclin-Behandlung verwendet wurden. Daher hatte die Knockout-Tiere unterschiedlich viel Zeit, den KCNJ10-Funktionsverlust zu kompensieren und waren vielleicht noch nicht oder nur zum Teil im Gleichgewicht zwischen Elektrolytaufnahme bzw. -ausscheidung. Dies ist sicher einer der Gründe, warum die Daten zwischen diesen voneinander unabhängigen Experimenten nicht miteinander verglichen werden dürfen.

Weiterhin ist nicht klar, inwieweit Kreatinin als Parameter für die Normierung verlässlich ist. Obwohl er lange Zeit als geeignet propagiert wurde, weisen viele neuere Untersuchungen darauf hin, dass er in vielen Fällen nur bedingt zur Normalisierung verwendet werden kann. Zum einen wird Kreatinin nicht in allen Individuen in vergleichbaren Mengen erzeugt. Die Produktion ist abhängig von Alter, Gewicht, Geschlecht und Rasse (94–96). Unterschiede werden nicht nur zwischen Individuen sichtbar sondern auch bei der Betrachtung eines Individuums von Tag zu Tag oder von Stunde zu Stunde (97, 98). Die Schwankungen in der Kreatinin-Produktion von gesunden Versuchspersonen variierten im Bereich von 10 - 14 % über einen Zeitraum von 24 Stunden (99). Weiterhin sollte bedacht werden, dass Kreatinin nicht nur in der Niere filtriert sondern auch aktiv in das Tubulus-Lumen sezerniert wird. Shemesh et al. schätzten, dass die Sekretionsrate von Kreatinin in einem gesunden Menschen etwa bei 10 - 20 % der täglich ausgeschiedenen Kreatinin-Menge liegt (100). Bei Mäusen und Ratten ist dieser Anteil höher. Während bei Ratten etwa 57 %

des Kreatinins in den Tubulus sezerniert wird, schwankt der Wert bei Mäusen zwischen 30 und 60 % (94, 101).

Ein wichtiger Faktor bei der Kreatinin-Sekretion ist auch die GFR. Shemesh et al. verglichen Patienten mit verschiedenen glomerulären Erkrankungen und stellten fest, dass es bei einer Erniedrigung der GFR zu einer Hypersekretion von Kreatinin kam (100). Weiterhin wurde festgestellt, dass es bei einer stetigen Veränderung der GFR ebenfalls zu dynamischen Änderungen der renalen Kreatinin-Ausscheidung kommt (102). Wird in solchen Situationen Kreatinin zur Normalisierung verwendet, führt es zu einer Unter- oder Überschätzung der Elektrolyt-Ausscheidung.

Bei dem Vergleich der renalen Elektrolyt-Ausscheidung von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen mit schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen müssen diese Befunde bedacht werden. Die Knockout-Tiere litten an einer Polyurie und Polydipsie, die sich durch eine erniedrigte Kreatinin-Konzentration im Urin bestätigte. Bei den Knockout-Tieren wurde zudem eine niedrigere glomeruläre Filtrationsleistung festgestellt (Abbildung 26, Seite 61). In diesem Fall ist die Menge an sezerniertem Kreatinin variabel und damit ist auch dessen Verwendung zur Normalisierung der Elektrolyte fraglich.

Die normierten Werte des Spontanurins sprechen dafür, dass die Knockout-Tiere Natrium retinieren. Dieser Befund ist allerdings fragwürdig, da die Tiere keine Hybernatriämie und keinen arteriellen Hypertonus aufwiesen. Wahrscheinlicher ist, dass Knockout-Mäuse aufgrund der geringeren GFR mehr Kreatinin in das Tubulus-Lumen sezernierten und deshalb bei der Normierung mit falsch hohen Kreatinin-Werten eine zu niedrige Elektrolyt-Ausscheidung berechnet wurde. Es ist außerdem denkbar, dass die Kreatinin-Messung bei den verdünnten Urinen der Knockout-Mäuse aus messtechnischen Gründen einen zu hohen Wert ergab. Für die Phänotypisierung der KCNJ10-Knockout-Maus wurden deshalb vor allem die Befunde aus den Urinalysen des Stoffwechselkäfigs verwendet, da hier absolute Werte (Stoffmenge/Zeit) berechnet werden konnten.

Aus der Auswertung der Urinproben kann man also folgern, dass die Tiere zum einen an einer Polyurie litten, da die Kreatinin-Konzentration im Spontanurin durchgehend erniedrigt war. Die Kreatinin-Stoffmenge, die im metabolischen Käfig über einen definierten Zeitraum ausgeschieden wurde, lag bei beiden Versuchsgruppen gleich, was bestätigt, dass Kreatinin bei beiden Gruppen konstant gebildet und ausgeschieden wurde. Dabei wird aber nicht berücksichtigt, ob Kreatinin filtriert oder sezerniert wurde. Weiterhin wurde bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen ein Hypermagnesiurie, und in der Tendenz eine erhöhte renale Ausscheidung von Calcium und Kalium diagnostiziert.

5.2.2 Der Natrium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

EAST-Patienten leiden an einer Salzverlust-Tubulopathie (43). Wie bereits in der Einleitung erklärt, kommt es bei den Patienten durch die eingeschränkte Funktion des KCNJ10 zu einem renalen Natriumchlorid-Verlust zur Aktivierung des RAS, um einem weiteren Salzverlust entgegen zu wirken. Durch Aldosteron wird zum einen die Natrium-Resorption im PT über den Natrium-Protonen-Exchanger (NHE3) und im CCD über den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) und die Na^+/K^+ -ATPase erhöht (103–107). Die erhöhte Natrium-Aufnahme über den NHE3 führt zum Verlust von Protonen, welcher sich bei den Patienten in einer metabolischen Alkalose äußert. Durch die verstärkte Natrium-Resorption über den ENaC im CCD kommt es zusätzlich zu einem Kalium-Verlust über BK- und ROMK-Kanäle.

Bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen kam es, im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen, zu keinem offensichtlichen Natrium-Verlust über die Niere (Abbildung 28, Seite 64). Falls zur Gegenregulation der verminderten Natrium-Resorption im DCT das RAS aktiviert wurde, würden die leicht erhöhte renale Kalium-Ausscheidung und metabolischen Alkalose mit dieser These konform gehen. Die durchgeführten Experimente können diese Theorie jedoch nicht unterstützen. Messungen der Aldosteron-Konzentration haben keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergeben (Abbildung 25, Seite 61). Man sollte jedoch bedenken, dass Blutabnahmen bei Mäusen immer mit Stress verbunden sind und daher die Messwerte oft stark schwanken. Geringe Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind so schwer auszumachen. Ebenso war die renale mRNA-Expression von Renin nicht erhöht (Abbildung 27, Seite 62). Auch diese Ergebnisse geben Hinweise auf ein nicht stimuliertes RAS. Ebenso gilt ein verminderter Blutdruck als stimulierender Einfluss auf die Aktivierung des RAS. Beim Vergleich der Versuchsgruppen wurden jedoch keine Unterschiede im Blutdruck entdeckt (Abbildung 24, Seite 60). Ein aktiviertes RAS führt auch zu einer vermehrten Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH), das wiederum für eine verstärkte Wasserresorption über das Aquaporin 2 (AQP2) im CCD sorgt. Die Knockout-Mäuse litten jedoch im Gegenteil an einer Polyurie und Dehydratation. Ebenso zeigten sie keine Unterschiede in der AQP2-mRNA-Expression (Abbildung 27, Seite 62).

Es scheint also, als ob das RAS bei der KCNJ10-Knockout-Maus im Gegensatz zu den EAST-Patienten nicht dauerhaft aktiviert ist. Ebenso könnte das RAS durch weitere, in diesem Phänotyp stärker wirkende Regulationsmechanismen inhibiert oder überlagert werden. Diese Theorie wird später genauer diskutiert.

Die induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus unter einer Niedrig-Natrium-Diät

Da die EAST-Patienten an einem renalen Salzverlust leiden, im Gegensatz dazu die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse aber einen ausgeglichenen Natriumchlorid-Haushalt aufwiesen, sollte der Mechanismus, der dieses Gleichgewicht hält, über eine zweiwöchige Niedrig-Natrium-Diät getestet werden.

In vielen Publikationen wurden die Anpassungen der Niere an eine Niedrig-Natrium-Diät genau erforscht. Neben veränderten Resorptionsvorgängen im Tubulus kann auch über eine hormonelle Regulation ein Natrium-Verlust verhindert werden. Bei einer geringen Natrium-Zufuhr über die Nahrung wird als eine erste regulatorische Maßnahme die renale Natrium-Ausscheidung verringert, um einen Natrium-Verlust über den Harn zu verhindern (108). Durch eine geringe Natriumchlorid-Konzentration in der Macula Densa wird das RAS aktiviert und führt zu einem erhöhten Aldosteron-Spiegel im Serum (108). Aldosteron wiederum steigert die Resorptionsmechanismen im PT, DCT und vor allem CCD (108, 109). Wie bereits geschildert, sind Natrium-Resorption und Kalium- bzw. Protonen-Sekretion im Nephron zumindest partiell gekoppelt, was durch einen renalen Verlust von Kalium und Protonen letztendlich zu einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose führt (110, 111). Ebenso wie bei einem aktivierten RAS erhöht sich bei auch bei direkter Aldosteron-Gabe die Exkretion von Magnesium und Kalium in gleicher Weise (112). Die genaue Steuerung dieser Magnesium-Ausscheidung durch Aldosteron ist jedoch unklar.

In beiden Versuchsgruppen wurde die schnelle und drastische Erniedrigung der renalen Natrium-Ausscheidung beobachtet (Abbildung 30, Seite 68). Ein gewisser Natrium-Verlust konnte dadurch jedoch nicht verhindert werden, worauf die bei der Blutuntersuchung nach der Diät bei beiden Versuchsgruppen festgestellte vergleichbar starke Hyponatriämie hinwies (Abbildung 29, Seite 67). Weiterhin litten beide Versuchsgruppen an einer Alkalose und einer Hypokaliämie. Interessanterweise reduzierten die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse die renale Kalium-Ausscheidung bereits zu Beginn der Diät, während die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse die Exkretion erst zum Ende der 14-Tage Phase erniedrigten. Die Knockout-Mäuse hatten zudem eine stärkere Alkalose als die Kontroll-Tiere.

Abschließend sollen die Ergebnisse der Niedrig-Natrium-Diät noch einmal zusammengefasst werden. Obwohl es zwischen den Knockout- und den Kontroll-Mäusen bei der Standard-Diät keine Unterschiede bezüglich des Natrium-Haushaltes gab und auch bei der renalen regulatorischen Anpassung an die Niedrig-Natrium-Diät eine vergleichbar starke Natrium-Resorption erreicht wurde, kompensierten die Versuchsgruppen in der Diät-Phase auf unterschiedliche Art und Weise einen möglichen Natrium-Verlust. Die Kontroll-Tiere versuchten

einen renalen Natrium-Verlust über eine Aktivierung des RAS zu vermeiden. Die Knockout-Tiere, die schon einen Salz-Verlust durch die mangelnde DCT-Resorptionsfähigkeit kompensieren mussten, wiesen dagegen eine verminderte Fähigkeit auf, die reduzierte diätetische Natrium-Aufnahme zu kompensieren.

5.2.3 Der Calcium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

Behandlungen mit Medikamenten oder Mutationen, die zu einer eingeschränkten NCC-Aktivität führen, resultieren normalerweise in einer Hypocalciurie. Sowohl Gitelman- als auch EAST-Patienten leiden an diesen Symptomen, ebenso $NCC^{-/-}$ -Mäuse und chronisch mit Thiaziden behandelte Tiere (43, 113, 114). Die eingeschränkte DCT-Resorptionsleistung führt zur verminderten Calcium-Resorption in diesem Tubulus-Abschnitt. Allerdings kommt es zu einer Hyperresorption in einem oder mehreren anderen Nephron-Segmenten und es wird so am Ende mehr Calcium zurückgehalten (Hypocalciurie). Dennoch konnten bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen keine Unterschiede im Calcium-Haushalt festgestellt werden (Abbildung 28, Seite 64).

Bisher wurde noch nicht eindeutig geklärt, wie die Patienten und auch die $NCC^{-/-}$ -Mäuse diesen renalen Calcium-Verlust kompensieren und sogar umkehren können (115). Es wird vermutet, dass sich über eine hormongesteuerte Regulation die Calcium-Resorption im PT erhöht. Dabei würde nach einer initialen Natriurese durch die eingeschränkte Resorptionsleistung im DCT eine primäre, Aldosteron-induzierte Natrium-Resorption und eine sekundäre, passive, gesteigerte Calcium-Resorption folgen (116). Leider ist an dieser Stelle nicht bekannt, warum die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse keine Hypocalciurie aufwiesen. Möglicherweise benötigt die Ausbildung der Hypocalciurie mehr Zeit.

5.2.4 Der Magnesium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

Der Magnesium-Haushalt wird vor allem über intestinale und renale Resorption reguliert (117). Wenn die Magnesium-Konzentration im Blut aufgrund der diätischen Aufnahme schwankt, spielen aber weder das zelluläre noch das im Knochen gespeicherte Magnesium eine bedeutende Rolle bei der Kompensation. In der Niere wird im PT und der TAL der größte Anteil des filtrierten Magnesiums (70 - 90 %) resorbiert. Die restlichen 5 - 10 % werden im DCT transzellulär zurückgewonnen (10, 118). Die genaue Regulation, die beteiligten Hormone und viele der

Transport-Proteine, die an der Resorption beteiligt sind, sind noch nicht bekannt und Gegenstand der Forschung. Da der DCT der letzte Tubulus-Abschnitt des Nephrons ist, in dem eine nennenswerte Magnesium-Resorption stattfindet, und sie vor allem hier durch transzelluläre Resorption erfolgt, kann ein Defekt in der DCT-Resorption nur schwer ausgeglichen werden.

Ebenso wie bei EAST-Patienten litten auch die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse an einem Verlust von Magnesium über den Urin (Abbildung 28, Seite 64). Beim Patienten wird die Hypomagnesiämie erst im späteren Verlauf der Erkrankung festgestellt, wenn der Elektrolyt-Haushalt bereits tiefgreifend gestört ist und seit längerem eine Hypermagnesiurie vorlag. Da die Knockout-Tiere bereits an einem renalen Magnesium-Verlust litten, liegt die Vermutung nahe, dass in der Folgezeit der Erkrankung auch eine Hypomagnesiämie auftreten würde.

Die induzierte Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus unter einer Niedrig-Magnesium-Diät

Durch eine zweiwöchige Niedrig-Magnesium-Diät wurde getestet, inwieweit die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse mit einer deutlich geringeren Magnesium-Aufnahme über die Nahrung zurecht kommen würden.

Es ist bekannt, dass die renale Resorption von Magnesium bei einem Magnesium-Mangel sehr schnell angepasst wird (119). Shafik et al. fanden bei Experimenten an Ratten heraus, dass nach etwa 5 Stunden Restriktion die Magnesium-Ausscheidung über den Urin signifikant verringert wurde, während die Konzentration im Plasma erst nach 20 Stunden nicht mehr konstant gehalten werden konnte und ebenfalls absank (118). Es wird vermutet, dass eine erhöhte Magnesium-Resorption im DCT eine wichtige Rolle bei der Kompensation des Magnesium-Mangels spielt, da bei einer Niedrig-Magnesium-Diät der apikal im DCT lokalisierte TRPM6 stärker exprimiert wird (120). In vielen Publikationen wurde ebenso eine Calcium-Konservierung durch ein Absinken der renalen Calcium-Ausscheidung beschrieben, jedoch keine Veränderung der Calcium-Konzentration im Serum (118, 120). Der Grund für die vergleichbar reduzierte renale Magnesium- und Calcium-Ausscheidung liegt an der parazellulären Resorption beider Kationen in der Henle-Schleife, was dort zu einer Kopplung im Transport führt. Dadurch kommt es zum kompetitiven Transport und bei einer erhöhten Magnesium-Resorption wird demnach auch vermehrt Calcium resorbiert (121–123). In Ratten senkte sich kurz nach Beginn einer Niedrig-Magnesium-Diät die renale Kalium-Ausscheidung und begleitend auch die Plasma-Konzentration von Kalium (118). Eine Verbindung von renalem Magnesium- und Kalium-Haushalt wurde bereits öfter beobachtet, wobei der Mechanismus oder die Regulation unbekannt blieben (124, 125).

Wie zu erwarten war, sanken sowohl bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen als auch den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen die Magnesium-Konzentrationen in Blut und Urin drastisch nach Beginn der Diät (Abbildung 31, Seite 69 und Abbildung 32, Seite 71). Ebenso sank bei beiden Versuchsgruppen auch die renale Calcium-Ausscheidung aufgrund der erhöhten, gekoppelten Resorption von Magnesium und Calcium in der Henle-Schleife. Bei der Betrachtung des Serums fällt jedoch auf, dass nur die Kontroll-Mäuse durch die Diät an einer Hypocalciämie litten. Das Serum-Calcium der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse sank hingegen nicht. Bei beiden Versuchsgruppen veränderte sich die renale Kalium-Ausscheidung wenig, die Tiere wiesen am Ende der Diät jedoch ein hypokaliämische metabolische Alkalose auf. Die Diät führte weiterhin bei beiden Versuchsgruppen zu einer Reduktion der Kreatinin-Konzentration im Urin, was auf eine verstärkte Diurese hindeutet. Derartige Befunde wurden auch schon vorher beschrieben (126). Wittner et al. vermuteten aufgrund der erhöhten Urinmenge, dass entweder die niedrige Magnesium-Konzentration im Primärfiltrat einen Einfluss auf die Natriumchlorid-Resorption in der TAL hat oder der Effekt der Hypomagnesiämie die Wasser-Resorption im distalen Nephron beeinflusst.

Als wichtigstes Ergebnis der Niedrig-Magnesium-Diät konnte demnach ermittelt werden, dass beide Versuchsgruppen mit der reduzierten Magnesium-Aufnahme über die Nahrung ähnlich gut umgingen. Beide reduzierten die renale Magnesium-Ausscheidung, wiesen aber dennoch am Ende der Diät eine Hypomagnesiämie und eine hypokaliämische metabolische Alkalose auf.

5.2.5 Störungen im Säure-Basen-Haushalt führten zu einer metabolischen Alkalose bei der KCNJ10-Knockout-Maus

EAST-Patienten leiden an einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose. Wie bereits geschildert, ist die Natrium-Resorption im Sammelrohr an eine Sekretion von Wasserstoff und Kalium gekoppelt. Wird eine gesteigerte Natrium-Aufnahme in diesen Tubulus-Segmenten nötig, wird demnach auch vermehrt Wasserstoff und Kalium sezerniert und über den Harn ausgeschieden, was schlussendlich zu einer metabolischen Alkalose mit Hypokaliämie in den EAST-Patienten führt.

Bei der Betrachtung der Plasmawerte fiel auf, dass die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse ebenso wie die EAST-Patienten an einer metabolischen Alkalose litten (Abbildung 23, Seite 59). Ein basischer pH-Wert lag nur tendenziell vor, da die Tiere sich vermutlich in einem kompensierten Stadium befanden. Dennoch konnte aus den anderen Ergebnissen der Blutgasanalyse auf eine metabolische Alkalose geschlossen werden.

Ein Indiz dafür war zum einen das erhöhte Bikarbonat im Blut. Eine metabolische Alkalose wird durch einen Mangel an Säuren im Blut verursacht, wobei die hier vorliegende Subtraktionsalkalose durch einen Verlust von Säureäquivalenten und Protonen entstand. Durch die erhöhte Natrium-Resorption im CCD über den ENaC kam es als Ausgleich zu einer erhöhten Protonen-Sekretion über den Urin. Ein weiterer Hinweis auf die metabolische Alkalose lieferte der positive Basenüberschuss im Blut (127). Eine Basenabweichung von mehr als + 2 mmol/l deutet auf eine metabolische Alkalose hin. Dieser Wert wird aus dem pH und pCO₂, der Konzentration des Hämoglobins und der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins berechnet, wodurch auch auf die Untersuchung einer arteriellen Blutprobe verzichtet werden kann. Bei einem ausgeglichenen metabolischen Säure-Basen-Verhältnis im Körper liegt dieser Wert bei 0 mmol/l. Respiratorische Störungen des Säure-Basen-Haushalts haben hingegen keinen Einfluss auf den Basenüberschuss. Beide Versuchsgruppen zeigten einen stark negativen Basenüberschuss. Der Grund dafür lag wahrscheinlich an der Art der Blutabnahme über den submandibulären Venenplexus. Dennoch hatten die Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren deutlich mehr Pufferbasen ($\Delta + 4,0$ mmol/l) im Sinne einer metabolischen Alkalose.

5.2.6 Der Kalium-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

Durch die erhöhte Kalium-Sekretion über BK- und ROMK-Kanäle im Sammelrohr leiden EAST-Patienten an einer Hypokaliämie, die, wie gerade beschrieben, zusätzlich von einer metabolischen Alkalose begleitet wird. Bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen wurde nur in der Tendenz eine erhöhte Kalium-Ausscheidung über den Urin, jedoch keine verringerte Kalium-Konzentration im Blut festgestellt. Vermutlich verfügten die Tiere entweder über einen Kompensations-Mechanismus, der einen signifikanten Kalium-Verlust verhindert, oder die Hypokaliämie wäre erst im späteren Verlauf der Erkrankung auftreten.

Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse unter einer Niedrig-Kalium-Diät

Um bessere Einsicht in die Regulation des Kalium-Haushalts bei induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen zu bekommen, wurden die Versuchstiere auf eine Niedrig-Kalium-Diät gesetzt. Allerdings musste der Versuch aber bereits nach 4 Tagen abgebrochen werden, da die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse mehr als 20 % ihres Körpergewichts abgenommen hatten und diese Gewichtsreduktion als lebensbedrohlich eingestuft wurde. Demnach konnte nach Abbruch der

Diät auch keine Blutabnahme durchgeführt werden. Für die Auswertung des Versuchs konnten schlussendlich also nur die Urinalysen verwendet werden.

Eine reduzierte Kalium-Aufnahme über die Nahrung führt im Allgemeinen zu einer erhöhten renalen Kalium-Resorption (128–130). Dafür wird im Sammelrohr die Transkription der apikalen H^+/K^+ -ATPase gesteigert (131, 132). Da dort aber die renale Natrium-Resorption mit der Kalium-Sekretion gekoppelt ist, wird, um einen Kalium-Verlust zu verhindern, ebenso der ENaC inhibiert, was zu einer erhöhten Natrium-Exkretion führt (133). Es wurde gezeigt, dass eine geringe Kalium-Aufnahme das RAS aktiviert und so ROMK- und BK-Kanäle im CCD gehemmt werden können (134, 135). Das aktivierte RAS führt zu einer vermehrten ADH-Freisetzung, was das Trinkverhalten im Hypothalamus reguliert. Es ist bekannt, dass eine Niedrig-Kalium-Diät zu einer erhöhten Wasseraufnahme und Diurese führt, ebenso zu einer verringerten Urin-Osmolalität (136).

Die schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäuse reduzierten bei der Niedrig-Kalium-Diät die renale Kalium-Ausscheidung und erhöhten die Natrium-Ausscheidung (Abbildung 33, Seite 73). Außerdem veränderten sie ebenfalls ihr Trinkverhalten indem sie mehr Wasser aufnahmen. Darauf deutete die erniedrigte Kreatinin-Konzentration im Urin hin.

Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse hingegen hatten bereits bei der Standard-Diät eine leicht erhöhte Kalium-Exkretion, vermutlich aufgrund einer kompensatorisch erhöhten Natrium-Resorption im Sammelrohr. Die Tiere befanden sich also in der schwierigen Lage neben einer Hypernatriurie zusätzlich die durch die Nahrung reduzierte Kalium-Aufnahme ausgleichen zu müssen. Während der Diätphase reduzierten sie zwar die renale Kalium-Ausscheidung, aber nicht im selben Maße wie die Kontroll-Tiere. Man kann also davon ausgehen, dass der Kompensationsmechanismus, der bei der Standard-Diät einen Salzverlust gut verhindern kann, bei einer geringen Kalium-Aufnahme nicht mehr ausreicht. Die Tatsache, dass die Tiere bereits nach 4 Tagen lebensbedrohlich viel Gewicht verloren hatten, unterstützt diese These.

5.2.7 Verringerung der glomerulären Filtrationsrate bei der nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet das Gesamtvolumen des Primärharns, das von allen Glomeruli beider Nieren zusammen in einer definierten Zeiteinheit gefiltert wird. Sie ist eine allgemein akzeptierte Größe, um die Nierenfunktion abzuschätzen, sowohl in der klinischen Medizin als auch in Tiermodellen. In den letzten Jahren hat sich das Fructose-Polysaccharid Inulin für die Bestimmung der Clearance als Goldstandard etabliert (137, 138). Ein weiterer Vorteil für die Verwendung von Inulin ist die anhaltend konstante, freie glomeruläre Filtration auch bei einer

eingeschränkter Nierenfunktion (100). Für die GFR-Messung wurde deshalb das Inulin-ähnliche Sinistrin verwendet (137, 138).

Die Regulation der GFR erfolgt unter anderem über das tubuloglomeruläre Feedback (TGF) (139). Seit einigen Jahren wird als Gegenspieler des TGF das CTGF (connecting tubule glomerular feedback) vor allem von einer Arbeitsgruppe diskutiert (140). Über den TGF wird bei jedem einzelnen Nephron die GFR an die Salz-Konzentration im Tubulus angepasst. Bei einer hohen GFR überschreitet die Menge des Natriumchlorids im Primärharn die Resorptionsfähigkeit des proximalen Tubulus. Diese distal erhöhte Salz-Konzentration wird von NKCC2-Symportern an der Macula Densa registriert und das TGF vermittelt eine Kontraktion der glatten Muskulatur im Vas afferens und erniedrigt die GFR. Dadurch nimmt der Harnfluss in der Henle-Schleife ab, es bleibt mehr Zeit für die Rückresorption von Elektrolyten und die Ionenkonzentration in distalen Tubulus-Abschnitten nimmt wieder ab. Bei hypoosmolarem Harn stellt sich der gegenteilige Effekt ein. Regulatorische Faktoren des TGF sind z.B. Stickstoffmonoxid, Cyclooxygenase-2-Produkte (COX-2), Adenosin, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Angiotensin II (141–144).

Interessanterweise können aber sowohl Mäuse als auch Menschen mit einer eingeschränkten Resorptionsleistung in distalen Nephron-Abschnitten einen Salzverlust relativ gut kompensieren. Die Regulation dieser späten Segmente soll der oben erwähnte CTGF übernehmen. Es ist bekannt, dass die CNT mancher Nephrone Kontakt zum Gefäßpol aufnehmen und mit den afferenten Arteriolen über eine variierende Länge in Verbindung stehen (145–147). 2007 stellten Ren et al. fest, dass es bei einer Erhöhung der tubulären Natriumchlorid-Konzentration im CNT zu einer Dilatation der afferenten Arteriole kam (140). Die Regulation des CTGF wird dabei durch eine vermehrte Natrium-Resorption über ENaC im CNT stimuliert. Das CTGF ist demnach ein Mechanismus, über den eine erhöhte Natrium-Resorption im Verbindungsstück eine vasodilatierende Wirkung auf das Vas afferens haben soll.

Im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen hatten die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse nur noch eine 70 %-ige glomeruläre Filtrationsrate (Abbildung 26, Seite 61). Möglicherweise trägt eine eingeschränkte Natrium-Resorption im Verbindungsstück über den CTGF-Mechanismus zu der erniedrigten Filtrationsrate bei.

2004 beobachteten Loffing et al. auch in NCC^{-/-}-Mäusen eine erniedrigte GFR (auch etwa 70 % der Kontroll-Tiere) bei normalem arteriellen Blutdruck (115). Ebenso sinkt die GFR als Antwort auf die Gabe von Chlorothiazid (148, 149). Das Fehlen von NCC bzw. der Behandlung mit einem NCC-hemmenden Diuretikum haben demnach die gleiche Wirkung auf die GFR wie der KCNJ10-Knockout in der Maus. TRPV5^{-/-}-Mäuse im Gegensatz dazu haben keine erniedrigte GFR, da

es durch den Knockout vom Calcium-Kanal TRPV5 im DCT nicht zu einer verringerten Natrium-Resorption kommt (150).

Im Vergleich zu den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen haben die EAST-Patienten keine erniedrigte GFR. Ebenso zeigen Gitelman-Patienten keine Einschränkung der Filtrationsrate. Es wäre daher möglich, dass die Patienten über einen anderen Mechanismus verfügen, den Salz- und Wasserverlust zu kompensieren als die Mäuse. Möglicherweise trägt die Erhöhung der Salzaufnahme über die Nahrung dazu bei.

5.2.8 Der Wasser-Haushalt bei der adulten nierenspezifischen KCNJ10-Knockout-Maus

Ein weiteres, ausgeprägtes Merkmal bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Tieren war eine starke Polyurie und eine Dehydratation. Auffallend bei den Knockout-Mäusen war neben der hohen Urinmenge im Stoffwechsellkäfig (Abbildung 28, Seite 64) auch die fast dreifach erhöhte Trinkmenge (Abbildung 22, Seite 57) der Knockout-Tiere im Vergleich zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Tieren. Neben einer Polyurie lag also auch eine Polydipsie vor. Passend zu diesen Daten wurde bei den Tieren ebenfalls eine erniedrigte Urin-Kreatinin-Konzentration (Abbildung 20, Seite 56) und Urin-Osmolalität (Abbildung 21, Seite 57) gemessen. Der Harn war also stark verdünnt. Dass neben der Polyurie auch eine Dehydratation vorlag, ließ sich aufgrund des im Blut gemessenen, niedrigen Hämatokrits (Abbildung 23, Seite 59) schließen.

Die Wasser-Homöostase wird durch ein komplex kontrolliertes System aus Wasseraufnahme, renaler Perfusion, glomerulärer Filtration und tubulärer Resorption von Soluten und Wasser im Gleichgewicht gehalten. Das wichtige Hormon in diesem Zusammenhang ist das antidiuretische Hormon (ADH) (151). Neben der passiven, parazellulären Resorption wird Wasser über Aquaporine auch transzellulär transportiert und über deren Regulation der Wassergehalt des Urins eingestellt. AQP1 wird in großen Mengen im proximalen Tubulus und der dünnen absteigenden Henle Schleife exprimiert (152, 153), im distalen Nephron hingegen wird Wasser mittels luminaler AQP2- und basolateraler AQP3- und AQP4-Kanäle resorbiert (154–156). Da es keine Hinweise gibt, dass AQP3 und AQP4 über ADH beeinflusst werden, geht man davon aus, dass nur über die Regulation von AQP2 die Wasserpermeabilität des Sammelrohrs bestimmt wird (155, 157).

Wenn man die gerade beschriebene Regulation der renalen Wasserresorption beachtet, würde man eine verminderte luminaler AQP2-Aktivität in den Sammelrohren der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse erwarten. Die mRNA-Expression von AQP2 ist bei den Knockout-

Mäusen im Vergleich zu induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen jedoch nicht verändert (Abbildung 27, Seite 62). Wie bereits erwähnt, stimmen aber mRNA-Expression und Aktivität bzw. Lokalisation des Proteins in der luminalen Membran nicht zwangsläufig überein. AQP2 wird nach der Synthese als Tetramer in Membranvesikeln gespeichert, welche bei einem entsprechenden Stimulus mit der luminalen Membran fusionieren und damit die Wasser-Permeabilität erhöhen (158). Gerade deshalb wäre es bei den Knockout-Tieren möglich, dass die Translation von AQP2 beeinflusst wurde oder dass die Proteine weiterhin in Membranvesikeln vorliegen und diese nicht mit der apikalen Membran fusionieren können. Weiterhin wäre vorstellbar, dass die für die Aktivierung nötigen post-translationalen Modifikationen, wie z.B. verschiedene Phosphorylierungen, vermindert vorgenommen wurden (159).

Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, dass die Wasserresorption unabhängig von systemischen Hormonen reguliert wird. Ein Faktor dafür wäre das Prostaglandin E₂ (PGE₂) (160). Es stimuliert unter anderem die EP2- und EP4-Rezeptoren (Prostaglandin E-Rezeptoren) in der basolateralen Membran der Hauptzellen des CCD und sorgt so für ein verstärktes Membran-Targeting von AQP2, ebenso wie für die Phosphorylierung, die für die AQP2-Aktivierung nötig ist (161). Dennoch ist die Rolle von PGE₂ im Organismus komplex und noch nicht ausreichend verstanden. Eine Regulation der Wasser-Resorption über den PGE₂-Signalweg wäre aber auch bei einem kaum aktivierten RAS möglich.

Da die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse an einer Polyurie litten, es aber unklar war, inwieweit ein Konzentrierungsdefekt vorlag, sollten in zwei verschiedenen Experimenten der über ADH regulierte Wasserhaushalt der Knockout-Tiere unter Belastung untersucht werden.

Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus während einer Diuretika-Behandlung

Eine Möglichkeit um die Diurese/Salurese der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse zu untersuchen, war die Gabe von Diuretika. Es wurde eine Kombination aus Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) gewählt. HCT hemmt den NCC im DCT reversibel, indem es dort um die Chlorid-Bindestelle konkurriert (162, 163). Durch diese Inhibierung des NCC wird vermehrt Natriumchlorid und Wasser ausgeschieden. Bei der alleinigen Gabe von HCT kann der Körper, um eine Hyponatriämie zu verhindern, als Gegenregulation die Natrium-Resorption im Sammelrohr erhöhen (164). Da in diesem Tubulus-Abschnitt die Natrium-Resorption aber an die Kalium-Sekretion gekoppelt ist, führt eine längere Behandlung mit HCT zur Hypokaliämie (165). Um eine Kompensation der HCT-vermittelten Natrium-Ausscheidung durch das Sammelrohr zu verhindern, wurde deshalb zusätzlich das Kalium-sparende Diuretikum Amilorid injiziert. Amilorid verhindert die Natrium-Resorption über den ENaC im CNT und CCD und löst damit ebenfalls eine Natriurese

und Diurese aus, verhindert aber gleichzeitig eine Hyperkaliurie (166). In Kombination mit HCT verabreicht, verstärkt Amilorid so dessen natriuretische und diuretische Wirkung und verhindert einen renalen Kalium-Verlust (167).

Die Gabe der Diuretika führte bei beiden Versuchsgruppen jeweils zu einer Verdoppelung der Urinmenge (Abbildung 28, Seite 64). Die Diuretika hatten also die erwartete Wirkung, wobei die Polyurie der Knockout-Tiere weiter verstärkt wurde. Ebenso führten die Diuretika-Injektionen bei beiden Versuchsgruppen zu einer vergleichbar starken Natriuresis. Bei den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen sanken während der dreitägigen Diuretika-Behandlung die Urin-Elektrolyt-Ausscheidungen von Magnesium, Calcium und Kalium. Neben dem Kalium-sparenden Effekt von Amilorid wurde in der Literatur bei dem Diuretikum auch eine Magnesium-sparende Wirkung beschrieben (168). Weiterhin wurde bei der Behandlung mit Thiaziden ein Calcium-sparender Effekt nachgewiesen (116). Im Gegensatz zur verringerten Ausscheidung dieser Elektrolyte bei den Kontroll-Mäusen veränderte sich bei den Knockout-Mäusen die renale Exkretion von Calcium und Magnesium nicht im Vergleich zur Kontrollphase. Die Kalium-Ausscheidung sank jedoch auf einen vergleichbaren Wert wie bei den Kontroll-Tieren. Daraus lässt sich schließen, dass neben der natriuretischen Wirkung von HCT/Amilorid auch der Kalium-sparende Effekt von Amilorid bei beiden Versuchsgruppen gleich effektiv war. Die Knockout-Tiere litten in der Diuretikaphase weiterhin an einer Hypermagnesiurie. Es ist jedoch unklar, warum die Knockout-Tiere durch die Diuretika-Behandlung im Gegensatz zur Elektrolyt-Ausscheidung der Kontroll-Tiere eine Hypercalciurie entwickelten.

Um die Ergebnisse noch einmal kurz zusammenzufassen, kann man sagen, dass während der dreitägigen, kombinierten Gabe von HCT und Amilorid beide Versuchsgruppen mit einer vergleichbaren Natriuresis reagierten, während die Diurese zu einem stark erhöhten Wasserverlust in den Knockout-Tieren führte. Ebenso schieden die Knockout-Tiere renal mehr Elektrolyte (Magnesium, Calcium und Kalium) aus als die Kontroll-Tiere. Vermutlich litten die Tiere also an einem renalen Resorptionsdefizit, dessen Kompensationsmechanismen bereits in der Kontrollphase so stark beansprucht waren, dass es in der Diuretika-Gabe unmöglich war, einen Salzverlust zu verhindern.

Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse während des Kurzzeit-Durstversuchs

Um die Fähigkeit der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse zu testen, den Urin bei einer fehlenden Wasseraufnahme zu konzentrieren, wurde ein Kurzzeit-Durstversuch über 6 Stunden durchgeführt.

Im Allgemeinen erniedrigt sich bei einem Durstversuch das Urinvolumen, ebenso erhöht sich die Urin-Osmolalität, die Plasma-ADH-Konzentration und die AQP2-Protein-Expression in der Niere (169). Genauso sinkt bei einem Wasserentzug die Kreatinin-Clearance, was einer Verminderung der GFR entspricht (170).

Wie erwartet sank bei den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen das ausgeschiedene Urinvolumen, wodurch ein Wasserverlust verhindert wurde (Abbildung 28, Seite 64). Ebenso reduzierten die Kontroll-Mäuse initial die GFR, um einen Wasser- und Salzverlust zu verhindern. Dementsprechend wurde während des Wasserentzugs auch renal weniger Natrium, Magnesium, Calcium und Kalium ausgeschieden.

Im Gegensatz zu den schein-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen schieden die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse sogar mehr Harn aus als in der Kontrollphase. Es wäre möglich, dass die Tiere entweder die Wasser-Ausscheidung nicht anpassen konnten, oder, dass sie die Anpassung nicht innerhalb von 6 Stunden durchführen konnten. Aus der verringerten Kreatinin-Ausscheidung konnte man schließen, dass die Knockout-Tiere ähnlich wie die Kontroll-Tiere initial die GFR gesenkt hatten. Eine Erniedrigung der renalen Salz-Exkretion war bei den Tieren jedoch nur eingeschränkt zu beobachten. Die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse schieden im Vergleich zu den Kontroll-Tieren deutlich mehr Natrium aus, relativ zu ihrer renalen Exkretion in der Kontrollphase blieb die Menge aber konstant. Die Stoffmengen der anderen gemessenen Elektrolyte (Magnesiums, Calcium und Kalium) war im Gegensatz zu der Kontrollphase geringer, aber gemessen an den Kontroll-Tieren während des Durstversuchs signifikant höher.

Die Ergebnisse aus dem Stoffwechsellkäfig lassen die Schlussfolgerung zu, dass die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse schlechter auf Situationen reagieren können, die mit Veränderungen im Wasserhaushalt einhergehen. Die Anpassungen sind langsamer und würden auf Dauer zu einer Dehydratation und einem lebensbedrohlichen Salzverlust führen. Es ist jedoch weiterhin unklar, wodurch die Polyurie ausgelöst wird, welcher Regulationsweg dazu führt und wie genau sie für einen Ausgleich der renalen Elektrolyt-Ausscheidung verantwortlich ist.

5.2.9 Vergleich des Phänotyps der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus mit der menschlichen EAST-Erkrankung

Ziel der Arbeit war es, ein geeignetes Mausmodell zu finden, mit dem die renalen Symptome des EAST-Syndroms untersucht werden konnten. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei dem EAST-Syndrom um eine vererbte Krankheit handelt, bei der die Patienten bereits in jungen Jahren durch die Störung der KCNJ10-Funktion die ersten Beschwerden haben und sich die Symptome mit

der Zeit verschlimmern (54). Bei induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse wird jedoch erst in der adulten Lebensphase mit Doxycyclin ein nierenspezifischer Knockout hervorgerufen und es dauert vielleicht eine Weile, bis die Salzaufnahme und die -ausscheidung im Gleichgewicht stehen. Weiterhin sollte man bedenken, dass die Patienten an einer Störung der KCNJ10-Kalium-Kanalfunktion leiden, die den kompletten Körper betreffen. Dass es hier Unterschiede zwischen den EAST-Erkrankten und den konventionellen KCNJ10-Knockout-Mäusen gibt, wird bereits an der frühen Letalität der Tiere aufgrund des schweren Hirnphänotyps deutlich erkennbar (58). Ebenso wie einige der EAST-Patienten haben aber auch die induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse eine KCNJ10-Restfunktion. Während bei den Patienten allerdings die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals verändert waren, gab es bei den Mäusen Zellen im DCT und CNT, die entweder keine oder eine völlig unbeeinflusste KCNJ10-Expression aufwiesen. Trotz dieser Unterschiede hat sich das nierenspezifische KCNJ10-Knockout-Mausmodell als geeignetes System für die Untersuchung des renalen EAST-Syndroms erwiesen, da die Symptome sehr ähnlich waren.

Sowohl Mensch als auch Maus leiden an einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose und einem renalen Magnesium-Verlust. Eine Hypocalciurie wurde bei den induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen jedoch (noch) nicht beobachtet. Ein wichtiger Unterschied zwischen den Knockout-Mäusen und den EAST-Patienten ist, dass bei den Patienten die Hypernatriurie durch ein aktives RAS verhindert werden soll. Die Knockout-Mäuse scheinen jedoch durch die niedrige GFR und eventuell in Kombination mit der geringen Harnkonzentrierung ein einigermaßen kompensiertes Stadium des Elektrolyt-Haushalts zu erreichen. Hinweise darauf geben die langsame, geringe Anpassung der Wasserausscheidung nach Diuretika-Gabe oder bei Wasser-Restriktion. Im Gegensatz zum Elektrolyt-Haushalt scheint der Säure-Basen-Haushalt weniger gut reguliert zu sein, da die Knockout-Mäuse bei der Kalium-Restriktion über die Nahrungsaufnahme innerhalb kurzer Zeit einen lebensbedrohlichen Gewichtsverlust erleiden.

Trotz dieser Unterschiede können Rückschlüsse auf die Patienten gezogen werden. Es wäre z.B. wichtig, bei diesen Patienten auf eine ausreichende tägliche Kalium- und Magnesium-Zufuhr zu achten. Dennoch ist es nötig, zusätzliche Untersuchungen durchzuführen, um darüber hinaus Aussagen bezüglich der KCNJ10-Funktionsstörung treffen zu können. Weitere Forschung auf diesem Gebiet könnte helfen, neue Therapiemethoden und Medikamente für die betroffenen EAST-Patienten zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

2009 wurde eine neue Erkrankung, das EAST-Syndrom, entdeckt. Patienten mit dem autosomal rezessiv vererbten Krankheit leiden an den Symptomen Epilepsie, Ataxie, sensorineurale Taubheit und an einer renalen Tubulopathie. Durch die parallele Entdeckung wurde die Erkrankung alternativ SeSAME (**S**eizures, **S**ensorineural Deafness, **A**taxia, **M**ental Retardation, **E**lectrolyte Imbalance) genannt. Ursache für die Krankheit sind Mutationen im Kalium-Kanal KCNJ10, die zum Verlust oder zur Beeinträchtigung der Kanalfunktion führen. Da KCNJ10 in verschiedenen Geweben (Gehirn, Innenohr, Niere) exprimiert wird, kommt es zu den gerade genannten, diversen Symptomen. Der Funktionsverlust des KCNJ10 im distalen Nephron und Verbindungsstück der Niere führt zu einer renalen Tubulopathie, da seine Expression das Kalium-Recycling über die basolaterale Membran ermöglicht und so zusammen mit der Na^+/K^+ -ATPase ein wichtiger Bestandteil des Pump-Leak Couplings ist. Aufgrund dieser Tubulopathie leiden die Patienten an einer Hypocalciurie, Hypermagnesiurie, Hybernatriurie, und einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose.

Um den renalen Phänotyp des EAST-Syndroms besser zu verstehen wurden deshalb zeitgleich zur Entdeckung der Erkrankung konventionelle KCNJ10-Knockout-Mäuse untersucht. Renale Untersuchungen an diesen Mäusen waren bisher jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Tiere bereits kurz nach der Geburt sterben und so nur bedingt Funktionsanalysen durchgeführt werden konnten. Da der frühe Tod der Tiere im schweren Gehirnphänotyp begründet ist, war es Ziel dieser Arbeit, ein murines, nierenspezifisches KCNJ10-Knockout-System zu finden und den renalen Phänotyp dieser Mäuse zu untersuchen.

Es wurden zwei verschiedene nierenspezifische Mausmodelle getestet, zum einen das KspCre-Mausmodell, zum anderen das induzierbare Pax8Cre-Mausmodell. Beide Mauslinien wurden nicht nur jeweils mit geflochten KCNJ10-Mäusen verpaart, sondern auch separat mit der Tomato-EGFP-Reporter-Mauslinie. Nach der Betrachtung mikroskopischer Aufnahmen und der ersten Basis-Charakterisierung der Nachkommen mit dem KspCre-Transgen (KspCre/KNCJ10^{flox/flox}- und KspCre/Tomato-EGFP-Mäuse) wurde festgestellt, dass vermutlich aufgrund der ungenügenden Aktivität des Ksp-Cadherin-Promoters die KspCre-Mauslinie für die Untersuchung des KNCJ10-Knockouts in der Niere ungeeignet ist. Die induzierten Pax8Cre/Tomato-EGFP-Mäuse zeigten eine deutlich homogenere Cre-Aktivität in den Tubuluszellen der Niere. Ebenso war die Induktion des Knockouts in Pax8Cre/KNCJ10^{flox/flox}-Mäusen mit Doxycyclin erfolgreich und resultierte in einer nur sehr geringen KCNJ10-mRNA-Restexpression. Daher fiel die Wahl des nierenspezifischen Mausmodells auf die Pax8Cre-Mauslinie.

Anschließend wurde der Funktionsverlust des KCNJ10-Kanals in der Niere der induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Maus untersucht. Analysen von Urin- und Blutproben zeigten, dass die Knockout-Mäuse ebenso wie die EAST-Patienten an einer metabolischen Alkalose litten. Weiterhin hatten sie ebenfalls eine Hypermagnesiurie und eine Tendenz zum renalen Kalium-Verlust. Im Gegensatz zu den Patienten wurde bei den Mäusen eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate festgestellt, ebenso wie eine Einschränkung in der Urin-Konzentrierung. Trotz erhöhter Trinkmenge waren die Tiere dehydriert.

Die Gabe von Diuretika (HCT und Amilorid) und ein Kurzzeit-Durstversuch haben ergeben, dass sich die Knockout-Tiere sich nur bedingt und sehr langsam an diese Veränderungen anpassen können. Unter diesen Bedingungen kam es zu keiner vergleichbaren renale Resorption von Wasser wie bei den Kontroll-Tieren.

Weitere Versuche mit Niedrig-Salz-Diäten (Niedrig-Natrium, Niedrig-Magnesium und Niedrig-Kalium) zeigten ebenso, dass die KCNJ10-Knockout-Tiere mit einer geringen Aufnahme von Natrium und Magnesium umgehen können, bei einer geringeren Zufuhr von Kalium über die Nahrung jedoch einen lebensbedrohlichen Gewichtsverlust erleiden. In dieser Situation konnten sie das Natrium aus dem Urin rückresorbieren, jedoch nicht ausreichend das Kalium.

Inwieweit die verringerte GFR der Knockout-Mäuse und die eingeschränkte Fähigkeit Urin zu konzentrieren im Zusammenhang mit Kompensationsmechanismen stehen, die einen renalen Salzverlust verhindern sollen, ist unklar. Ebenfalls wäre möglich, dass diese Beobachtungen nur sekundäre Effekte einer Kompensation der Salzverlust-Tubulopathie sind.

Alles in allem erlaubt das Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mausmodell, die Pathophysiologie des EAST-Syndroms zu erforschen, da der Funktionsverlust des Kalium-Kanals KCNJ10 in Mensch und Maus zu einem ähnlichen Phänotyp führt. Dennoch sind weitere Experimente nötig, um die Kompensationsvorgänge in den Organismen besser zu verstehen.

7 Anhang

7.1 Herstellerinformationen

7.1.1 Futter-Zusammensetzung

7.1.1.1 Standard-Diät

Während der Aufzucht und Haltung der Versuchstiere wurden die Tiere in einer Standard-Mausdiät von ssniff® gehalten. Das Futter bestand aus einer Mischung der zwei unten beschriebenen Pellets in einem Mischverhältnis von 1:2 (V1324-0 und 1535-0).

Futter	ssniff R-Z	ssniff R/M-H
Produktnummer	V1324-0	V1535-0
Mineralien	[%]	
Calcium	1,00	1,00
Phosphat	0,70	0,70
Natrium	0,25	0,24
Magnesium	0,21	0,22
Kalium	1,03	0,91

Tabelle 3 Zusammensetzung des Alleinfuttermittles der Mäuse

7.1.1.2 Experimentalfutter

Die in 3.10.7 Niedrig-Salz-Diäten (Seite 36) verwendeten Experimentalfutter werden in Tabelle 4 bezüglich ihrer Zusammensetzungen beschrieben. Während der Diät wurde das jeweilige Futter in 10 mm-Pellets verabreicht.

Futter	Niedrig-Magnesium	Niedrig-Natrium	Niedrig-Kalium
Produktnummer	E15440-24	E15430-24	E15450-24
Mineralien	[%]		
Calcium	0,9	0,9	0,9
Phosphat	0,63	0,63	0,63
Natrium	0,19	< 0,03	0,19
Chlorid	0,18	0,18	0,18
Magnesium	< 0,02	0,21	0,21
Kalium	0,97	0,97	< 0,05

Tabelle 4 Zusammensetzung des verschiedenen Experimentalfutter

7.2 zusätzliche Messdaten

7.2.1 weitere Daten zu den KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

7.2.1.1 Gewichtsentwicklung der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse

Unter 4.1.1.1 Gewichtsmessungen und Urin-Elektrolytanalysen heranwachsender KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse (Seite 43) wurde in Abbildung 11 der Gewichtsverlauf der KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse dargestellt. Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen zusammen mit der Anzahl (n) an vermessenen Urinproben und dem Standardfehler (SEM). Zwischen den Gruppen waren keine anhaltenden Gewichtsunterschiede zu erkennen.

Genotyp	KspCre/KCNJ10 ^{wt/wt}			KspCre/KCNJ10 ^{flox/wt}			KspCre/KCNJ10 ^{flox/flox}		
	Mittelwert	n	SEM	Mittelwert	n	SEM	Mittelwert	n	SEM
pp1-pp3	1,89	22	0,09	1,81	29	0,07	2,06°	13	0,08
pp4-pp6	3,20	38	0,10	2,64*	42	0,12	3,12°	20	0,10
pp7-pp9	3,95	65	0,09	3,72	70	0,09	4,44*°	25	0,13
pp10-pp12	5,61	52	0,14	5,23	60	0,15	5,77°	34	0,19
pp13-pp17	6,12	88	0,11	6,04	111	0,12	6,22	34	0,21
pp18-pp22	7,59	91	0,12	7,33	113	0,14	7,81	37	0,30
pp23-pp27	10,35	79	0,22	10,27	77	0,27	10,97	55	0,30
pp28-pp32	12,85	57	0,34	12,84	62	0,34	13,89°	36	0,40
pp33-pp35	15,96	49	0,33	15,34	76	0,29	15,80	31	0,36

Tabelle 5 Gewichtsentwicklung (Gewicht in Gramm) der KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse während der ersten 35 Lebensstage

*: signifikanter Unterschied zu KspCre/KCNJ10^{wt/wt}; °: signifikanter Unterschied zwischen KspCre/KCNJ10^{flox/flox} und KspCre/KCNJ10^{flox/wt} (p-Wert: < 0,05)

Zur besseren Übersicht wurden die Gewichtsmessungen von mehreren Tagen gemittelt (pp1-pp3, pp4-pp6, pp7-pp9, pp10-pp12, pp13-pp17, pp18-22, pp23-27, pp28-pp32, pp33-35).

7.2.1.2 Urin-Elektrolyt-Ausscheidung der KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse während der ersten 35 Lebenstage

In 4.1.1.1 Gewichtsmessungen und Urin-Elektrolytanalysen heranwachsender KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse (Seite 43) wurde in Tabelle 2 bereits die mittlere, renale Ausscheidung von Kreatinin, Natrium/Kreatinin und Chlorid/Kreatinin mit den KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und den KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen verglichen. In der nachfolgenden Tabelle 6 werden die Ergebnisse der ionenchromatographischen Analyse dargestellt. Neben Natrium und Chlorid wurden nämlich auch Magnesium, Calcium, Kalium, Ammonium und Phosphat gemessen.

KspCre/KCNJ10	Kreatinin			Mg ²⁺ /Kreatinin			Ca ²⁺ /Kreatinin		
	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox
pp 1-3	0,64	0,48	0,71	15,78	17,36	13,14	5,05	3,54	3,17
SEM	0,07	0,07	0,09	1,35	2,05	1,36	0,73	0,60	1,07
pp 4-6	0,47	0,70	0,52	19,18	13,01	13,95	5,80	0,72*	0,63*
SEM	0,04	0,04	0,05	1,20	4,10	2,72	0,89	0,15	0,24
pp 7-9	1,00	0,99	0,81	13,65	14,94	12,92	1,69	0,88	0,91
SEM	0,10	0,14	0,07	1,24	1,20	0,98	0,43	0,13	0,18
pp 10-12	1,01	0,93	0,66	13,33	15,79	15,35	0,83	0,66	1,09
SEM	0,04	0,09	0,10	0,61	1,14	1,24	0,15	0,10	0,22
pp 13-17	1,79	2,08	1,50	10,47	10,45	9,27	0,45	0,46	0,50
SEM	0,30	0,37	0,36	0,68	1,11	0,78	0,05	0,07	0,08
pp 18-22	2,88	2,74	1,82	13,45	11,11	10,06	0,89	0,96	0,56
SEM	0,26	0,44	0,38	2,67	1,74	1,78	0,22	0,36	0,23
pp 23-27	3,52	3,64	2,61	12,88	16,49	17,21	1,19	1,44	1,97*
SEM	0,28	0,33	0,70	0,92	2,15	2,34	0,21	0,51	0,16
pp 28-32	2,85	2,61	2,25	12,82	14,29	13,38	0,95	1,11	0,91
SEM	0,25	0,44	0,46	0,87	2,16	2,24	0,07	0,20	0,21
pp 33-35	2,27	2,45	1,98	9,30	8,37	9,13	0,80	0,59	0,66
SEM	0,29	0,52	0,39	1,10	1,46	2,19	0,10	0,10	0,15

KspCre/KCNJ10	K ⁺ /Kreatinin			NH ₄ ⁺ /Kreatinin			PO ₄ ³⁻ /Kreatinin		
	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox	wt/wt	flox/wt	flox/flox
pp 1-3	108,09	143,08	100,09	35,60	46,68	36,74	13,70	20,65	16,21
SEM	15,60	24,40	14,78	3,67	6,26	5,81	4,95	8,68	5,58
pp 4-6	134,34	119,25	127,05	70,07	48,86	62,59	43,94	63,61*	56,54
SEM	6,28	19,24	7,30	9,33	22,65	18,12	5,15	1,14	11,18
pp 7-9	89,70	87,04	98,80	52,67	48,36	46,49	45,44	62,49	54,44
SEM	10,16	7,70	7,29	7,38	8,10	7,43	5,46	10,42	6,34
pp 10-12	89,22	105,54	135,90*	41,67	44,99	54,81	57,24	65,72	62,59
SEM	6,08	12,31	11,93	5,86	5,22	4,78	4,82	4,80	8,15
pp 13-17	84,82	73,89	100,77	40,05	36,88	36,02	53,32	45,62	44,84
SEM	5,38	7,95	12,45	5,31	7,10	5,58	4,71	6,10	6,44
pp 18-22	145,53	129,22	104,00	24,39	23,96	38,71	25,13	31,30	31,92
SEM	28,98	16,89	15,03	4,56	5,71	8,99	3,66	4,51	10,52
pp 23-27	111,99	111,94	125,12	12,27	13,65	20,77	19,66	20,72	15,69
SEM	6,45	9,67	12,20	1,14	3,01	6,48	2,51	4,38	3,76
pp 28-32	130,53	142,21	121,85	15,18	21,56	30,63	16,67	24,15	16,39
SEM	11,54	9,74	6,08	3,57	4,67	6,05	4,42	2,78	3,75
pp 33-35	129,36	114,74	111,77	18,00	22,76	28,88	21,65	25,21	20,69
SEM	13,74	10,65	19,52	2,92	6,88	5,03	4,48	6,16	4,25

Tabelle 6 Elektrolytausscheidung der KspCre/KCNJ10^{wt/wt}-, KspCre/KCNJ10^{flox/wt}- und KspCre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäuse Tiere während der ersten 35 Tage Lebensstage

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte der vermessenen Proben in [mM] bei Kreatinin oder [mM/mM Kreatinin] mit den entsprechenden Standardfehler SEM.

Die Anzahl an verwendeten Proben pro Altersabschnitt, die für diese Werte verwendet werden, finden sich in Tabelle 7.

*: signifikanter Unterschied zu KspCre/KCNJ10^{wt/wt}; °: signifikanter Unterschied zwischen KspCre/KCNJ10^{flox/flox} und KspCre/KCNJ10^{flox/wt} (p-Wert: < 0,05)

KspCre/KCNJ10	Alter [pp]								
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-17	18-22	23-27	28-32	33-35
wt/wt	11	14	22	18	21	22	16	9	14
flox/wt	4	2	10	7	12	12	9	7	9
flox/flox	8	4	15	8	13	10	5	6	5

Tabelle 7 Anzahl der Urinproben, die für 0 vermessen wurden

7.2.2 weitere Daten zu den induzierbaren Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

7.2.2.1 Urinanalyse von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen im Vergleich zu 2 verschiedenen Kontrollen

In 4.2 Wahl der Kontroll-Tiere (Seite 53) wurden nur die renale Ausscheidungsdaten von Kreatinin, Chlorid/Kreatinin und Phosphat/Kreatinin dargestellt (Abbildung 19). Tabelle 8 bestätigt, dass es nur bei diesen Elektrolyten einen Unterschied zwischen Kontrolle 1 und Kontrolle 2 gibt. Diese Unterschiede lassen sich auf die Doxycyclin-Behandlung zurückführen.

	Kontrolle 1		Kontrolle 2		Knockout	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Kreatinin [mM]	4,54	0,17	4,51	0,13	1,82*°	0,16
Natrium [mM/mM Kreatinin]	23,74	2,39	28,24	1,72	17,55°	2,50
Chlorid [mM/mM Kreatinin]	69,89	5,35	56,42*	3,17	36,34*°	3,17
Magnesium [mM/mM Kreatinin]	8,75	0,42	7,98	0,29	8,41	0,65
Calcium [mM/mM Kreatinin]	0,79	0,04	0,71	0,02	0,72	0,07
Kalium [mM/mM Kreatinin]	80,33	4,55	81,70	3,16	66,01*°	3,38
Ammonium [mM/mM Kreatinin]	15,23	0,81	12,79	1,01	23,46*°	1,52
Phosphat [mM/mM Kreatinin]	22,27	1,61	12,00*	0,62	12,35*	1,07

Tabelle 8 renale Elektrolyt-Ausscheidung von nicht-induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (Kontrolle 1), induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen (Kontrolle 2) und induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen (Knockout)

Die Kreatinin-Konzentration wurde zur Normalisierung von Urin-Elektrolyten verwendet, da die Ausscheidung über den Harn zwischen den Versuchsgruppen nicht gleich war.

*: signifikanter Unterschied zu Kontrolle 1; °: signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle 2 (p-Wert: < 0,05)

7.2.2.2 Blutanalyse von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen: Werte der bukalen Blutabnahme und des Aortenbluts

Der Vergleich zwischen den Werten von Blut, das über den submandibulären Venenplexus abgenommen wurde, oder Aortenblut, das über Bauchorta gewonnen wurde, zeigt, dass die Art der Blutabnahme keinen gravierenden Einfluss auf die Ergebnisse hat. Da für die Niedrig-Salz-Diäten aus experimentellen Gründen ebenfalls Blut über den submandibulären Venenplexus abgenommen werden musste, wurde im den Ergebnissen auch die Werte dieser Abnahmemethode diskutiert.

	submandibulärer Venenplexus						Aortenblut					
	Kontrolle			Knockout			Kontrolle			Knockout		
	Mittel	SEM	n	Mittel	SEM	n	Mittel	SEM	n	Mittel	SEM	n
pH	7,26	0,01	41	7,28	0,01	10	7,33	0,01	12	7,37	0,02	12
pCO2	39,17	0,91	41	45,38*	2,47	10	30,57	1,19	12	33,32	1,68	12
pO2	42,43	0,53	41	41,02	1,35	10	90,00	4,08	12	91,25	3,88	12
Hkt	41,06	0,30	36	43,73*	0,45	11	39,25	0,60	12	41,17*	0,37	12
Na+	153,27	0,52	41	154,60	1,25	11	149,50	0,45	12	149,04	0,40	12
K+	6,80	0,12	41	6,37	0,28	11	3,90	0,17	12	3,50	0,28	12
Ca++	1,16	0,01	41	1,15	0,01	11	1,05	0,02	12	1,04	0,02	12
Mg++	0,48	0,01	41	0,49	0,02	11	0,44	0,01	12	0,44	0,02	12
BE	-8,52	1,05	41	-5,68*	0,91	11	-8,09	0,40	12	-4,13*	0,65	12
HCO3-	17,79	0,42	41	21,21*	1,03	11	16,12	0,32	12	19,48*	0,41	12

Tabelle 9 Blutwerte von induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{wt/wt}-Mäusen im Vergleich zu induzierten Pax8Cre/KCNJ10^{flox/flox}-Mäusen

Das Blut wurde entweder über den submandibulären Venenplexus am wachen Tier oder beim narkotisierten Tier über die Bauchorta Blut abgenommen

* signifikanter Unterschied zwischen Genotypen

Literaturverzeichnis

1. Biner HL et al. (2002) Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol* 13:836–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912242>.
2. Bandulik S et al. (2011) The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch* 461:423–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221631> [Accessed March 13, 2014].
3. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B (1985) Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 28:899–913. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003443> [Accessed April 28, 2014].
4. KOEFOED-JOHNSEN V, USSING HH (1958) The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42:298–308. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13544986> [Accessed April 28, 2014].
5. Reilly RF, Ellison DH (2000) Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 80:277–313. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617770>.
6. Garg LC, Knepper MA, Burg MB (1981) Mineralocorticoid effects on Na-K-ATPase in individual nephron segments. *Am J Physiol* 240:F536–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6264796> [Accessed April 26, 2014].
7. Bachmann S et al. (1995) Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 96:2510–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=185908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
8. Plotkin MD et al. (1996) Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney. *Kidney Int* 50:174–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8807586> [Accessed April 28, 2014].
9. Ellison DH, Velázquez H, Wright FS (1987) Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol* 253:F546–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3631283> [Accessed April 26, 2014].
10. De Rouffignac C, Quamme G (1994) Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74:305–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171116> [Accessed April 23, 2014].
11. Schlingmann KP et al. (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 31:166–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032568> [Accessed April 23, 2014].
12. Voets T et al. (2004) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* 279:19–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576148> [Accessed April 14, 2014].

13. Walder RY et al. (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 31:171–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032570> [Accessed April 28, 2014].
14. Houillier P (2014) Mechanisms and regulation of renal magnesium transport. *Annu Rev Physiol* 76:411–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512082> [Accessed April 10, 2014].
15. Dai LJ et al. (2001) Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 81:51–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152754> [Accessed April 23, 2014].
16. Vennekens R et al. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* 275:3963–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660551> [Accessed April 28, 2014].
17. Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2008) Calcitropic and magnesiumotropic TRP channels. *Physiology (Bethesda)* 23:32–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268363> [Accessed April 28, 2014].
18. Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373–422. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618484> [Accessed April 28, 2014].
19. Gross M, Kumar R (1990) Physiology and biochemistry of vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Am J Physiol* 259:F195–209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201202> [Accessed April 28, 2014].
20. Berggård T et al. (2002) Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor. *J Biol Chem* 277:16662–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872749> [Accessed April 28, 2014].
21. Nilius B et al. (2001) The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 276:1020–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035011> [Accessed April 28, 2014].
22. Groenestege WMT et al. (2007) Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest* 117:2260–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1934557&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
23. Obermüller N et al. (1995) Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *Am J Physiol* 269:F900–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594886> [Accessed April 28, 2014].
24. Giebisch G (1998) Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 274:F817–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612319> [Accessed April 28, 2014].
25. O’Neil RG, Hayhurst RA (1985) Functional differentiation of cell types of cortical collecting duct. *Am J Physiol* 248:F449–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2579583> [Accessed April 28, 2014].

26. Nielsen S et al. (1999) Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol* 10:647–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073616> [Accessed April 28, 2014].
27. Kim SW et al. (2005) Decreased expression of AQP2 and AQP4 water channels and Na,K-ATPase in kidney collecting duct in AQP3 null mice. *Biol Cell* 97:765–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15898956> [Accessed April 1, 2014].
28. Loffing J et al. (2001) Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F675–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11249859> [Accessed April 28, 2014].
29. Warth R et al. (2004) Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8215–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=419583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2014].
30. Wang W-H, Giebisch G (2009) Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch* 458:157–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2730119&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 6, 2014].
31. Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W (2005) Molecular Diversity and Regulation of Renal Potassium Channels. 319–371.
32. Sansom MSP et al. (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim Biophys Acta* 1565:294–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409202> [Accessed April 29, 2014].
33. Lourdel S et al. (2002) An inward rectifier K⁺ channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol* 538:391–404. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2290070&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2014].
34. Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525 Pt 3:587–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2269982&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 27, 2014].
35. Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, Ito S (2004) PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1148–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292049> [Accessed April 27, 2014].
36. Rapedius M et al. (2007) H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron* 55:602–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1950231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].

37. Pessia M, Tucker SJ, Lee K, Bond CT, Adelman JP (1996) Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. *EMBO J* 15:2980–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=450239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
38. Reichold M et al. (2010) KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14490–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2922599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
39. Takumi T et al. (1995) A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270:16339–16346.
40. Ito M et al. (1996) Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett* 388:11–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654579>.
41. Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2322935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 23, 2014].
42. Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P (2002) KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C403–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788352> [Accessed February 10, 2014].
43. Bockenbauer D et al. (2009) Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 360:1960–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3398803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 10, 2014].
44. Lachheb S et al. (2008) Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F1398–407. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367659> [Accessed April 29, 2014].
45. Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, Nichols CG (2010) Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J Biol Chem* 285:36040–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2975226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 14, 2014].
46. Freudenthal B et al. (2011) KCNJ10 mutations disrupt function in patients with EAST syndrome. *Nephron Physiol* 119:p40–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849804> [Accessed May 14, 2014].
47. Tang X, Hang D, Sand A, Kofuji P (2010) Variable loss of Kir4.1 channel function in SeSAME syndrome mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 399:537–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2940129&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 14, 2014].

48. Williams DM et al. (2010) Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome. *J Am Soc Nephrol* 21:2117–29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 14, 2014].
49. Scholl UI et al. (2009) Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5842–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 24, 2014].
50. Shi M, Zhao G (2009) The EAST syndrome and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 361:630; author reply 630–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283765> [Accessed April 25, 2014].
51. Cross JH et al. (2013) Neurological features of epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy syndrome. *Dev Med Child Neurol* 55:846–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924083> [Accessed March 13, 2014].
52. Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F (2010) Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci* 30:15769–77. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/30/47/15769.long> [Accessed March 29, 2014].
53. Greger R, Velázquez H (1987) The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int* 31:590–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3550228> [Accessed May 18, 2014].
54. Scholl UI et al. (2012) SeSAME/EAST syndrome--phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatr Nephrol* 27:2081–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22907601> [Accessed March 13, 2014].
55. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG (1966) A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 79:221–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5929460> [Accessed March 16, 2014].
56. Simon DB et al. (1996) Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12:24–30.
57. Desai M, Kolla PK, Reddy PLVP (2013) Case Report Calcium Unresponsive Hypocalcemic Tetany : Gitelman Syndrome with Hypocalcemia. 2013:3–6.
58. Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester H a, Kofuji P (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21:5429–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466414>.
59. Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin L-S, McCarthy KD (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 27:11354–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942730> [Accessed January 21, 2014].

60. Schmidt K et al. (2013) Dynamics of Renal Electrolyte Excretion in Growing Mice. *Nephron Physiol* 124:7–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296675> [Accessed February 4, 2014].
61. Sauer B (1987) Functional Expression of the cre-lox Site-Specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 7.
62. Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J Mol Biol* 150:467–486. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283681903752> [Accessed February 6, 2014].
63. Hoess RH, Ziese M, Sternberg NAT (1982) P1 site-specific recombination: Nucleotide sequence of the recombining sites. 79:3398–3402.
64. Argos P et al. (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. 5:433–440.
65. Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389:40–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288963> [Accessed February 10, 2014].
66. Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. 85:5166–5170.
67. Lakso M et al. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6232–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
68. Shaikh AC, Sadowski PD (1997) The Cre Recombinase Cleaves the lox Site in trans. *J Biol Chem* 272:5695–5702. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.9.5695> [Accessed February 7, 2014].
69. Shao X, Johnson JE, Richardson JA, Hiesberger T, Igarashi P (2002) A minimal Ksp-cadherin promoter linked to a green fluorescent protein reporter gene exhibits tissue-specific expression in the developing kidney and genitourinary tract. *J Am Soc Nephrol* 13:1824–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089378> [Accessed February 25, 2014].
70. Shao X, Somlo S, Igarashi P (2002) Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J Am Soc Nephrol* 13:1837–1846.
71. Abremski K, Hoess R (1984) Bacteriophage P1 Site-specific Recombination.
72. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L (2007) A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45:593–605. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868096> [Accessed January 24, 2014].
73. Takeichi M, Shirayoshi Y, Hatta K, Nose A (1986) Cadherins: their morphogenetic role in animal development. *Prog Clin Biol Res* 217B:17–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3749174> [Accessed February 12, 2014].

74. Thomson RB et al. (1995) Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J Biol Chem* 270:17594–601. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.270.29.17594> [Accessed February 12, 2014].
75. Whyte DA et al. (1999) Ksp-cadherin gene promoter. I. Characterization and renal epithelial cell-specific activity. *Am J Physiol* 277:F587–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516284> [Accessed February 12, 2014].
76. Foster TJ, Howe TG, Richmond KM (1975) Translocation of the tetracycline resistance determinant from R100-1 to the Escherichia coli K-12 chromosome. *J Bacteriol* 124:1153–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236021&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 11, 2014].
77. Bertrand KP, Postle K, Wray L V, Reznikoff WS (1983) Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene* 23:149–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311683> [Accessed February 11, 2014].
78. Hillen W, Gatz C, Altschmied L, Schollmeier K, Meier I (1983) Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol* 169:707–721.
79. Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
80. Gossen M et al. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7792603>.
81. Kistner a et al. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
82. Urlinger S et al. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7963–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
83. Kofuji P et al. (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20:5733–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2410027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
84. Traykova-Brauch M et al. (2008) An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med* 14:979–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3446847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 21, 2014].

85. Eremina V et al. (2008) VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 358:1129–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618951> [Accessed February 14, 2014].
86. Walther C et al. (1991) Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11:424–434.
87. Plachov D et al. (1990) Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110:643–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723950> [Accessed February 14, 2014].
88. Qi Z et al. (2004) Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F590–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600035>.
89. Paulais M et al. (2011) Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (Kcnj16) K⁺ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10361–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3121827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 9, 2014].
90. Igarashi P et al. (1999) Ksp-cadherin gene promoter. II. Kidney-specific activity in transgenic mice. *Am J Physiol* 277:F599–610. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516285> [Accessed February 12, 2014].
91. Hennet T, Hagen FK, Tabak L a, Marth JD (1995) T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12070–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
92. Milch RA, Rall DP, Tobie JE (1958) Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg Am* 40-A:897–910. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13549526> [Accessed April 22, 2014].
93. Opperbeck J (1971) [Side-effects of tetracycline therapy with special reference to tooth disorders]. *Z Laryngol Rhinol Otol* 50:393–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5579379> [Accessed March 11, 2014].
94. Eisner C et al. (2010) Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int* 77:519–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2014].
95. Jones CA et al. (1998) Serum creatinine levels in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 32:992–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856515> [Accessed May 7, 2014].
96. Hsu J, Johansen KL, Hsu C-Y, Kaysen GA, Chertow GM (2008) Higher serum creatinine concentrations in black patients with chronic kidney disease: beyond nutritional status and body composition. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:992–7. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2440282&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed May 7, 2014].
97. Greenblatt DJ et al. (1976) Variability of 24-hour urinary creatinine excretion by normal subjects. *J Clin Pharmacol* 16:321–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/947964> [Accessed May 7, 2014].
 98. Singh R et al. (2000) Circadian periodicity of urinary volume, creatinine and 5-hydroxyindole acetic acid excretion in healthy Indians. *Life Sci* 66:209–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665995> [Accessed May 7, 2014].
 99. Curtis G, Fogel M Creatinine excretion: diurnal variation and variability of whole and part-day measures. A methodologic issue in psychoendocrine research. *Psychosom Med* 32:337–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5514174> [Accessed May 7, 2014].
 100. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD (1985) Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 28:830–838.
 101. Darling IM, Morris ME (1991) Evaluation of “true” creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharm Res* 8:1318–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1796052> [Accessed May 7, 2014].
 102. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre J V (2010) Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int* 78:486–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3025699&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
 103. Garty H, Palmer LG (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77:359–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114818> [Accessed April 26, 2014].
 104. Gründer S, Rossier BC (1997) A reappraisal of aldosterone effects on the kidney: new insights provided by epithelial sodium channel cloning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:35–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051352> [Accessed April 26, 2014].
 105. Eaton DC, Malik B, Saxena NC, Al-Khalili OK, Yue G (2001) Mechanisms of aldosterone’s action on epithelial Na⁺ transport. *J Membr Biol* 184:313–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891557> [Accessed May 8, 2014].
 106. Krug AW, Papavassiliou F, Hopfer U, Ullrich KJ, Gekle M (2003) Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch* 446:492–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684793> [Accessed May 8, 2014].
 107. Verrey F (1999) Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* 277:F319–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484514> [Accessed May 8, 2014].
 108. Kim GH et al. (1998) The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14552–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24411&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed April 26, 2014].

109. Loffing J et al. (2000) Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F252–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919843>.
110. BARTTER FC (1956) The role of aldosterone in normal homeostasis and in certain disease states. *Metabolism* 5:369–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13333786> [Accessed May 8, 2014].
111. HILLS AG, PARSONS DW, WEBSTER GD, ROSENTHAL O, CONOVER H (1959) Influence of the renal excretion of sodium chloride upon the renal excretion of magnesium and other ions by human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 19:1192–211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14401817> [Accessed May 8, 2014].
112. Horton R, Biglieri EG (1962) Effect of aldosterone on the metabolism of magnesium. *J Clin Endocrinol Metab* 22:1187–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2748795>.
113. Schultheis PJ (1998) Phenotype Resembling Gitelman’s Syndrome in Mice Lacking the Apical Na⁺-Cl⁻ Cotransporter of the Distal Convoluted Tubule. *J Biol Chem* 273:29150–29155. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.44.29150> [Accessed April 28, 2014].
114. Knoers NVAM (2006) Gitelman syndrome. *Adv Chronic Kidney Dis* 13:148–154.
115. Loffing J et al. (2004) Altered renal distal tubule structure and renal Na⁽⁺⁾ and Ca⁽²⁺⁾ handling in a mouse model for Gitelman’s syndrome. *J Am Soc Nephrol* 15:2276–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339977> [Accessed April 28, 2014].
116. Nijenhuis T et al. (2005) Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. 115:1651–1658.
117. Quamme GA (1986) Renal handling of magnesium: drug and hormone interactions. *Magnesium* 5:248–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3543513> [Accessed May 5, 2014].
118. Shafik IM, Quamme GA (1989) Early adaptation of renal magnesium reabsorption in response to magnesium restriction. *Am J Physiol* 257:F974–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2603964> [Accessed May 5, 2014].
119. KRUSE HD, ORENT ER, McCOLLUM EV (2009) STUDIES ON MAGNESIUM DEFICIENCY IN ANIMALS. *Nutr Rev* 37:145–148. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789045> [Accessed May 5, 2014].
120. Groenestege WMT, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ (2006) The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens. *J Am Soc Nephrol* 17:1035–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524949> [Accessed May 5, 2014].
121. Simon DB et al. (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285:103–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390358> [Accessed May 1, 2014].

122. Blanchard A et al. (2001) Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59:2206–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380823> [Accessed May 5, 2014].
123. Chattopadhyay N, Vassilev PM, Brown EM (1997) Calcium-sensing receptor: roles in and beyond systemic calcium homeostasis. *Biol Chem* 378:759–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377470> [Accessed May 5, 2014].
124. Dunn MJ, Walser M (1966) Magnesium depletion in normal man. *Metabolism* 15:884–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5923524> [Accessed May 5, 2014].
125. WELT LG (1964) EXPERIMENTAL MAGNESIUM DEPLETION. *Yale J Biol Med* 36:325–49. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2604616&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 5, 2014].
126. Wittner M, Jounier S, Deschênes G, de Rouffignac C, Di Stefano A (2000) Cellular adaptation of the mouse cortical thick ascending limb of Henle's loop (CTAL) to dietary magnesium restriction: enhanced transepithelial Mg²⁺ and Ca²⁺ transport. *Pflügers Arch Eur J Physiol Arch Eur J Physiol* 439:765–771. Available at: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s004240051003>.
127. Zander R (1995) [Correct determination of blood base excess (BE, mmol/l)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 30 Suppl 1:S36–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589113> [Accessed May 3, 2014].
128. Wingo CS, Armitage FE (1992) Rubidium absorption and proton secretion by rabbit outer medullary collecting duct via H-K-ATPase. *Am J Physiol* 263:F849–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332504> [Accessed May 4, 2014].
129. Wingo CS (1987) Potassium transport by medullary collecting tubule of rabbit: effects of variation in K intake. *Am J Physiol* 253:F1136–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3425723> [Accessed May 4, 2014].
130. Gray DA, Frindt G, Zhang Y-Y, Palmer LG (2005) Basolateral K⁺ conductance in principal cells of rat CCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F493–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547117> [Accessed May 4, 2014].
131. Marsy S, Elalouf JM, Doucet A (1996) Quantitative RT-PCR analysis of mRNAs encoding a colonic putative H, K-ATPase alpha subunit along the rat nephron: effect of K⁺ depletion. *Pflugers Arch* 432:494–500. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8766009> [Accessed May 4, 2014].
132. Silver RB, Soleimani M (1999) H⁺-K⁺-ATPases: regulation and role in pathophysiological states. *Am J Physiol* 276:F799–811. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362769> [Accessed May 4, 2014].
133. Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D (2005) A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 280:39970–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216878> [Accessed May 4, 2014].

134. Ray PE, Suga S, Liu XH, Huang X, Johnson RJ (2001) Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int* 59:1850–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318956> [Accessed May 4, 2014].
135. Sealey JE, Clark I, Bull MB, Laragh JH (1970) Potassium balance and the control of renin secretion. *J Clin Invest* 49:2119–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=535787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
136. Berl T, Linas SL, Aisenbrey G a, Anderson RJ (1977) On the mechanism of polyuria in potassium depletion. The role of polydipsia. *J Clin Invest* 60:620–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
137. Zitta S et al. (2013) Glomerular filtration rate (GFR) determination via individual kinetics of the inulin-like polyfructosan sinistrin versus creatinine-based population-derived regression formulae. *BMC Nephrol* 14:159. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 10, 2014].
138. Gross a S, McLachlan a J, Minns I, Beal JB, Tett SE (2001) Simultaneous administration of a cocktail of markers to measure renal drug elimination pathways: absence of a pharmacokinetic interaction between fluconazole and sinistrin, p-aminohippuric acid and pindolol. *Br J Clin Pharmacol* 51:547–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2014485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 10, 2014].
139. Mitteilung II, Thureau K, Deetjen P (1960) Itämodynamik des Nierenmarks. 285:270–285.
140. Ren Y, Garvin JL, Liu R, Carretero OA (2007) Crosstalk between the connecting tubule and the afferent arteriole regulates renal microcirculation. *Kidney Int* 71:1116–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361114> [Accessed May 11, 2014].
141. Deng A, Wead LM, Blantz RC (2004) Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int* 66:2348–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569325> [Accessed May 11, 2014].
142. Deng A, Hammes JS, Thomson SC (2002) Hemodynamics of early tubuloglomerular feedback resetting during reduced proximal reabsorption. *Kidney Int* 62:2136–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427138> [Accessed May 11, 2014].
143. Schnermann J, Briggs JP (1999) The macula densa is worth its salt. *J Clin Invest* 104:1007–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=408877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
144. Schnermann J, Briggs JP (1990) Restoration of tubuloglomerular feedback in volume-expanded rats by angiotensin II. *Am J Physiol* 259:F565–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2221094> [Accessed May 11, 2014].

145. Faarup P (1965) On the morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Acta Anat (Basel)* 60:20–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023929> [Accessed May 11, 2014].
146. Barajas L, Powers K, Carretero O, Scicli AG, Inagami T (1986) Immunocytochemical localization of renin and kallikrein in the rat renal cortex. *Kidney Int* 29:965–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3523005> [Accessed May 11, 2014].
147. Vio CP, Figueroa CD, Caorsi I (1988) Anatomical relationship between kallikrein-containing tubules and the juxtaglomerular apparatus in the human kidney. *Am J Hypertens* 1:269–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3390319> [Accessed May 11, 2014].
148. Costanzo LS, Windhager EE (1978) Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am J Physiol* 235:F492–506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/727266> [Accessed May 10, 2014].
149. Weinman EJ, Eknoyan G (1975) Chronic effects of chlorothiazide on reabsorption by the proximal tubule of the rat. *Clin Sci Mol Med* 49:107–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1149400> [Accessed May 10, 2014].
150. Hoenderop JGJ et al. (2003) Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. 112.
151. Wilson JLL, Miranda Ca, Knepper Ma (2013) Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin Exp Nephrol* 17:751–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584881> [Accessed May 11, 2014].
152. Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P (1993) CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120:371–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
153. Maeda Y, Smith BL, Agre P, Knepper MA (1995) Quantification of Aquaporin-CHIP water channel protein in microdissected renal tubules by fluorescence-based ELISA. *J Clin Invest* 95:422–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
154. Fushimi K et al. (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361:549–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8429910> [Accessed May 11, 2014].
155. Ecelbarger CA et al. (1995) Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol* 269:F663–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503232> [Accessed May 11, 2014].
156. Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S (1995) Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 269:F775–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594871> [Accessed May 11, 2014].

157. Ecelbarger CA et al. (1997) Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rat. *J Clin Invest* 99:1852–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
158. Hendriks G et al. (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279:2975–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593099> [Accessed May 11, 2014].
159. Hoffert JD, Pisitkun T, Wang G, Shen R-F, Knepper MA (2006) Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7159–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1459033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
160. Breyer MD, Breyer RM (2000) Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F12–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894784> [Accessed May 11, 2014].
161. Li JH et al. (2009) A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Clin Invest* 119:3115–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2752083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
162. Kunau RT, Weller DR, Webb HL (1975) Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron. *J Clin Invest* 56:401–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=436599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
163. Shimizu T, Yoshitomi K, Nakamura M, Imai M (1988) Site and mechanism of action of trichlormethiazide in rabbit distal nephron segments perfused in vitro. *J Clin Invest* 82:721–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303569&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
164. Glezer GA et al. (1990) [Comparative study of potassium-sparing effects of triamterene and amiloride in the treatment with hydrochlorothiazide]. *Klin Med (Mosk)* 68:61–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2290332> [Accessed May 11, 2014].
165. Wilson DR, Honrath U, Sonnenberg H (1983) Thiazide diuretic effect on medullary collecting duct function in the rat. *Kidney Int* 23:711–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6876566> [Accessed May 11, 2014].
166. Möhrke W, Knauf H, Mutschler E (1997) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of triamterene and hydrochlorothiazide and their combination in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 35:447–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352394> [Accessed May 11, 2014].
167. Lammintausta R, Kanto J, Mäntylä R (1978) Urinary electrolyte profiles after amiloride, hydrochlorothiazide and the combination. *J Int Med Res* 6:401–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29812> [Accessed May 11, 2014].

-
168. Murdoch DL, Forrest G, Davies DL, McInnes GT (1993) A comparison of the potassium and magnesium-sparing properties of amiloride and spironolactone in diuretic-treated normal subjects. *Br J Clin Pharmacol* 35:373–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1381547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 11, 2014].
169. Li XC, Shao Y, Zhuo JL (2012) AT1a receptor signaling is required for basal and water deprivation-induced urine concentration in AT1a receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F746–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3468498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2014].
170. Rosa TT, Junqueira Júnior LF, Mangia FJ, Veiga JP, Pádua F V (1995) Effects of water deprivation on renal hydroelectrolytic excretion in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Rev Soc Bras Med Trop* 28:7–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724873> [Accessed May 11, 2014].

Abkürzungsverzeichnis

ADH	antidiuretisches Hormon, Adiuretin, Vasopressin, Arginin-Vasopressin (AVP)
AQP2	Aquaporin-2
BE	Basenüberschuss (Base Excess)
bp	Basenpaare
BK	Kalium-Kanal (Big Potassium oder auch Maxi-K)
CCD	kortikales Sammelrohr (cortical collecting duct)
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters (chinese hamster ovary cells)
CNT	Verbindungsstück (connecting tubule)
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cre	Enzym (causes recombination)
CTGF	connecting tubule glomerular feedback
DCT	distaler Tubulus (distal convoluted tubule)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Na ⁺ -Kanal (epithelial Na ⁺ -channel)
EP-2, EP-4	Prostaglandin E-Rezeptor 2 bzw. 4
gefloxt	floxed, flanked by loxP
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
hCMV	menschlicher Cytomegalovirus (human cytomegalovirus)
HCT	Hydrochlorothiazid
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 Zellen
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)
I.E.	Internationale Einheit
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KCNJ10	einwärtsgerichteter Kalium-Kanal J10
KCNJ16	einwärtsgerichteter Kalium-Kanal J16
KG	Körpergewicht
Ksp	kidney-specific
loxP	locus of crossing over (x), P1 (P1: Coliphage P1)
MCD	medulläres Sammelrohr (medullary collecting duct)
Mittel	Mittelwert

n	Anzahl (Probenzahl, Tiere im Versuch)
NCC	Na ⁺ /Cl ⁻ -Symporter
NCX1	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger 1
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
NKCC2	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Cotransporter
NLS	nuclear localization signal
Pax8	Paired-Box 8
PBS	Phosphate buffered saline
P-Domäne	porenbildende Domäne
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMCA1b	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase 1b
pp	postpartum, nach der Geburt
p-Wert	Signifikanzwert
PEV	Positionseffekt-Variation
PT	proximaler Tubulus
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROMK	Kalium-Kanal (renal outer medullary potassium channel)
rtTA	reverse Tetracycline-controlled transactivator
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SGLT1	Sodium/Glucose Cotransporter 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	dicke aufsteigende Henle-Schleife (thick ascending limb of Henle's loop)
TASK2	Kalium-Kanal (two-pore-domain potassium channel 2)
Tc	Tetracyclin, chemische Verbindung
Tet	Tetracyclin beim Tet Operon oder Tet Repressor
tetR	Tetracyclin Repressor
tetO	Tetracyclin Operator
TGF	tubuloglomeruläres Feedback
TM	Transmembrandomäne
TRE	Tetracycline-Response Element
TRPM6	Transient Receptor Potential Kationenkanal M6 (transient receptor potential melastatin 6)
TRPV5	Transient Receptor Potential Kationenkanal V5 (transient receptor potential vanilloid 5)
tTA	Tetracyclin-controlled transactivator

Eidesstattliche Erklärung

(1) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

(2) Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

(3) Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

(4) Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Maria Ripper

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in dieser Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet und unterstützt haben.

Zuerst geht mein Dank natürlich an Herrn Prof. Dr. Richard Warth, der es mir mit der Überlassung des Forschungsprojekts möglich gemacht, mich dieser Herausforderung zu stellen. Erst durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und seine Denkanstöße konnte das Projekt in dieser Weise bearbeitet werden. Durch seine Art schaffte er eine angenehme und trotzdem produktive Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Markus Reichold für die Betreuung und Korrektur meiner Arbeit. Er hat mir so viele wichtige Methoden beigebracht, mit mir neue Methoden getestet und mich oft bei der Versuchsdurchführung unterstützt.

Herr Dr. Sascha Bandulik war mir ebenfalls immer eine große Hilfe. Dankeschön für die Ideen und Anregungen zu meinem Projekt. Zusammen mit Ines Tegtmeier hat er gefühlte tausend Urinproben am Ionenchromatographen vermessen und analysiert. Ines war, ebenso wie Christina Sterner immer ein Ansprechpartner, wenn Methoden nicht funktioniert haben. Mit eurer Hilfe habe ich vieles dazugelernt. Ein weiterer Dank geht an Philipp Tauber für die Aldosteron-Messung und Dr. Katharina Ebert, die die GFR-Messung durchgeführt hat.

Ein herzliches Dankeschön an euch und alle anderen wissenschaftlichen Kollegen am Institut, besonders Evi, Carsten, Julia, dass ihr mich vor dreieinhalb Jahren mit offenen Armen in eurer Arbeitsgruppe aufgenommen habt. Mir ist durchaus bewusst, dass nicht in allen Arbeitsgruppen ein derart gutes Arbeitsklima herrscht. Durch euch wurden auch die anstrengenden Arbeitstage erträglich.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Weg immer und uneingeschränkt unterstützt hat. Ihr habt immer an mich geglaubt und wart daher nicht nur eine finanzielle sondern auch eine enorme mentale Stütze.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meinen Freund Alex, der diese Zeit mit all ihren Höhen und Tiefen zusammen mit mir durchlebt hat. Danke, dass du mir stets den Rücken freigehalten hast und immer die richtigen Worte der Motivation hattest.