

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Markus Bleich)  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**STÖRUNGEN IM RENALEN IONENTRANSPORT UND SÄURE-  
BASEN HAUSHALT DER  
CLAUDIN-16 DEFIZIENTEN MAUS**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

**BÖREN GÖRKE**

aus Neumünster

Kiel

2011

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Markus Bleich

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf

Tag der mündlichen Prüfung:

28.02.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epithelialer Transport.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tight Junctions .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 <i>Funktion und Aufbau der Tight Junction.....</i>	<i>2</i>
1.2.2 <i>Claudine .....</i>	<i>2</i>
<b>1.3 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose</b>	<b>4</b>
1.3.1 <i>Krankheitsbild.....</i>	<i>4</i>
1.3.2 <i>Assoziation der FHHNC mit Mutationen in Claudinen .....</i>	<i>4</i>
1.3.3 <i>Die Claudin-16 Knockdown Maus als Modell für FHHNC.....</i>	<i>5</i>
<b>1.4 Aufbau eines Nephrons.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Epithelialer Transport in der TAL .....</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Störungen des epithelialen Transports in der TAL in KD.....</b>	<b>7</b>
<b>1.7 Renaler Kalzium- und Magnesium-Transport.....</b>	<b>8</b>
1.7.1 <i>Kalziumtransport .....</i>	<i>8</i>
1.7.2 <i>Magnesiumtransport.....</i>	<i>9</i>
1.7.3 <i>Regulation des Magnesium- und Kalziumtransports .....</i>	<i>9</i>
<b>1.8 Renaler Natriumtransport.....</b>	<b>10</b>
1.8.1 <i>Proximaler Tubulus .....</i>	<i>10</i>
1.8.2 <i>Dicke aufsteigende Henle-Schleife.....</i>	<i>10</i>
1.8.3 <i>Distales Konvolut.....</i>	<i>10</i>
1.8.4 <i>Sammelrohr.....</i>	<i>11</i>
<b>1.9 Säure-Basen-Haushalt.....</b>	<b>11</b>
1.9.1 <i>Proximaler Tubulus .....</i>	<i>11</i>
1.9.2 <i>Dicke aufsteigende Henle-Schleife.....</i>	<i>11</i>
1.9.3 <i>Sammelrohr.....</i>	<i>12</i>
<b>1.10 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....</b>	<b>13</b>
<b>1.11 Prinzipien der Regulation von Proteinfunktionen.....</b>	<b>14</b>
<b>1.12 Zielsetzung .....</b>	<b>15</b>
1.12.1 <i>Elektrolytstörungen der Claudin-16 Knockdown Maus.....</i>	<i>15</i>
1.12.2 <i>Expressionsunterschiede .....</i>	<i>15</i>
1.12.3 <i>Säure-Base-Haushalt.....</i>	<i>15</i>
<b>2 Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Versuchstiere und Narkoseverfahren .....</b>	<b>16</b>

2.1.1	<i>Versuchstiere</i> .....	16
2.1.2	<i>Narkoseverfahren</i> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Material und Lösungen</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Tubulusperfusion</b> .....	<b>17</b>
2.3.1	<i>Tubuluspräparation und Isolation eines Sammelrohres</i> .....	17
2.3.2	<i>Der Perfusionsarbeitsplatz</i> .....	18
2.3.3	<i>Experimentelles Vorgehen</i> .....	19
2.3.4	<i>Auswertung der Messung</i> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Phänotypisierung mittels metabolischer Käfige</b> .....	<b>20</b>
2.4.1	<i>Metabolische Käfige</i> .....	20
2.4.2	<i>Bestimmung der Plasma- und Urinosmolalität</i> .....	21
2.4.3	<i>Bestimmung des Hämatokrits</i> .....	22
2.4.4	<i>Blut-Gas- und Urin-Gas-Analyse</i> .....	22
2.4.5	<i>Bestimmung von Plasma-, Urinelektrolyten, Kreatinin und Harnstoff</i> ..	22
<b>2.5</b>	<b>Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR</b> .....	<b>23</b>
2.5.1	<i>Tubuluspräparation und -sortierung</i> .....	23
2.5.2	<i>RNA Isolierung</i> .....	25
2.5.3	<i>cDNA Generierung</i> .....	27
2.5.4	<i>Quantitative Real-Time PCR</i> .....	27
2.5.5	<i>Auswertung</i> .....	28
<b>2.6</b>	<b>Fluoreszenz-Immunhistochemie</b> .....	<b>30</b>
2.6.1	<i>Perfusionsfixierung der Mäuse</i> .....	30
2.6.2	<i>Kryoschnittanfertigung</i> .....	31
2.6.3	<i>Fluoreszenzfärbung</i> .....	31
2.6.4	<i>Auswertung</i> .....	32
<b>2.7</b>	<b>SDS-PAGE und Western Blot</b> .....	<b>32</b>
2.7.1	<i>Probenmaterial und Homogenisierung</i> .....	33
2.7.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i> .....	33
2.7.3	<i>SDS-PAGE</i> .....	33
2.7.4	<i>Western Blot</i> .....	34
2.7.5	<i>Auswertung</i> .....	35
<b>2.8</b>	<b>Datenanalyse</b> .....	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Tubulusperfusion</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Phänotypisierung mittels metabolischer Käfige</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR</b> .....	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Fluoreszenz-Immunhistochemie</b> .....	<b>53</b>
<b>3.5</b>	<b>SDS-PAGE und Western Blot</b> .....	<b>55</b>

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
4.1	<b>Methoden .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	<i>Mausmodell.....</i>	<i>57</i>
4.1.2	<i>Tubulusperfusion.....</i>	<i>58</i>
4.1.3	<i>Metabolische Daten.....</i>	<i>58</i>
4.1.4	<i>Expressionsanalysen .....</i>	<i>59</i>
4.2	<b>Phänotyp der Claudin-16 defizienten Maus im klinischen Kontext .....</b>	<b>60</b>
4.2.1	<i>Claudin-Expression .....</i>	<i>62</i>
4.2.2	<i>Schlüsselsymptome .....</i>	<i>62</i>
4.2.3	<i>NaCl-Homöostase.....</i>	<i>64</i>
4.2.4	<i>Säure-Basen-Haushalt.....</i>	<i>65</i>
4.3	<b>Ausblick .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
7.1	<b>Abbildungen .....</b>	<b>79</b>
7.2	<b>Tabellen .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>81</b>
8.1.1	<i>Geräte .....</i>	<i>81</i>
8.1.2	<i>Reagenzien .....</i>	<i>82</i>
8.1.3	<i>Kits .....</i>	<i>84</i>
8.1.4	<i>Antikörper.....</i>	<i>84</i>
8.1.5	<i>Lösungen .....</i>	<i>85</i>
8.1.6	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>88</i>
8.1.7	<i>Software.....</i>	<i>88</i>
8.1.8	<i>Funktionsprinzip des Blut-Gas-Analysators.....</i>	<i>89</i>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>91</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-I-Konversionsenzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AE	Anionenaustauscher
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
AT	Angiotensin
aTL	dünne aufsteigende Henle-Schleife
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve)
BCA	Bicinchonin-Säure
BSA	Rinderalbumin (engl. bovine serum albumine)
CA	Carboanhydrase
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaSR	Kalziumsensitiver Rezeptor
CD	Sammelrohr
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
ClC-K	Chlorid-Kanal K
CLDN	Claudin
CT-Wert	Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle Threshold)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCT	Distaler gewundener Tubulus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dRTA	distale renal-tubuläre Azidose
ECaC	Epithelialer Kalziumkanal
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FE	Fraktionelle Exkretion
FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
gKG	Körpergewicht in Gramm
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HKG	'Housekeeping' Gen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
I <sub>sc</sub>	Äquivalenter Kurzschlussstrom
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül

---

K <sup>+</sup>	Kalium
KD	Claudin-16 Knockdown Maus
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBC	Natrium-Hydrogencarbonat-Symport
NCC	Natriumchlorid-Kotransporter
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NKCC2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter
OCLN	Occludin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Triton X-100 in Phosphat-gepufferter Salzlösung
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDS	Pendrin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PT	Proximaler Tubulus
PTH	Parathormon
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rn	normalisierte Reporter-Fluoreszenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks
RT	Reverse Transkriptase
R <sub>te</sub>	Transepithelialer Widerstand
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
sgk1	Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1
siRNA	small interfering RNA
TAL	dicke aufsteigende Henle-Schleife
TBS-T	Tween/Polysorbat 20 in Tris-gepufferter Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRP	TRP-Kanalfamilie
V <sub>te</sub>	Transepitheliales Potenzial
WT	Wildtyp Maus

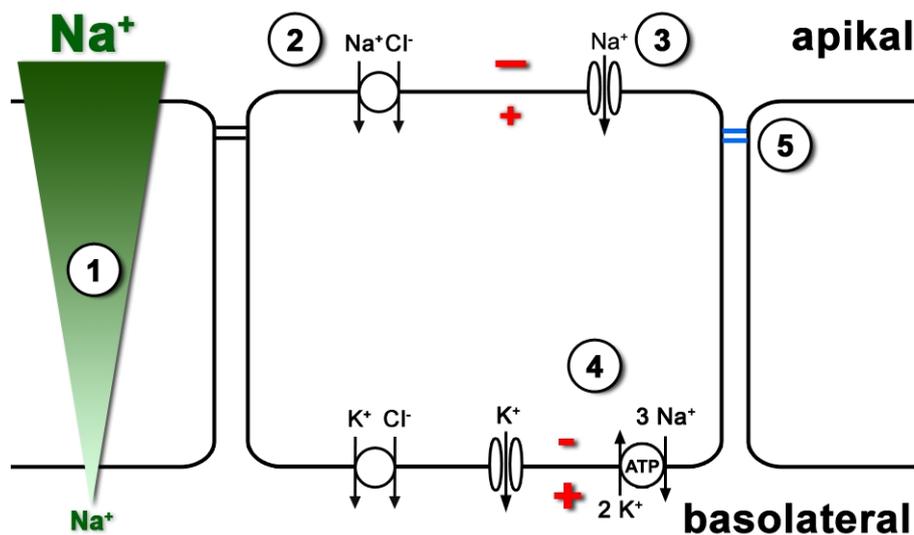
# 1 Einleitung

## 1.1 Epithelialer Transport

Epithelien sind Grenzflächen bildende Zellen, die verschiedene Kompartimente wie äußere Umgebung und Körperinneres von einander trennen.

Um die epitheliale Barriere zu überwinden, erfordert der Substrataustausch spezifische Transportsysteme. Diese werden zum einen durch chemische Triebkräfte, die durch Konzentrationsgradienten zwischen den Kompartimenten aufgebaut werden, zum anderen durch elektrische Triebkräfte vermittelt (siehe Abbildung 1).

Die Zell-Zell-Verbindungen unterteilen die Zellmembran in ein apikales, zur Körperaußen-seite gerichtetes, und ein basolaterales, zum Körperinneren gerichtetes Zellkompartiment.



**Abbildung 1:** Epitheliale Transportprozesse

Transportprozesse werden durch elektrochemische Gradienten angetrieben. Diese werden zum einen durch Konzentrationsdifferenzen zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment (Punkt 1: grüner Pfeil), dem chemischen Gradienten, und zum anderen durch die Polarisierung der Epithelzelle (rot), dem elektrischen Gradienten, aufgebaut. Die Polarität einer Zellmembran wird durch die Ausstattung mit Transportmolekülen beeinflusst. Für die Polarität der Membran ist neben der Verteilung dieser Moleküle entscheidend, ob diese elektroneutral (Punkt 2) oder elektrogen (Punkt 3 und 4) arbeiten. Dabei werden passive Kotransporter (Punkt 2) und Kanäle (Punkt 3) und aktive Pumpen wie die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Punkt 4) unterschieden. Aktive Pumpen, die unter Verbrauch von ATP entgegen einem elektrochemischen Gradienten arbeiten können, sind notwendig, damit es nicht zu einem endgültigen Ladungsausgleich und einem resultierenden Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten kommt. Zudem werden Pumpen für sekundär-aktive Transportprozesse (Punkt 2 und 3) benötigt. In diesem Beispiel treibt die basolaterale Ausschleusung von drei Natrium-Ionen die apikale Aufnahme des Natriums beziehungsweise von Natrium und Chlorid in die Zelle.

Neben diesen transzellulären Transportvorgängen gibt es auch parazelluläre Transportprozesse, wobei Ionen rein passiv entlang ihres elektrochemischen Gradienten zwischen den Zellen liegende Tight Junctions (Punkt 5) passieren.

Beide Membranseiten sind mit unterschiedlichen Transportmolekülen ausgestattet, welche an die jeweils notwendigen Transportprozesse angepasst sind. Durch diese unterschiedliche Ausstattung auf beiden Zellseiten und den resultierenden Transport von geladenen Molekülen und Ionen kommt es zu einer Polarisierung der Epithelzelle (siehe Abbildung 1).

Neben den beschriebenen molekülvermittelten transzellulären Transportvorgängen findet zusätzlich ein parazellulärer Transport unter Umgehung des Zellinneren statt. Dieser Transportvorgang ist rein passiv und wird durch den elektrochemischen Gradienten angetrieben, der zum einen durch die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Kompartimente und zum anderen durch die Zellpolarität aufgebaut wird.

## 1.2 Tight Junctions

### 1.2.1 Funktion und Aufbau der Tight Junction

Tight Junctions (Schlussleisten) sind ein unverzichtbarer Bestandteil des epithelialen Zellverbandes. Sie vermitteln neben den Adhärenskontakten und Desmosomen den Zell-Zell-Kontakt und sind für die zuvor beschriebene Polarisierung der Epithelzellen verantwortlich. Insbesondere aktive beziehungsweise sekundär-aktive Prozesse entgegen elektrochemischer Gradienten, die Energie in Form von ATP verbrauchen, würden ohne Tight Junctions kurzgeschlossen.

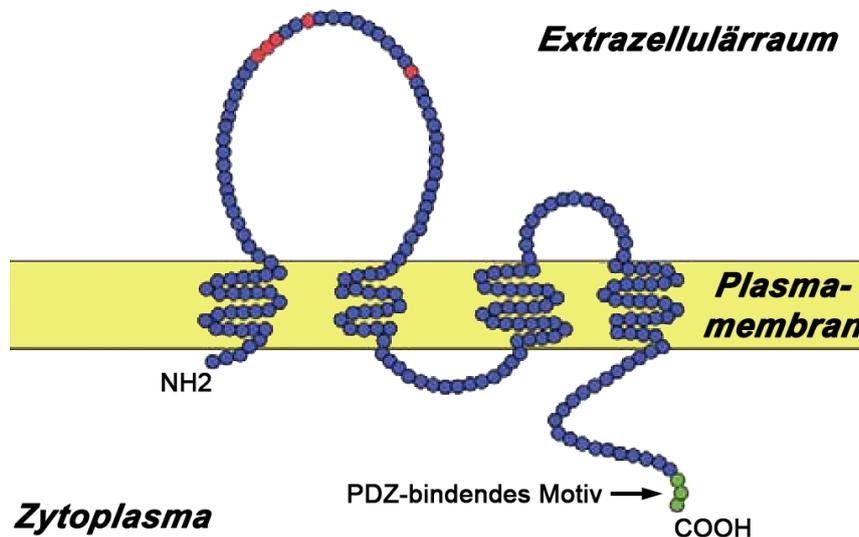
Entgegen der wörtlichen Übersetzung sind Tight Junctions keineswegs generell undurchlässig für Wasser und Elektrolyte. Die Permeabilität wird stark von ihrem Aufbau beeinflusst [1]. Tight Junctions sind heteromultimere Molekülkomplexe mit den Hauptkomponenten Occludinen (OCLN), Claudinen (CLDN) und junktionalen Adhäsionsmolekülen (JAM), die bei trizellulären Kontakten durch Tricellulin ergänzt werden [2]. Claudine und Occludine bilden dabei die molekulare Basis der Tight Junction [3]. Verbindungsmoleküle koppeln die Schlussleisten an das Zytoskelett der Zelle, was die Weiterleitung von Signalen in das Zellinnere ermöglicht.

Die Genfamilie der Occludine besteht aus fünf (OCLN I-IV und 1B [4, 5]) und die der junktionalen Adhäsionsmoleküle aus drei Mitgliedern (JAM A-C und 4). Claudine (Abbildung 2) bilden mit 24 Subtypen (Claudin 1-24) die vielfältigste Komponente der Tight Junction [1].

### 1.2.2 Claudine

Die verschiedenen Claudin-Subtypen vermitteln die Permeabilitätseigenschaften der Tight Junction. Somit wird die Permeabilität für Wasser und die spezifische Selektivität der Tight Junction durch das Expressionsmuster von Claudin-Subtypen bestimmt.

Die Vermittlung der Anionen- beziehungsweise Kationen-Selektivität [6] ist im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Bedeutung. Dabei weisen CLDN4 und 11 eine geringe Kationen-Permeabilität auf und CLDN2, 15 und 16 sind kationenselektiv [7, 8].

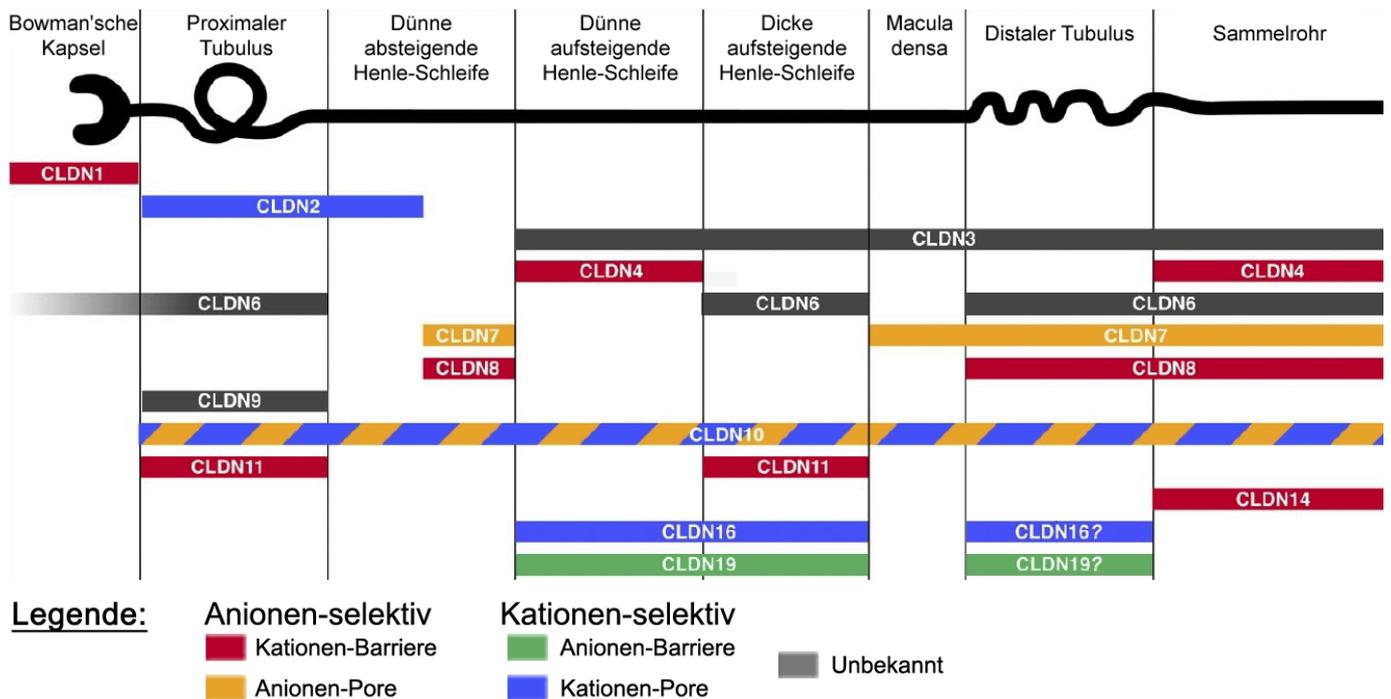


**Abbildung 2:** Grundaufbau der Claudin-Familie

Claudine sind 207 bis 296 Aminosäuren lange Proteine mit vier Transmembrandomänen. Die roten Markierungen zeigen konservierte Aminosäurereste (W-GLW-C-C) in der ersten extrazellulären Schleife. Am C-Terminus im Bereich der grünen Markierung befindet sich ein PDZ-bindendes Motiv; Abbildung modifiziert nach [1, 9]

Die Verteilung der Claudine weist zwischen verschiedenen Organen und auch innerhalb eines Organs ein spezifisches Verteilungsmuster auf. In der Niere sind in den verschiedenen Nephronsegmenten unterschiedliche Claudin-Kombinationen exprimiert (Abbildung 3). Für einige dieser Kombinationen konnte bereits gezeigt werden, dass diese an die spezifischen Aufgaben des betreffenden Segmentes angepasst sind [10].

Claudin-16 und -19 nehmen in ihrer Genfamilie innerhalb der Niere eine besondere Stellung ein. Sie sind hier ausschließlich in den aufsteigenden Anteilen der Henle-Schleife exprimiert. Mutationen in einem dieser Proteine können zu schweren Funktionsstörungen der Niere führen. Dieses konnte vor allem für die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose gezeigt werden (siehe 1.3.2) [11-13].



**Abbildung 3:** Verteilung der Claudin-Subtypen entlang des Nephrons  
Diese Abbildung zeigt eine Übersicht über die Expression und Selektivität der Claudin-Subtypen in den verschiedenen Segmenten eines Nephrons; Abbildung modifiziert nach [10, 14, 15]

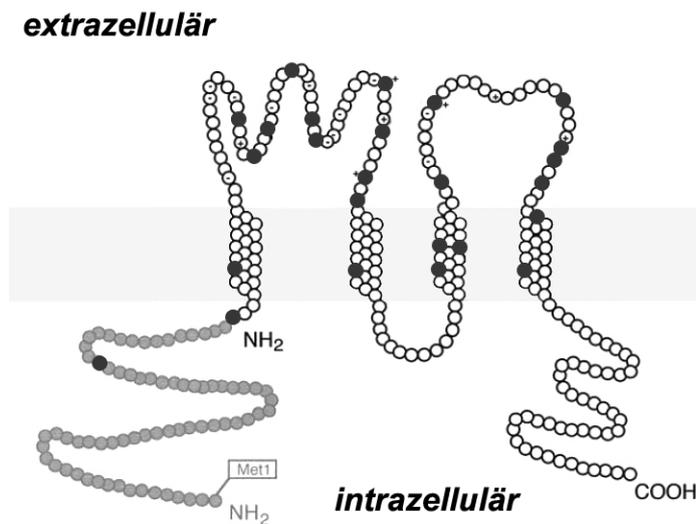
## 1.3 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose

### 1.3.1 Krankheitsbild

Die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die durch hohen renalen Verlust von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und Nierensteinbildung charakterisiert ist. Diese Störungen können neben einem Ungleichgewicht im Elektrolythaushalt eine frühzeitige Niereninsuffizienz nach sich ziehen [16, 17].

### 1.3.2 Assoziation der FHHNC mit Mutationen in Claudinen

Die Manifestation und Ausprägung der FHHNC ist an Mutationen in Genen geknüpft, die für die Tight Junction Proteine Claudin-16 (Abbildung 4) und Claudin-19 kodieren [18]. In einer multizentrischen Studie mit 71 Patienten aus 50 Familien wurden 29 verschiedene Mutationen im CLDN16 Gen nachgewiesen [19] und in einer weiteren Studie konnten Assoziationen zwischen CLDN19 Mutationen und der FHHNC ermittelt werden [11].



**Abbildung 4:** Häufige Claudin-16 Mutationen bei FHHNC

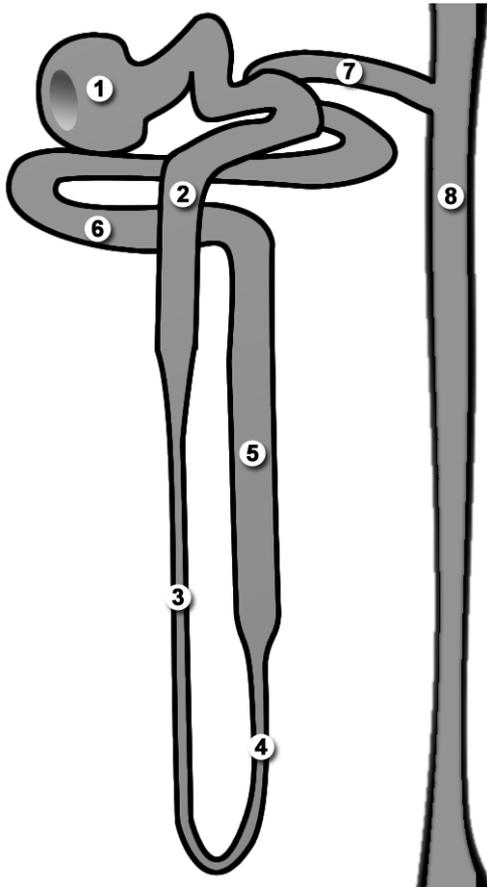
Grundstruktur von Claudin-16 mit den häufigsten humanen Mutationen bei vorliegender FHHNC (schwarz); Hierbei ist auffällig, dass ein Großteil der Mutationen in den extrazellulären Schleifen lokalisiert ist; Abbildung modifiziert nach [12, 19]

### 1.3.3 Die Claudin-16 Knockdown Maus als Modell für FHHNC

Auf der Basis der starken Assoziation zwischen einer manifesten FHHNC und Mutationen im CLDN16 Gen (siehe 1.3.2) wurde in der Arbeitsgruppe von Daniel A. Goodenough eine Claudin-16 Knockdown Maus (KD) generiert.

In der Erstbeschreibung teilt die KD die Hauptsymptome mit FHHNC Erkrankten. Sie weist eine erniedrigte Konzentration des Plasma-Magnesiums und eine erhöhte Urinausscheidung von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  auf. Zudem sind bei sechs Monate alten KD in der „von Kossa“ Färbung (Versilberung) Verkalkungen im Interstitium und entlang der Basalmembran von medullären Tubuli beschrieben [20].

## 1.4 Aufbau eines Nephrons



**Abbildung 5:** Aufbau eines Nephrons

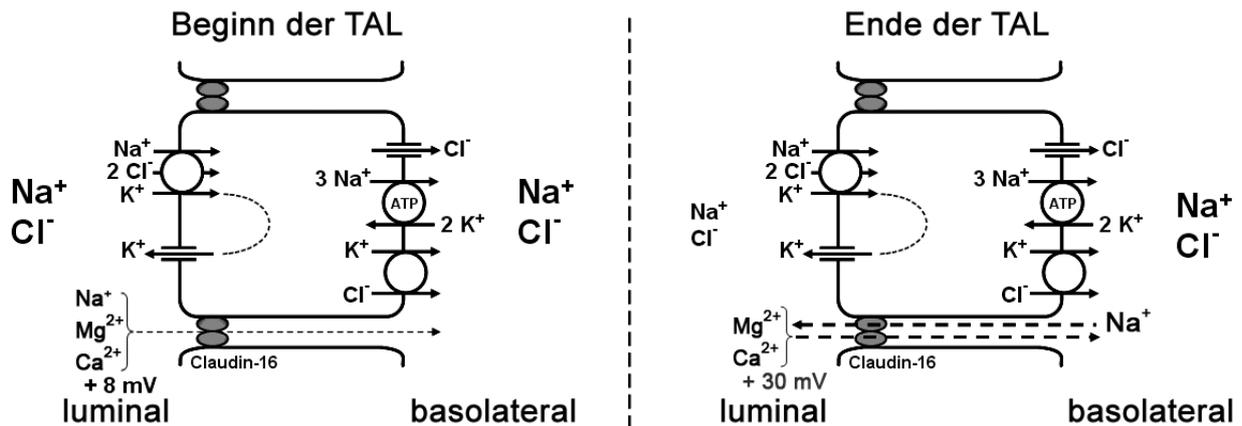
Nach Filtration im Glomerulus (1) strömt Primärharn durch den proximalen Tubulus (2) und die absteigende Henle-Schleife (3). In diesen Segmenten wird ein Großteil der Plasmaelektrolyte resorbiert und der Harn durch Wasserentzug aufkonzentriert.

In der wasserimpermeablen dünnen und dicken aufsteigenden Henle-Schleife (4+5) wird der zuvor konzentrierte Harn durch sekundär-aktive Resorption von NaCl verdünnt.

Anschließend werden im distalen Konvolut (6), dem Verbindungstubulus (7) und Sammelrohr (8) neben Wasser, weitere Harnbestandteile resorbiert und Urinpflichtige Substanzen sezerniert, bevor der Endharn über die ableitenden Harnwege ausgeschieden wird.

## 1.5 Epithelialer Transport in der TAL

In der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) wird nach Harnkonzentrierung in den vorgeschalteten Segmenten das luminal hoch konzentrierte Natriumchlorid transzellulär über den  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2) sekundär-aktiv resorbiert. Das über diesen Transportweg aufgenommene  $\text{K}^+$  rezirkuliert über einen luminalen Kaliumkanal (ROMK) [21]. Die luminalen Kalium- und basolateralen Chloridkanäle (ClC-K) führen zu einer Polarisierung der Epithelzellen in der medullanahen TAL und einem lumenpositiven Potenzial von circa +8 mV (Abbildung 6). Dieses Potenzial stellt eine Triebkraft für die parazelluläre  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption dar.



**Abbildung 6:** Transportmechanismen in der TAL

Durch die kontinuierliche sekundär-aktive Resorption von NaCl erhöht sich das zu Beginn der TAL niedrige lumenpositive Potenzial von +8 mV auf einen Wert von ungefähr +30 mV in den kortexnahen Abschnitten. Dieses hohe Diffusionspotenzial ist die Haupttriebkraft für die parazelluläre Resorption von Kationen (Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>), welche nur im Austausch mit Na<sup>+</sup> resorbiert werden können. Hierbei verhindert das kationenselektive Claudin-16 einen Rückstrom von unter ATP-Verbrauch resorbierten Anionen.

Durch die kontinuierliche NaCl-Aufnahme sinkt die luminal NaCl-Konzentration entlang der TAL. Über die Tight Junction kann dieser Konzentrationsgradient für Na<sup>+</sup> ein Diffusionspotenzial erzeugen. Dieses beträgt bis zu +30 mV und ist die Haupttriebkraft für die Resorption von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Zusammenfassend werden in diesem Segment Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> parazellulär im Austausch gegen Na<sup>+</sup> oder parallel zum transzellulär transportierten Cl<sup>-</sup> aufgenommen.

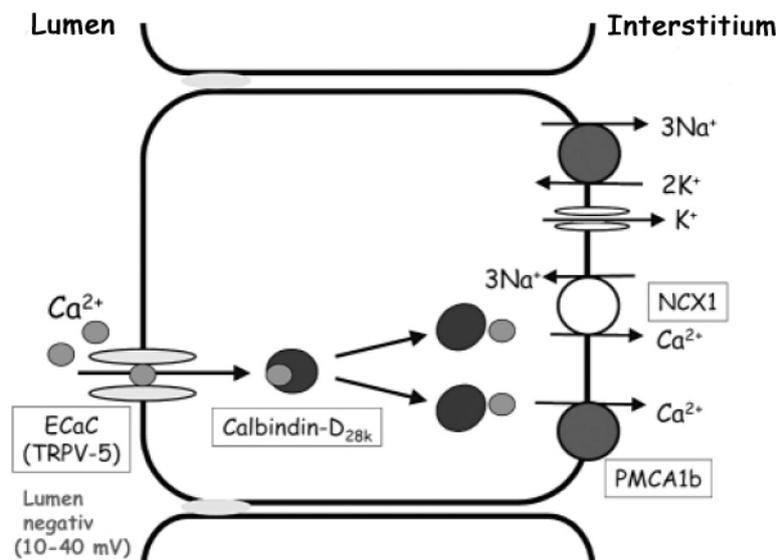
## 1.6 Störungen des epithelialen Transports in der TAL in KD

Dieser zuvor beschriebene Mechanismus funktioniert jedoch nur, solange Cl<sup>-</sup> nicht in gleicher Weise durch die Tight Junction entlang seines Gradienten diffundieren kann und somit ein Kurzschluss entstünde. Hierfür sind die parazellulären Kontakte in der TAL im Normalfall kationenselektiv. Dadurch können Kationen nur im gegenseitigen Austausch, und nicht mit Anionen gepaart, den parazellulären Weg passieren.

Diese Kationen-Selektivität wird durch Claudin-16 und -19 (siehe 1.2.2) vermittelt [7, 18, 20], welche integrale Bestandteile der Tight Junctions in diesem Segment sind.

Da in der KD jedoch Claudin-16 in der Tight Junction fehlt, geht die Kationen-Selektivität verloren. Dadurch diffundiert absorbiertes NaCl im Sinne eines Kurzschlusses entlang seines Konzentrationsgradienten direkt aus dem Interstitium in das Lumen zurück und deshalb kann das Diffusionspotenzial, welches die Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Absorption antreibt, nicht aufgebaut werden (Abbildung 7).





**Abbildung 8:** Transzellulärer Kalziumtransport im distalen Konvolut

Im distalen Konvolut wird Kalzium über den epithelialen Kalziumkanal TRPV5 (ECaC) aus dem Lumen in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär wird das Kalzium an Calbindin gebunden und basolateral über den Natrium-Kalzium-Austauscher NCX1 und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase PMCA1b von der Zelle in das Blut abgegeben; Abbildung modifiziert nach [22]

### 1.7.2 Magnesiumtransport

Die Henle-Schleife ist mit 50-70% neben PT (10-20%) und DCT (~12%) der Hauptresorptionsort für Magnesium. In der TAL erfolgt die Resorption wie zuvor beschrieben parazellulär. Wie auch beim Kalzium findet die Magnesiumresorption im DCT transzellulär statt. Dabei werden die Aufnahme über den apikalen Magnesiumkanal TRPM6 und die basolaterale Abgabe in das Blut über einen Natrium-Magnesium-Austauscher vermittelt [22-25].

### 1.7.3 Regulation des Magnesium- und Kalziumtransports

Das in der Nebenschilddrüse hergestellte Parathormon (PTH) stellt den Haupteinflussfaktor auf die renale Kalziumausscheidung dar. Es wirkt sowohl in der TAL als auch im DCT anti-calciuretisch. Die Parathormonausschüttung ist dabei über den kalziumsensitiven Rezeptor (CaSR) direkt an die Kalziumkonzentration im Blut gekoppelt. Die Hormone Vitamin  $\text{D}_3$  und Calcitonin wirken mit PTH gleichgerichtet, indem sie im DCT die Expression von TRPV5, Calbindin und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erhöhen und somit die Kalziumausscheidung vermindern [25, 26].

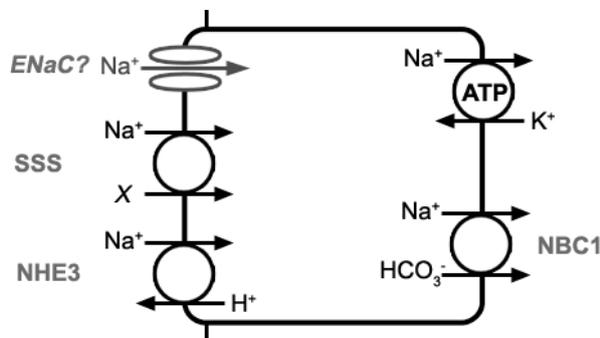
Neben der hormonellen Regulation bestehen in der Niere auch direkte funktionelle Rückkopplungsmechanismen über den CaSR, wobei dessen Aktivierung zu einer reduzierten Resorption von Kalzium führt [25, 27, 28].

Der Magnesiumtransport wird gleichsinnig über die Hormone PTH, Vitamin D<sub>3</sub> und Calcitonin reguliert. Ergänzend erhöhen auch Glukagon, Vasopressin und Prostaglandin E<sub>2</sub> die Magnesiumresorption [24].

Auch für Magnesium existieren direkte, renale Rückkopplungs- beziehungsweise Anpassungsmechanismen [29, 30]. Der CaSR wirkt hierbei ebenfalls hemmend auf die Magnesiumresorption [27]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass der parazelluläre Transport von Magnesium über Claudin-16 in der TAL durch eine Aktivierung des CaSR vermindert wird [31].

## 1.8 Renaler Natriumtransport

### 1.8.1 Proximaler Tubulus



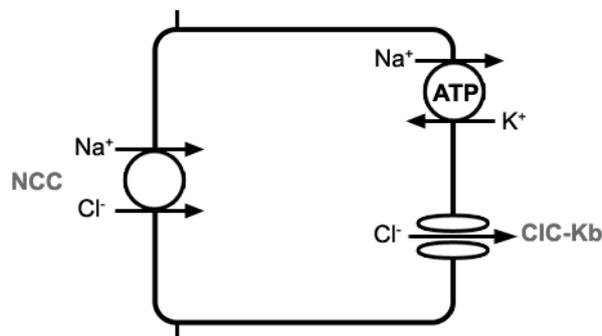
**Abbildung 9:** Natriumtransport im PT

Die Na<sup>+</sup>-Resorption im PT erfolgt sekundär-aktiv über Na<sup>+</sup>-Symportcarrier (SSS) im Kotransport mit organischen Substanzen wie Glukose und Aminosäuren (X), sowie über den Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher 3 (NHE3), welcher dadurch die Resorption von Hydrogencarbonat vermittelt. Diese Transportprozesse werden durch die basolaterale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase angetrieben. Ebenfalls wurde ein Amilorid-hemmbarer Kanal (ENaC) beschrieben [32].

### 1.8.2 Dicke aufsteigende Henle-Schleife

Siehe Abbildung 6 und Kapitel 1.5 „Epithelialer Transport in der TAL“.

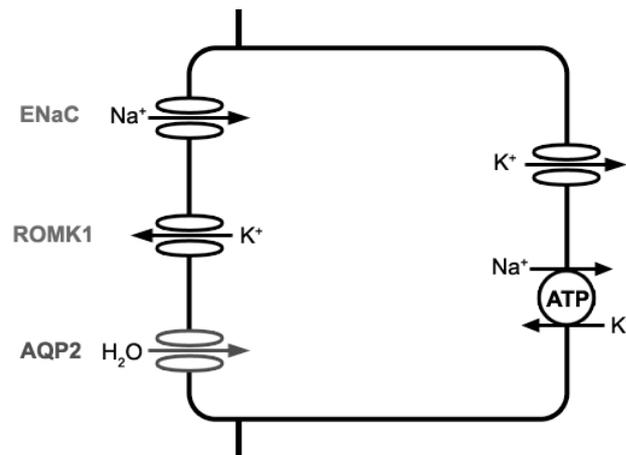
### 1.8.3 Distales Konvolut



**Abbildung 10:** Natriumtransport im DCT

Im distalen gewundenen Tubulus (DCT) erfolgt die Resorption von NaCl über den Thiazid-sensitiven NaCl-Kotransporter (NCC), wodurch etwa 5-7% des filtrierten Na<sup>+</sup> [33] resorbiert werden. Der NCC wird hormonell durch Aldosteron induziert und der Transport sekundär-aktiv durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase angetrieben. Das mitaufgenommene Chlorid verlässt die Zelle über den Chlorid-Kanal CIC-Kb. Wie auch für den basolateralen CIC-Ka in der TAL ist für eine uneingeschränkte Resorption von Chlorid die  $\beta$ -Untereinheit Barttin erforderlich. Eine Mutation dieser führt zum Krankheitsbild des Bartter-Syndroms [34, 35].

### 1.8.4 Sammelrohr



**Abbildung 11:** Natriumtransport im Sammelrohr

Im Sammelrohr (CD) wird das in vorgeschalteten Abschnitten nicht aufgenommene Na<sup>+</sup> über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) resorbiert. Dieser Prozess wird durch das antidiuretische Hormon (ADH), Aldosteron und atriales natriuretisches Peptid (ANP) präzise reguliert. Dabei führen ADH und Aldosteron auf der einen Seite zur Aktivierung und ANP auf der anderen Seite zur Hemmung des ENaC. Die Na<sup>+</sup>-Resorption wird durch die basolaterale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase angetrieben und geht mit luminaler Sekretion von K<sup>+</sup> (ROMK) einher. Dadurch führt Na<sup>+</sup>-Resorption in diesem Segment neben ATP-Verbrauch zu einem gleichzeitigen Verlust von K<sup>+</sup>.

Eine weitere Aufgabe des CD ist die Konzentrierung des Urins. Hierbei werden, über ADH vermittelt, luminal Typ 2 Aquaporine (AQP2) aus einem zellulären Pool in die Membran integriert, worüber dann transzellulär Wasser aufgenommen werden kann.

## 1.9 Säure-Basen-Haushalt

### 1.9.1 Proximaler Tubulus

Im proximalen Tubulus (PT) wird Hydrogencarbonat resorbiert. Die zytosmatische Carboanhydrase II katalysiert die Dissoziation von Wasser zu einem Proton und Hydroxid-Ion, welches mit Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat reagiert. Das entstandene Proton wird über den Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 in den Harn und das Hydrogencarbonat über den Natrium-Hydrogencarbonat-Symport NBC1 zur Blutseite abgegeben (Abbildung 9). Eine Aktivierung des NHE3 erfolgt zum einen über den Abfall des intrazellulären pH-Werts [34, 36] und zum anderen durch das Hormon Aldosteron [37].

### 1.9.2 Dicke aufsteigende Henle-Schleife

In der TAL kann über den Na<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup>-Kotransporter (NKCC2) anstelle von K<sup>+</sup> ein Ammoniumion und somit je ein Proton aufgenommen werden. Das aufgenommene Proton wird basolateral über den Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher 1 (NHE1) in das Interstitium abgegeben. Neben diesem transzellulären Transport kann Ammonium wie auch die anderen Kationen durch den parazellulären „Shunt“ (Nebenstrom) aufgenommen werden [38].

Kürzlich wurde der im PT exprimierte NHE3 auch in der medullären TAL beschrieben, wobei dieser zum einen durch NaCl-reiche Diät stimuliert [39] und zum anderen durch Aldosteron in seiner Aktivität gehemmt wird [40].

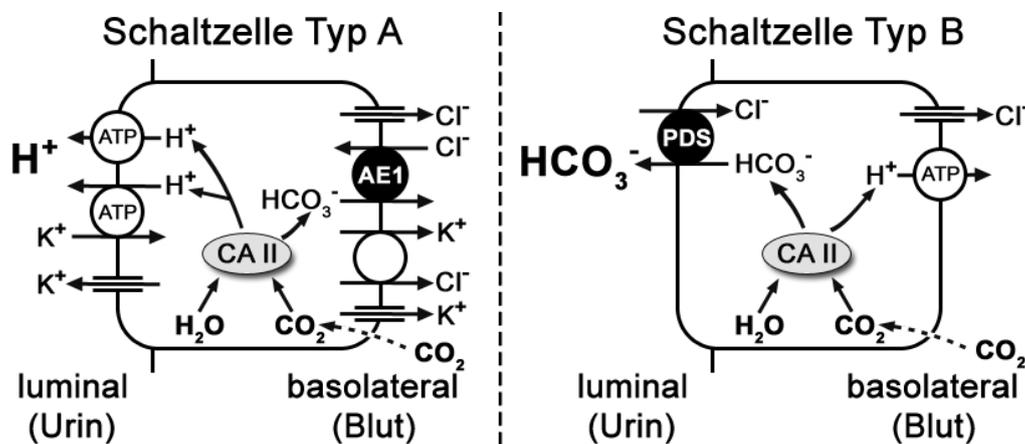
### 1.9.3 Sammelrohr

Das Sammelrohr (CD) nimmt eine zentrale Stellung in der Regulation des Säure-Basen-Haushalts ein. Dieses übernehmen vor allem die Schaltzellen Typ A und Typ B (Abbildung 12).

In Schaltzellen Typ A werden aktiv Protonen in das tubuläre Lumen gepumpt. Das bei der Generierung über Carboanhydrase Typ II (CA II) entstandene Hydrogencarbonat wird basolateral über den Anionenaustauscher 1 (AE1) in das Blut abgegeben.

Die Schaltzellen Typ B sezernieren passiv über den Anionenaustauscher Pendrin Hydrogencarbonat in das Lumen des Sammelrohres. Das aus der Carboanhydrase II (CA II)-Reaktion entstandene Proton wird basolateral aktiv abgegeben.

Die Regulation des Säure-Basen-Transportes in den Schaltzellen ist stark an die Gesamtkörper-Homöostase gekoppelt. So führen exogene Zufuhr von Hydrogencarbonat und auch eine metabolische Alkalose zu einer Zunahme der Pendrin Aktivität und Expression [41, 42].



**Abbildung 12:** Schaltzellen im Sammelrohr

Schaltzellen Typ A (links) sezernieren luminal aktiv Protonen durch die V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase und P-Typ H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Das in der Carboanhydrase Typ II (CA II)-Reaktion entstandene Hydrogencarbonat wird über den basolateralen Anionenaustauscher 1 (AE1) an das Blut abgegeben.

Entgegengesetzt sezernieren Schaltzellen Typ B (rechts) über Pendrin (PDS) luminal passiv Hydrogencarbonat und pumpen aktiv das aus der CA II-Reaktion entstandene Proton in das Blut.

Die CA II ist stellvertretend für verschiedene renale Carboanhydrase Isoformen gezeigt. Diese Isoform trägt zu über 95 Prozent an der CA-Aktivität in der Niere bei [43].

Umgekehrt führt eine Azidose zu einer verminderten Expression und einer Verlagerung der Pendrin-Proteine von der apikalen Membran in das Zytosol [41]. Die Expression von AE1 ist

eng an die Kaliumzufuhr geknüpft. So führt die Restriktion der Kaliumaufnahme über drei Wochen in Ratten zu einer um etwa 500% gesteigerten kortikalen AE1 Expression und 70% Steigerung derselben im äußeren Nierenmark [44].

### **1.10 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

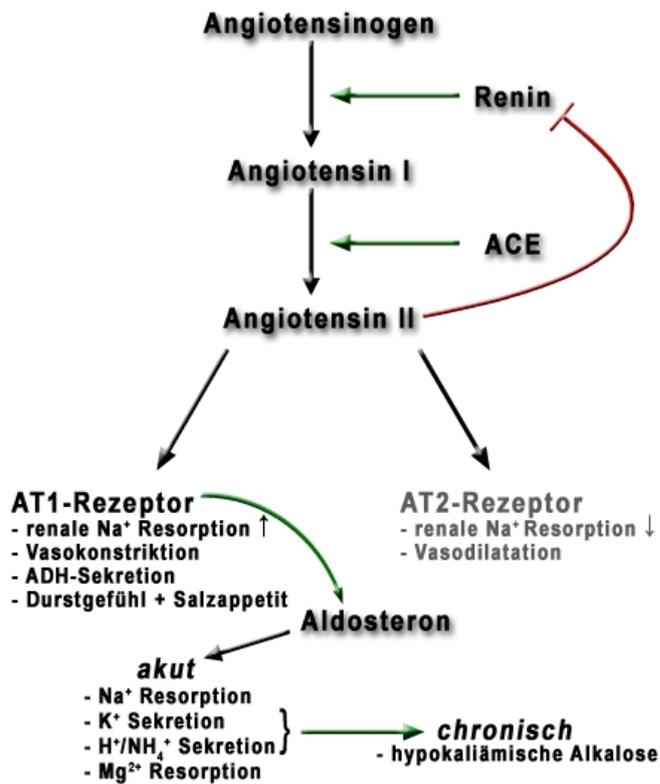
Renin ist eine in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates gebildete Protease, die den ersten Schritt der proteolytischen Kaskade von Angiotensinogen zu Angiotensin II einleitet (Abbildung 13). Hierbei wird zunächst das primär in Leber und Fettgewebe synthetisierte Glykoprotein Angiotensinogen im Plasma durch Renin zu Angiotensin I gespalten. Dieses wiederum wird durch das Angiotensin-I-Konversionsenzym (ACE) auf acht Aminosäuren zu Angiotensin II (AT II) verkürzt.

Die Wirkungen von AT II werden vor allem über AT1-Rezeptoren vermittelt. AT II führt zu einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Resorption im PT, Vasokonstriktion und einer erhöhten ADH-Sekretion, die mit Durstgefühl und Salzappetit einhergeht.

Zusammenfassend vermittelt der AT1-Rezeptor eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens und des Blutdrucks. Der AT2-Rezeptor wirkt dem Einfluss des AT1-Rezeptors entgegen, seine Wirkungen sind jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt [45, 46].

Überdies findet eine negative Rückkopplung auf die Renin-Sekretion statt. Zudem wird die Produktion von Aldosteron in der Nebennierenrinde durch AT II stimuliert.

Aldosteron ist ein steroidales Mineralokortikoid. Es stimuliert vor allem die renale, spät-distale  $\text{Na}^+$ -Resorption, welche mit gleichzeitiger  $\text{K}^+$ -Sekretion einhergeht (siehe Abbildung 11). Daneben führt Aldosteron zu einer erhöhten  $\text{Mg}^{2+}$ -Resorption sowie Protonen- und Ammonium-Sekretion. Dieses führt bei langfristig erhöhten Aldosteron-Konzentrationen zu einer hypokaliämischen, metabolischen Alkalose [47].



**Abbildung 13:** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

In einer proteolytischen Kaskade wird Angiotensinogen durch Renin und Angiotensin-I-Konversionsenzym (ACE) zu Angiotensin II gespalten, welches über AT1/2-Rezeptoren seine Wirkungen vermittelt und negativ auf die Renin-Sekretion rückkoppelt.

Über AT1-Rezeptoren wird ebenfalls die Aldosteronproduktion stimuliert, wobei die akuten und chronischen Wirkungen von Aldosteron aufgeführt sind.

### 1.11 Prinzipien der Regulation von Proteinfunktionen

Die Aktivität von Proteinen kann auf verschiedenen Ebenen innerhalb einer Zelle reguliert werden. Zunächst kann die Expression der DNA gehemmt oder gesteigert werden. Über diesen Regulationsweg entfaltet das Hormon Aldosteron einen Teil seiner Wirkungen [48].

Weiterhin können posttranslationale Modifikationen den Funktionszustand eines Proteins beeinflussen. Proteine können posttranslational glykosyliert, phosphoryliert oder ubiquitinyliert werden, dabei wird Glukose, Phosphat oder Ubiquitin an das Protein gekoppelt und darüber dessen Aktivität oder Vorhandensein auf der Zelloberfläche vermindert oder auch erhöht. Die Regulation der Proteinfunktion in der Membran erfolgt auf der Ebene des Transportes innerhalb der Zelle, der Interaktion mit anderen Proteinen oder des vorzeitigen Proteinabbaus. Ein Beispiel ist die Aldosteron-induzierte Kinase sgk1, welche durch Phosphorylierung neben anderen Zielproteinen die Kanäle ENaC und ROMK stimuliert [49] oder die posttranslationale Modifikation von AQP2 [50].

Ein weiteres Beispiel der Proteinregulation durch die Beeinflussung des so genannten Membran-„Trafficking“ ist die Wirkung von Vasopressin auf das Protein AQP2 im Sammelrohr. Dabei liegen AQP2-Moleküle ohne Vasopressin-Wirkung in intrazellulären Vesikeln

---

vor und werden unter der Hormonwirkung in die Zellmembran integriert und entfalten dort ihre Wirkung [51, 52].

## **1.12 Zielsetzung**

### **1.12.1 Elektrolytstörungen der Claudin-16 Knockdown Maus**

Die Claudin-16 Knockdown Maus ist ein wichtiges Mausmodell um ein tieferes Verständnis für die Erkrankung FHHNC zu gewinnen. Diese ist vor allem durch den renalen Verlust von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  sowie durch Nierensteine gekennzeichnet.

In dieser Arbeit sollen aufbauend auf ersten Untersuchungen [20] Störungen der Elektrolyt-homöostase erfasst werden, um darüber eine erweitertes Bild des Phänotyps zu erhalten.

### **1.12.2 Expressionsunterschiede**

Darauf aufbauend soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit der Knockdown von Claudin-16 und damit verbundene Störungen des Elektrolytgleichgewichtes das renale Expressionsmuster von Transportproteinen beeinflussen.

### **1.12.3 Säure-Base-Haushalt**

Basierend auf erhöhten Aldosteronspiegeln in ersten Untersuchungen des Claudin-16 Knockdown Mausmodells (KD:  $662,4 \pm 50,3$  vs. WT:  $402,0 \pm 94,1$  pg/ml;  $p < 0.05$ ,  $n=5$  [20]) soll in dieser Arbeit der Säure-Basen-Haushalt, sowie die renale Expression der involvierten Proteine NHE3, AE1 und Pendrin analysiert werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Narkoseverfahren

#### 2.1.1 Versuchstiere

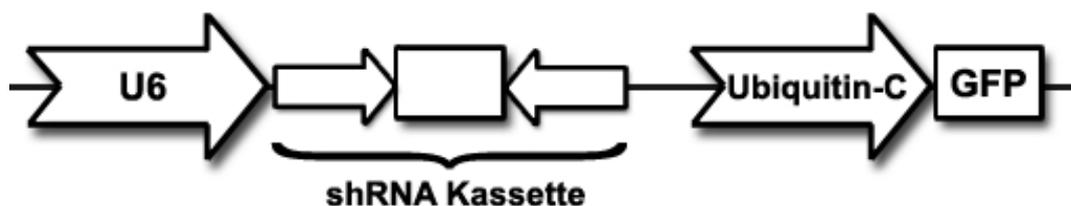
Als Versuchstiere dienten Claudin-16 Knockdown Mäuse. Dieser transgene Mausstamm wurde in der Arbeitsgruppe von Daniel A. Goodenough aus dem Department of Cell Biology der Harvard Medical School generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In das Genom dieser Mäuse wurde die genetische Information für eine Claudin-16 spezifische small-hairpin siRNA unter dem U6-Promotor integriert. Diese siRNA führte in den Claudin-16-exprimierenden Zellen der TAL sehr effektiv zu einer Reduzierung der Claudin-16-Proteinexpression unter die Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz [20].

Als Marker-Gen wurde zusätzlich die genetische Information für das GFP unter dem Ubiquitin-C-Promotor in das Genom eingebracht (Abbildung 14). Dieses Protein, das in nahezu allen Körperzellen exprimiert wird, kann zur Genotypisierung mit Hilfe einer 480 nm Taschenlampe und 520 nm Bandpassfilter (Nightsea, MA) sichtbar gemacht werden.

Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgten im Tierhaus des Physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und durchliefen einen 12 Stunden Lichtzyklus. Für Zucht, Haltung und Durchführung der Versuche lag eine entsprechende Genehmigung vor.

Makroskopische renale Erkrankungen der Mäuse wie massive Zystennieren sowie Verletzungen durch Rangordnungskämpfe führten zu einem Ausschluss von drei Versuchstieren.



**Abbildung 14:** Claudin-16 Knockdown Vektorkonstrukt

Dieses Vektorkonstrukt enthält einen U6 Promotor für die small-hairpin CLDN16 siRNA und einen weiteren Ubiquitin-C Promotor für das zur Genotypisierung genutzte GFP („green fluorescence protein“). Der Vektor wurde mittels lentiviraler Transduktion in Mäuseembryonen eingebracht, worauf diese in pseudo-schwangere Mäuse implantiert und ausgetragen wurden [20, 53].

### **2.1.2 Narkoseverfahren**

Die Versuchstiere wurden zur Organ- und Blutentnahme durch Maskennarkose unter Verwendung des Inhalationsanästhetikums Isofluran (Forene – Abbott, Wiesbaden, D) in Narkose versetzt. Nach einer initialen Atemluftkonzentration von 5,0 vol% Isofluran, wurde die Erhaltungsdosis an das Körpergewicht adaptiert (2,2 - 2,5 vol%). Hierbei erfolgte die Dosisanpassung mit einem Isofluran Vaporisator (Vapor 19.n – Dräger, Lübeck, D).

## **2.2 Material und Lösungen**

Eine detaillierte, alphabetische Auflistung über genutzte Geräte, Reagenzien, Kits, Lösungen, Antikörper und Verbrauchsmaterialien findet sich im Anhang (Kapitel 8).

## **2.3 Tubulusperfusion**

Die transepitheliale elektrische Messung in isoliert perfundierten Nierentubuli ist technisch sehr aufwändig und erfordert jahrelange Übung. Aus diesem Grund wurden diese Experimente von Dr. Qixian Shan durchgeführt. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgte gemeinsam.

### **2.3.1 Tubuluspräparation und Isolation eines Sammelrohres**

Nach Durchführung des zuvor beschriebenen Narkoseverfahrens (siehe 2.1.2) wurde der Exitus durch Dekapitation herbeigeführt. Danach wurden beide Nieren mit Hilfe von Präparationsbesteck entnommen und in eine Kulturschale mit Gewebe-protektiver Dissektionslösung (siehe 8.1.4) überführt.

Unter Nutzung von zwei feinen Pinzetten wurde zunächst die Kapsel einer Niere entfernt und diese mit einer Skalpellklinge in feine, transversale Scheiben (0,2-0,4 mm) zerteilt. Diese wurden erneut in Dissektionslösung gegeben.

Ein einzelnes Scheibchen wurde in eine weitere Kulturschale überführt und auf einer mittels Wasserbad gekühlten und Kaltlicht beleuchteten Oberfläche unter stereomikroskopischer Vergrößerung in einzelne Tubulussegmente aufgetrennt. Hierfür wurden zwei Dumont #5 Schneidpinzetten eingesetzt.

Die Identifikation einzelner Segmente erfolgte dabei anhand histomorphologischer Kriterien. Nach Isolation mehrerer Sammelrohre, die Verzweigungen in ihrem Verlauf aufweisen, wurde ein geeignetes Sammelrohr über eine Pipette an den Perfusionsarbeitsplatz transportiert. Bei der Auswahl waren vor allem Länge und Integrität entscheidend.

### 2.3.2 Der Perfusionsarbeitsplatz

Das Sammelrohr wurde durch eine doppelläufige Perfusionspipette perfundiert. Diese besaß zwei Schenkel, wobei über den einen Schenkel das transepitheliale Potenzial ( $\Delta V_{te}$ ) gegen die Badlösung gemessen wurde und über den zweiten Schenkel ein Strompuls definierter Größe appliziert werden konnte.

Die Injektion von rechteckigen Stromimpulsen bekannter Größe ( $I_0$ ) über einen Pulsgenerator und die zeitgleiche Registrierung der Spannungsauslenkung ( $\Delta V_{te}$ ) ermöglichen die Berechnung des transepithelialen Widerstands ( $R_{te}$ ) nach Korrekturen für den Leerwert:

$$\Delta V_{te} = \Delta V_{te \text{ gesamt}} - \Delta V_{te \text{ Leerwert}}$$

Durch den aufgezwungenen Strom verhält sich ein Tubulus ähnlich wie ein Kabel, wobei die Spannung entlang des Kabels abfällt.  $R_{te}$  wird in diesem Fall nach folgender Kabelgleichung [54] berechnet:

$$R_{te} = 2 \sqrt{\pi \rho \lambda^3 \frac{\Delta V_{te}}{I_0} \tanh \frac{L}{\lambda}} \quad [\Omega \text{ cm}^2]$$

Hierbei sind  $\rho$  der spezifische elektrische Widerstand des Perfusates,  $L$  die Tubuluslänge und  $\lambda$  die Längenkonstante, die sich aus folgender Formel ergibt:

$$\lambda = \frac{\Delta V_{te} \pi r^2}{I_0 \rho} \quad \text{für } L/\lambda > 3 \text{ [cm]}$$

Bei der Größe  $r$  handelt es sich um den inneren Radius des Tubulus.

Mit den nun bekannten Größen  $V_{te}$  und  $R_{te}$  ließ sich der äquivalente Kurzschlussstrom ( $I'_{sc}$ ) nach dem Ohmschen Gesetz berechnen:

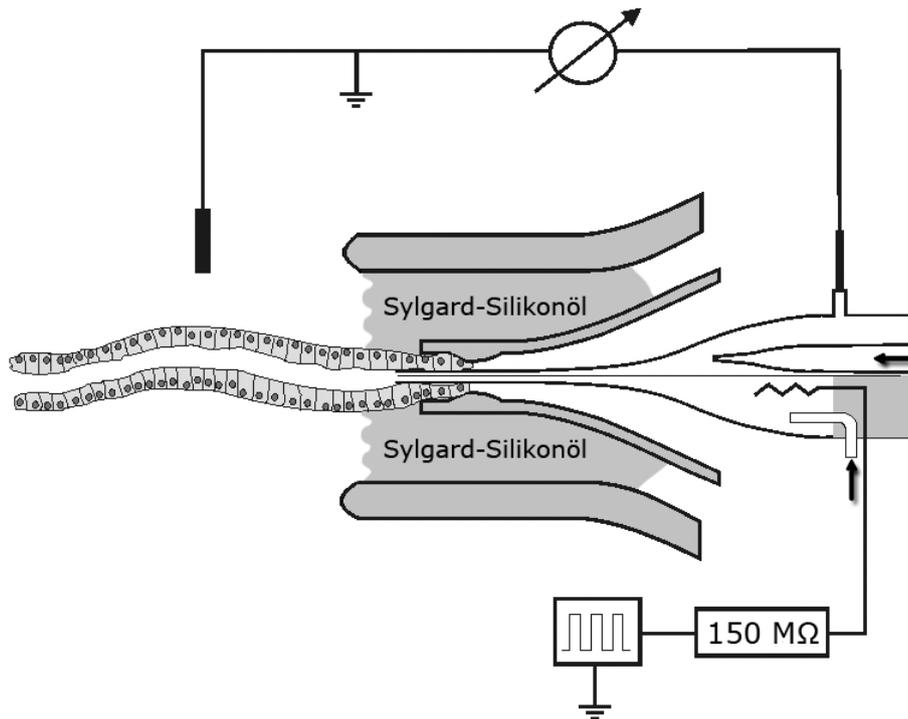
$$I'_{sc} = V_{te} / R_{te} \quad [\mu\text{A}/\text{cm}^2]$$

Die Spannung  $\Delta V_{te}$  wurde mit Hilfe eines Messverstärkers amplifiziert und mit einem Papierstreifen aufgezeichnet.

Über beide Schenkel der Perfusionspipette konnte der Tubulus mit getrennten Lösungen perfundiert werden. Die Perfusionspipette war von einer Konstriktionspipette umgeben, welche den Tubulus ansaugte und während der Perfusion fixierte.

Eine Sylgard-Pipette umschloss als äußerste alle anderen Pipetten und dichtete den Tubulus elektrisch gegen das Bad ab (Abbildung 15), wenn sie mit Sylgard-Silikonöl gefüllt über den perfundierten Tubulus geschoben wurde.

Die Kontrolle der histomorphologischen Intaktheit des Tubulus, der Perfusion sowie die Messung der Tubuluslänge und des inneren Radius erfolgten über einen Computer, der mittels einer angeschlossenen Kamera das Mikroskopsichtfeld darstellte.



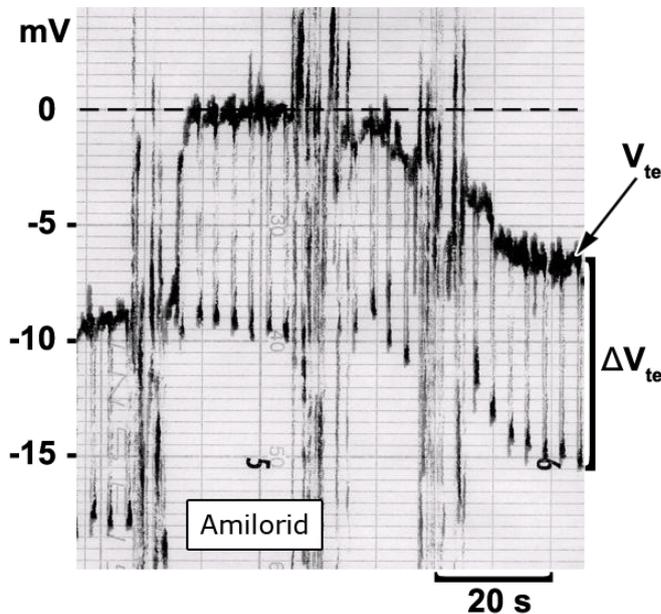
**Abbildung 15:** Schematische Übersichtsskizze des Tubulusperfusionsaufbaus

Eine doppel-läufige Perfusionspipette wird zur Perfusion in den Tubulus eingeführt (rechts). Durch einen Schenkel erfolgen Strominjektionen (Injektionselektrode und Pulsgenerator mit Vorwiderstand unten) und durch den anderen die Spannungsmessung (Badelektrode, Messelektrode und Messverstärker oben). Beide Schenkel verfügen über die Möglichkeit der Perfusion (Pfeile). Zum Ansaugen und Fixieren des Tubulus dient eine Konstriktionspipette, von der die doppel-läufige Perfusionspipette umschlossen wird. Die äußerste Sylgard-Pipette dichtet den Tubulus in diesem System elektrisch gegen das Bad ab, wenn sie mit Sylgard-Silikonöl gefüllt, nach vorn über den perfundierten Tubulus geschoben wird; Abbildung modifiziert nach freundlicher Genehmigung von Dr. Qixian Shan

### 2.3.3 Experimentelles Vorgehen

Nach erfolgreicher Perfusion des Sammelrohres und dem Start der elektrophysiologischen Messung wurde dieses zunächst auf beiden Seiten mit Kontrolllösung (siehe 8.1.4) perfundiert. Nach Erreichen eines stabilen  $V_{te}$  wurde der luminalen Perfusionslösung Amilorid ( $10 \mu\text{M}$ ) zugefügt. Nach erneuter Stabilisierung von  $V_{te}$ , wurde die Amilorid-haltige Lösung erneut gegen Kontrolllösung ausgetauscht, um die Reversibilität der Wirkung zu prüfen. Da Amilorid ein selektiver Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC) ist, korreliert die Änderung des  $I_{sc}$  mit dem elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Transport durch diesen Kanal.

### 2.3.4 Auswertung der Messung

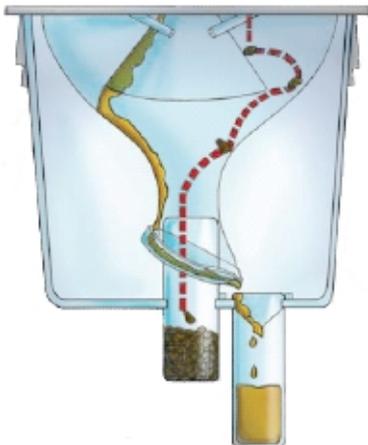


**Abbildung 16:** Originalexperiment einer Tubulusperfusion mit transepithelialer Spannung ( $V_{te}$ ). Ein Stromimpuls ( $I_0$ ) von 13 nA führt zu der Spannungsänderung ( $\Delta V_{te}$ ). In diesem Beispiel ist die Amilorid-Wirkung auf das Sammelrohr einer Claudin-16 Knockdown Maus gezeigt.

## 2.4 Phänotypisierung mittels metabolischer Käfige

### 2.4.1 Metabolische Käfige

Zur Bestimmung metabolischer Parameter wurden KD sowie jeweils in Alter und Geschlecht übereinstimmende Kontrolltiere in Stoffwechselkäfigen (siehe 8.1.1) untersucht.



**Abbildung 17:** Funktionsprinzip eines metabolischen Käfigs. In einem metabolischen Käfig befinden sich die Versuchstiere auf einem Gitter mit einem Durchmesser von etwa 30 cm. Im Randbereich können sie Futter und Trinkwasser erreichen. Fäzes werden durch ein Trichtersystem in einen Auffangbehälter für Kot geleitet; der Urin fließt entlang des Trichters getrennt in ein zweites Auffanggefäß; Abbildung modifiziert nach Tecniplast Internetauftritt

Die Versuchstiere waren hierbei zwischen 6 und 7 Monate alt und verblieben während der Experimente über 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig. Jeder Maus wurde in diesem Zeitraum ein Überschuss an Futtermittel bekannten Gewichtes und Trinkwasser (Wasserwerk Schulensee – SWKiel Netz, Kiel, D) zur Verfügung gestellt.

Jedes Versuchstier wurde zwischen 9 Uhr und 10 Uhr gewogen und in den metabolischen Käfig überführt.

Am Folgetag um die gleiche Zeit erfolgten eine zweite Gewichtsbestimmung von Maus Futtermittel und Trinkwasser. Überdies wurden Fäzes und Urin gesammelt und gewogen. Aus diesen Parametern wurden folgende, auf das Körpergewicht bezogene, metabolische Grundparameter errechnet:

$$\text{Trinkwasseraufnahme } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] = \frac{\text{Trinkwasservolumen } 0\text{h } [\mu\text{l}] - \text{Trinkwasservolumen } 24\text{h } [\mu\text{l}]}{\text{Körpergewicht } [\text{g}]}$$

$$\text{Urinfluss } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] = \frac{\text{Urinvolumen nach } 24\text{h } [\mu\text{l}]}{\text{Körpergewicht } [\text{g}]}$$

$$\text{Futtermittelaufnahme } [\text{mg}/24\text{h}/\text{gKG}] = \frac{\text{Futtermittel } 0\text{h } [\text{mg}] - \text{Futtermittel } 24\text{h } [\text{mg}]}{\text{Körpergewicht } [\text{g}]}$$

$$\text{Fäkale Exkretion } [\text{mg}/24\text{h}/\text{gKG}] = \frac{\text{Fäzesmasse (nach Trocknung) nach } 24\text{h } [\text{mg}]}{\text{Körpergewicht } [\text{g}]}$$

#### 2.4.2 Bestimmung der Plasma- und Urinosmolalität

Im Anschluss wurden die Tiere an einen Operationsarbeitsplatz überführt. Nach Durchführung der zuvor beschriebenen Narkose (siehe 2.1.2) wurde die Aorta chirurgisch freipräpariert. Mittels einer heparinisierten Kanüle und Spritze erfolgte eine maximale Blutentnahme. Mit einer weiteren Spritze wurde verbliebener Blasenurin entnommen.

Das Vollblut wurde zur Trennung von zellulären Bestandteilen und Plasma zunächst bei 4.000 xg für 4 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt.

Plasma- und Urinosmolalität wurden darauffolgend mittels Gefrierpunktserniedrigung in einem Osmometer ermittelt. Unter Einbeziehung dieser Messwerte wurden die osmotische und die Freiwasser-Clearance, die eine Aussage über den Hydrationszustand des Körpers erlauben, errechnet.

$$\text{Osmotische Clearance } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] = \text{Urinfluss } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] * \left( \frac{\text{Osmolalität}_{\text{Urin}} [\text{mOsm}/\text{kg}]}{\text{Osmolalität}_{\text{Plasma}} [\text{mOsm}/\text{kg}]} \right)$$

$$\text{Freiwasser - Clearance } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] = \text{Urinfluss } [\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}] * \left( 1 - \frac{\text{Osmolalität}_{\text{Urin}} [\text{mOsm}/\text{kg}]}{\text{Osmolalität}_{\text{Plasma}} [\text{mOsm}/\text{kg}]} \right)$$

### 2.4.3 Bestimmung des Hämatokrits

Vollblut wurde in einer Mikro-Hämatokrit-Kapillare aufgezogen und zwei Minuten bei 14.000 xg zentrifugiert. Zur Berechnung des Hämatokrits wurden die Länge der Erythrozytensäule und die Länge der gesamten Blutsäule mit einem Millimetermaß bestimmt:

$$\text{Hämatokrit [\%]} = \frac{\text{Erythrozytensäule [mm]}}{\text{gesamte Blutsäule [mm]}} \cdot 100\%$$

### 2.4.4 Blut-Gas- und Urin-Gas-Analyse

Um eine Äquilibration mit der Raumluft zu vermeiden, wurden pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ) unmittelbar nach Probenentnahme in heparinisierten Kapillaren mit einem Blutgasvollautomaten bestimmt.

Das aktuelle Hydrogencarbonat wurde über die umgestellte Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet:

$$\text{aktuelles } HCO_3^- \text{ [mmol/l]} = 10^{\text{pH} - 6.1 + \log_{10}(0,03 * pCO_2 \text{ [mmHg]})}$$

Eine ausführliche Beschreibung des Funktionsprinzips der einzelnen Sonden im Blut-Gas-Analysator findet sich im Anhang (Kapitel 8.1.8).

### 2.4.5 Bestimmung von Plasma-, Urinelektrolyten, Kreatinin und Harnstoff

Die vorübergehend bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerten Plasma- und Urinproben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden im „Hitachi Modular Analyser“ des Zentrallabors des UK-SH, Campus Kiel die Konzentrationen folgender Stoffe mittels nebenstehender Analyseverfahren ermittelt:

**Tabelle 1:** Analyseverfahren

Stoff	Analyseverfahren
Natrium Kalium Chlorid	indirekte Potentiometrie
Kalzium	Gesamt-Kalzium: Farbttest mit Endpunkt-Bestimmung und Probenleerwert
Magnesium	Xylidylblau-Methode
Phosphat	Ammoniummolybdat-Methode
Kreatinin	enzymatische Kreatininbestimmung mit photometrischer Messung
Harnstoff	enzymatisch-photometrische Bestimmung

Aus diesen Laborparametern wurde von allen Elektrolyten und vom Harnstoff die fraktionelle Exkretion (FE) berechnet. Die FE macht dabei unter Berücksichtigung der Filtrationsrate eine Aussage darüber, welcher Anteil eines filtrierte Stoffes mit dem Urin ausgeschieden wird.

$$FE_x [\%] = \frac{x \text{ im Urin [mmol/l]} * \text{Kreatinin im Plasma [mg/dl]} * 100\%}{x \text{ im Plasma [mmol/l]} * \text{Kreatinin im Urin [mg/dl]}}$$

Zudem wurde die an Zeitspanne und Körpergewicht adaptierte Ausscheidung errechnet:

$$\text{Ausscheidung von } x [\mu\text{mol}/24\text{h/gKG}] = \frac{x \text{ im Urin [mmol/l]} * \text{Urinfluss } [\mu\text{l}/24\text{h/gKG}]}{1000}$$

Um eine Aussage über die Nierenfunktion treffen zu können, wurde überdies die an das Körpergewicht angepasste Kreatinin-Clearance bestimmt:

$$\text{Kreatinin - Clearance } [\mu\text{l}/\text{min}/\text{gKG}] = \frac{\text{Kreatinin im Urin [mg/dl]} * \text{Urinfluss } [\mu\text{l}/24\text{h/gKG}]}{\text{Kreatinin im Plasma [mg/dl]} * 60 \text{ Minuten} * 24\text{h}}$$

## 2.5 Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR

Für die quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR wurden die Nieren zunächst enzymatisch angedaut, um einzelne Nephronsegmente isolieren und anhand ihrer Histomorphologie sortieren zu können. Hierauf folgten die Isolation der RNA, deren Umwandlung in cDNA und zuletzt der quantitative Nachweis derselben.

### 2.5.1 Tubuluspräparation und -sortierung

Die hier durchgeführte Tubuluspräparation (modifiziert nach [55]) beruht auf dem Bindegewebsverdau durch Kollagenase und Protease.

Nach Narkoseeinleitung (siehe 2.1.2) wurde die Aorta der Versuchsmäuse chirurgisch freipräpariert und der Blutfluss kurz oberhalb der aortalen Bifurkation mit einer Gefäßklemme unterbunden. Im Anschluss wurde die Aorta circa 4,0 mm unterhalb des Abgangs der Nierenarterien mit einer feinen Irisschere senkrecht zum Gefäßverlauf zu einem Drittel eingeschnitten. Dabei wurde eine Blutung durch Kompression oberhalb des Einschnitts mit einem Wattestäbchen verhindert.

Ein zuvor aus Polyethylen-Schlauch durch Erwärmung auf einen Innendurchmesser von etwa 0,1 mm gezogener und mit einer Skalpellklinge abgeschrägter (etwa 45°) Katheter wurde zunächst auf einen Schlauchadapter aufgezogen. Dieser wurde auf eine vorgewärmte Spritze (38°C) mit 1,0 ml Enzymlösung mit Kollagenase Typ II und Protease Typ XIV (siehe 8.1.4) aufgesteckt.

Unter der Führung einer feinen Pinzette wurde der Katheter vorsichtig in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Bei korrekter Sondierung kam es nach Reduktion der Gefäßkompression zum retrograden Einstrom von Blut in den Katheter. Darauffolgend wurden die Nieren mit der vorgewärmten Enzymlösung unter einem kontinuierlichen Druck perfundiert. Nach erfolgreicher Perfusion kam es zur Aufhellung des Nierenparenchyms.

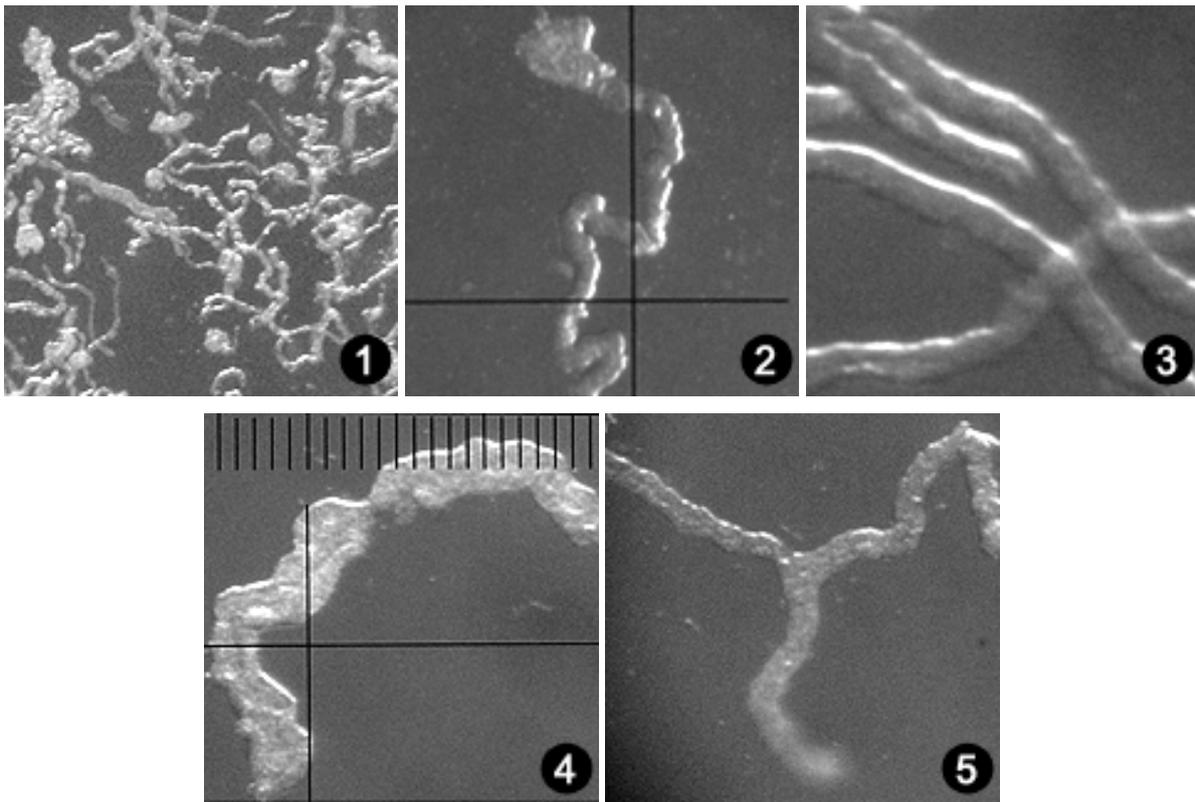
Nun erfolgte die Nephrektomie. Daraufhin wurden die Nierenkapseln mit Hilfe von zwei Pinzetten entfernt und beide Nieren mit einer Skalpellklinge in feine, transversale Scheibchen (0,2-0,5 mm Dicke) zerteilt.

Diese Scheibchen wurden in ein mit 38°C warmer Enzymlösung gefülltes 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 38°C und 850 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Nach Ablauf dieses Intervalls wurde der trübe Überstand mit frei flottierenden Nephronsegmenten in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Nach Bildung eines deutlichen Bodensatzes mit freien Tubuli wurde der Überstand verworfen und durch eiskalte Sortierlösung (siehe 8.1.4) ersetzt.

Der zu großen Teilen noch unverdaute Bodensatz im ersten Reaktionsgefäß wurde parallel mit 38°C warmer Inkubationslösung (siehe 8.1.4) aufgefüllt und für weitere 5 Minuten unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Hierbei waren die im Bodensatz vorhandenen Restenzyme für den erfolgreichen Verdau des persistierenden Bindegewebes ausreichend. Diese Sequenz wurde drei weitere Male wiederholt, so dass nach Abschluss vier Reaktionsgefäße mit unterschiedlich stark verdauten Tubulusegmenten vorhanden waren.

Die angedauten Tubuli wurden zunächst mit einer Pipette aufgemischt und dann an den zuvor beschriebenen Sortier-Arbeitsplatz (siehe 2.3.1) in eiskalte Sortierlösung überführt. Die Sortierung erfolgte dabei anhand histomorphologischer Kriterien (Abbildung 18).

Nach Abschluss der Sortierung wurden die Tubulusegmente nach Segmenten getrennt in etwa 15 µl Probenvolumen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Abschließend wurden diese in einen -80°C Gefrierschrank überführt und dort bis zur Isolierung der RNA gelagert.



**Abbildung 18:** Unsortierte Nierentubuli und Beispiele isolierter Tubulussegmente  
 Unsortierte Nierentubuli (1), Glomerulus mit verbundenem PT (2), TAL mit Reflex der Basalmembran (3), DCT (4), CD mit Verzweigungen und anhängenden Verbindungstubuli (5)

### 2.5.2 RNA Isolierung

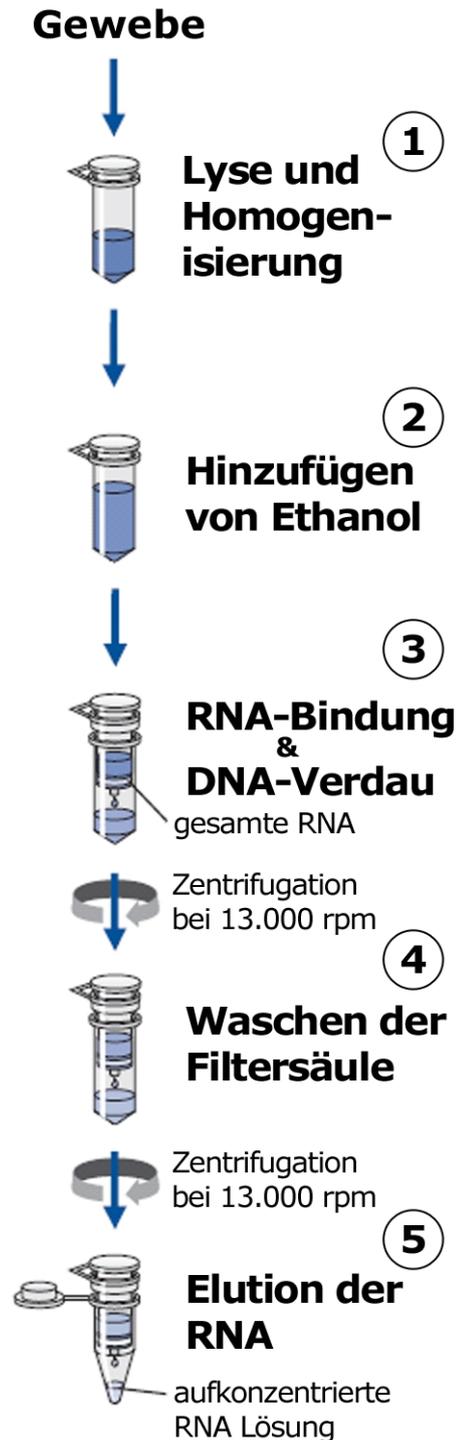
Die RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit (siehe 8.1.3). Dabei wurde nach dem im Handbuch beschriebenen Verfahren für „Microdissected cryosections“ vorgegangen. Das Prinzip der Isolierung beruht auf einer selektiven Bindung der Nukleinsäuren an eine Siliziummembran in einer Zentrifugenfiltersäule (RNeasy MinElute spin column). Die gebundene DNA wird hierbei durch die im Kit enthaltene DNase I lysiert (Abbildung 19). Um Kontaminationen mit fremder RNA und RNasen zu vermeiden ist sauberes Arbeiten unter Nutzung von sterilen Mikropipettenspitzen für den Erfolg entscheidend.

Der im Kit beiliegende RLT Lyse-Puffer wurde mit 1% v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Dabei ist zu beachten, dass  $\beta$ -Mercaptoethanol die Gefahrenstoffkennzeichnung giftig trägt. Die Dämpfe dieser Flüssigkeit reizen Atemwege, Augen und Haut sehr stark, zudem kann es über Hautkontakt in großen Mengen aufgenommen werden und bei Kontakt mit Wasser oder Säure stark giftigen Schwefelwasserstoff abspalten. Aus diesen Gründen ist das Arbeiten mit Handschuhen unter einem Abzug notwendig.

Die isolierten Tubulussegmente (15-35  $\mu$ l) wurden mit 20  $\mu$ l RLT-Puffer aufgefüllt und zur Homogenisierung durch eine feine Kanüle in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Träger-RNA („Carrier RNA“, 4 ng/ $\mu$ l in RLT-Puffer) überführt. Durch die Kanüle werden Zellverbindungen und -wände mechanisch rupturiert. Das Ursprungsgefäß wurde anschließend zweimalig mit je 50  $\mu$ l RLT-Puffer gespült, wobei das Volumen jeweils in das Reaktionsgefäß gegeben wurde. Dieses wurde danach mit RLT-Puffer auf ein Endvolumen von 350  $\mu$ l aufgefüllt.

Im Anschluss wurde dieses Gefäß auf einem Schüttelgerät für 30 Sekunden bei 2.400 rpm geschüttelt, was der weiteren Homogenisierung diente (Abbildung 19; Schritt 1). Darauf folgend wurde das Volumen mit 350  $\mu$ l 70% Ethanol gemischt und in eine Zentrifugensäule (RNeasy MinElute spin column) übertragen (Abbildung 19; Schritt 2).

Nach mehrfachen Reagenzien-, Puffer- und Gefäßwechseln (siehe Handbuch) erfolgte eine 15 minütige Inkubation mit DNase I Lösung (Abbildung 19; Schritt 3-4). Im letzten Schritt wurde die in der Filtermembran fixierte, aufgereinigte RNA mit 14  $\mu$ l RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (14.000 xg, 1 Minute) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Abbildung 19; Schritt 5) und bei -80°C bis zu der Generierung der cDNA gelagert.



**Abbildung 19:** Arbeitsschritte zur RNA Isolation  
Abbildung modifiziert nach dem „QIAGEN RNeasy Micro Kit Handbook“

### 2.5.3 cDNA Generierung

Die zuvor isolierte RNA wurde unter Verwendung eines Reverse Transkriptase Kits (siehe 8.1.3) in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Um sicherzustellen, dass keine DNA Kontaminationen in den RNA Proben vorhanden waren, wurden zusätzliche Negativkontrollen durchgeführt.

Zunächst wurde ein „Master Mix“ aus Reverser Transkriptase (RT), 5x Puffer und einem Primergemisch erstellt, wobei dieser je einen Teil RT und Primergemisch und 4 Teile Puffer enthielt. Im gleichen Verhältnis wurde der „Master Mix“ für die Negativkontrollen erstellt. Dabei wurde die RT durch RNase-freies Wasser ersetzt.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte RNA ( $8\ \mu\text{l}$ ) wurde mit einem Puffer zur Vernichtung der genomischen DNA ( $2,5\ \mu\text{l}$ ) und RNase-freiem Wasser ( $7\ \mu\text{l}$ ) versetzt und anschließend in einem  $1,5\ \text{ml}$  Reaktionsgefäß für 2 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und jeder  $7,5\ \mu\text{l}$  des zuvor angesetzten „Master Mix“ zugefügt.

Anschließend erfolgte die Reverse Transkription für 15 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$ . Zur Inaktivierung der RT wurde das Reaktionsgemisch im Anschluss für 3 Minuten auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

Nach Abschluss dieser Phase wurden die Proben erneut auf Eis gekühlt und in der quantitativen Real-Time PCR untersucht.

### 2.5.4 Quantitative Real-Time PCR

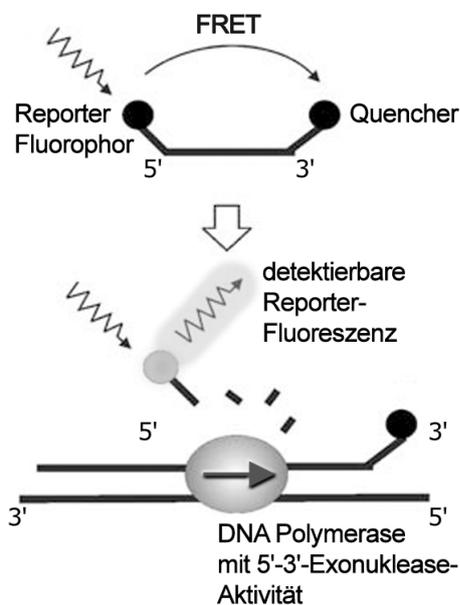
Die quantitative Real-Time PCR stellt ein Verfahren dar, das eine Quantifizierung der mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizierten DNA erlaubt. Diese Quantifizierung wird durch die Auswertung eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, erreicht.

In dieser Arbeit kamen TaqMan-Sonden (siehe 8.1.2) zum Einsatz. Diese basieren auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), wobei die Sonden am 5'-Ende einen Reporter-Fluorophor (FAM) und am 3'-Ende einen Quencher (TAMRA) tragen. Bei intakter Sonde überträgt der Reporter-Fluorophor seine Energie an den Quencher und gibt kein Fluoreszenzsignal ab. Die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Während der Gegenstrangsynthese wird die Sonde deshalb am 5'-Ende abgebaut, woraufhin der Reporter-Fluorophor freigesetzt wird. Das führt dazu, dass sich Reporter-Fluorophor und Quencher von einander entfernen und die Fluoreszenz des Reporters gemessen werden kann. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals verläuft proportional zur exponentiellen DNA-Amplifikation, welche durch die zur Verfügung gestellten Substrate limitiert ist [56].

Für die Probenanalyse wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  TaqMan Grundmischung (siehe 8.1.2), 8  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser und 1  $\mu\text{l}$  der zuvor generierten cDNA respektive Negativkontrolle gemischt. Die zu quantifizierenden Proben wurden in jeweils drei und die Negativkontrollen in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zudem wurde je 1  $\mu\text{l}$  einer spezifischen TaqMan Sonde in jede Vertiefung gegeben. Diese dreifache Bestimmung der jeweiligen Proben diente zur Minimierung von Pipettierfehlern und anderen prozessbedingten Ungenauigkeiten. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Real-Time PCR geeigneter Verschlussfolie verschlossen und bei 900 xg und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert.

Darauffolgend wurde die Mikrotiterplatte in das Real-Time PCR System (siehe 8.1.1) eingeführt und das Steuerungsprogramm konfiguriert. Das Probenvolumen wurde auf 20  $\mu\text{l}$  und das „Thermal Cycler Protocol“ auf absolute Quantifizierung eingestellt. Dabei wurden die Proben zunächst für 10 Minuten auf eine Temperatur von 95°C erhitzt. Darauf folgten 40 Wiederholungen mit Erwärmung auf 95°C (15 Sekunden) und Abkühlung auf 60°C (60 Sekunden).

Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C wird die Elongationsphase der PCR unterbrochen und die doppelsträngige DNA denaturiert. Ein Absenken der Temperatur auf 60°C führt zur Anlagerung (Annealing) der Primer (TaqMan Sonden) und leitet die Elongationsphase ein. In dieser setzt die DNA-Polymerase den Reporter-Fluorophor mittels 5'-3'-Exonuklease-Aktivität frei.



**Abbildung 20:** Prinzip der TaqMan Sonden

TaqMan-Sonden beruhen auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Hierbei nimmt der Quencher die vom Reporter-Fluorophor abgegebene Energie auf und „schluckt“ so das Fluoreszenzsignal. Bei intakter TaqMan-Sonde ist somit keine Fluoreszenz nachweisbar.

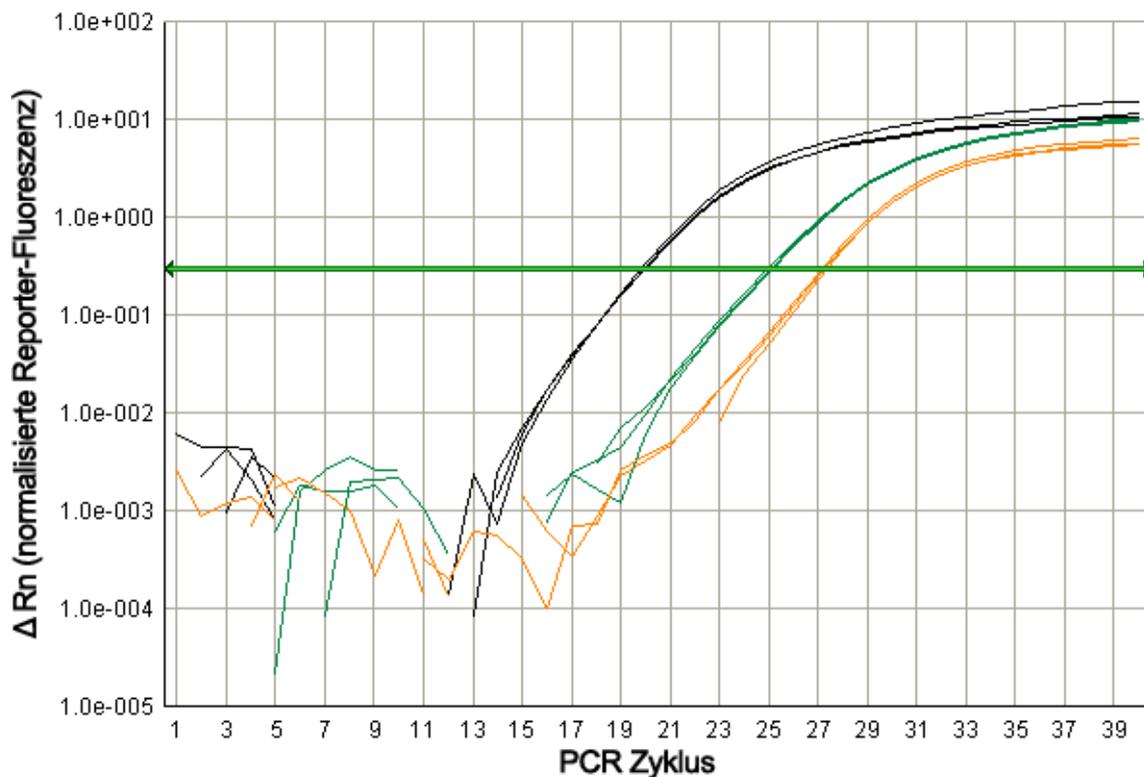
Erst durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der im Rahmen der PCR eingesetzten DNA Polymerase wird die Sonde zerteilt. Durch den zunehmenden Abstand zwischen Reporter-Fluorophor und Quencher und damit abgeschwächten FRET ist ein Fluoreszenzanstieg detektierbar; Abbildung modifiziert nach [56]

### 2.5.5 Auswertung

Während der Real-Time PCR wird die normalisierte Reporter-Fluoreszenz ( $R_n$ ) gemessen. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis der emittierten Fluoreszenzintensität des Reporter Farb-

stoffes (FAM) und eines passiven Referenzfarbstoffes (ROX). Nach abgeschlossener Messung wird die Fluoreszenz als  $\Delta Rn$  angegeben (Abbildung 21). Dabei ergibt sich  $\Delta Rn$  aus der Formel:  $(Rn+) - (Rn-)$ , wobei  $Rn+$  der  $Rn$ -Wert einer Reaktion, die alle Komponenten enthält und  $Rn-$  der Wert einer nicht-reaktiven Probe ist [57].

Als Grenzwert (Threshold)  $\Delta Rn$  (Abbildung 21: grüne Linie) wurde 0,3 für alle Messungen festgelegt. Bei allen Messungen, die cDNA in quantifizierbarer Menge enthielten, lag dieser Wert innerhalb der exponentiellen Phase des Fluoreszenzanstiegs. Im Steuerungsprogramm wird für jede Vertiefung der Mikrotiterplatte die Zyklanzahl bei Erreichen des Grenzwertes  $\Delta Rn$  (CT-Wert) ausgegeben. Diese Werte wurden in der Tabellenkalkulation Microsoft Excel importiert.



**Abbildung 21:** Beispielhafte Aufzeichnung einer quantitativen Real-Time PCR

Bildschirmfoto aus dem Steuerungs- und Auswertungsprogramm „Sequence Detection System Software“: Auf der y-Achse ist die normalisierte Reporter-Fluoreszenz  $\Delta Rn$  und auf der x-Achse die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Die grüne, horizontale Linie markiert den Threshold-Wert 0,3.

Bei den schwarzen Kurven handelt es sich um die Fluoreszenz des „Housekeeping“ Gens (HKG) GAPDH und bei den grünen um die des HKG HPRT1. Die orangefarbenen Kurven zeigen die Fluoreszenz des zu beurteilenden Gens (hier NHE3). Im Sinne der Übersicht zeigt dieses Diagramm nur die Kurven einer Maus.

Aufgrund der exponentiellen Amplifikation hängen die Fluoreszenzzunahme und damit die Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen des Grenzwertes direkt von der Menge der eingesetzten cDNA ab.

Somit war in dieser Probe zu Beginn mehr GAPDH- als HPRT1- und NHE3-cDNA vorhanden. Die GAPDH-Fluoreszenz überschreitet den eingestellten Grenzwert bereits bei Zyklus 20, während die beiden anderen Gene diesen erst nach 24 bis 28 Zyklen erreichen.

In Microsoft Excel wurden die Mittelwerte der dreifach bestimmten CT-Werten für jede Probe ermittelt. Nachfolgend wurde der CT-Mittelwert der beiden mitbestimmten „House-keeping“ Gene (HKG: GAPDH und HPRT1) von jeder Probe subtrahiert. Diese Berechnung ergibt den normalisierten CT-Wert beziehungsweise  $\Delta\text{CT}$ -Wert für das jeweils untersuchte Gen. HKG sind hierbei Gene, die permanent exprimiert werden und weitestgehend keiner Regulation unterliegen. In Anbetracht des exponentiellen Verlaufes der PCR in der Mittelphase konnte mit Hilfe der Formel  $2^{-\Delta\text{CT}}$  die normalisierte Kopienanzahl der untersuchten Gene näherungsweise berechnet werden [58]. Da nun alle Gene mit beiden HKG normalisiert wurden, war ein Vergleich zwischen den Expressionen der analysierten Gene möglich.

## 2.6 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie basiert auf dem Nachweis eines Proteins in Gewebeschnitten mit einem spezifischen Antikörper. Nach direkter Bindung dieses Primärantikörpers an das Zielprotein wird das Präparat mit einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Dieser bindet den Primärantikörper und emittiert zudem ein Fluoreszenzsignal mit bekannter, detektierbarer Wellenlänge. Nicht gebundene Antikörper werden jeweils durch Waschprozeduren entfernt.

### 2.6.1 Perfusionsfixierung der Mäuse

Nach Durchführung des beschriebenen Narkoseverfahrens (siehe 2.1.2) wurden die Tiere durch Überstreckung getötet. Darauffolgend wurden die Mäuse thorakotomiert und das Abdomen eröffnet. Nun wurde die Aorta freipräpariert und die Blutversorgung der Hinterbeine durch eine Gefäßklemme zwischen Nierenarterien und der aortalen Bifurkation unterbunden. Anschließend wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Diese war über einen Drei-Wege-Hahn mit zwei Reservoiren in etwa 190 cm Höhe (circa 140 mmHg) verbunden. Ein Reservoir war mit 0,9% NaCl-Lösung und das andere mit 4% w/v Paraformaldehyd in PBS-Lösung gefüllt. Zunächst wurde mit 5,0 ml NaCl-Lösung gespült und danach über einen 3-Wege-Hahn direkt auf die Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) umgestellt. Nach 25 ml dieser PFA-Lösung wurde erneut für 5,0 ml auf NaCl-Lösung gewechselt.

Hierauf folgte die Nephrektomie, wonach die Nierenkapseln entfernt wurden und die Nieren in 1-2 mm dicke, transversale Scheiben geschnitten wurden. Diese wurden über Nacht in einer PBS-Lösung mit 20% w/v Saccharose bei 4°C gelagert. Die Aufsättigung mit Saccharose wurde hierbei als Frostschutz für die folgende Kryoschnittanfertigung genutzt.

### 2.6.2 Kryoschnittanfertigung

Am Folgetag wurde eine Nierenscheibe in eine radiäre, aus Aluminiumfolie gebaute Form mit einem Durchmesser von etwa 6,0 mm überführt. Diese wurde mit Kryoschnitt Gewebeeinbettmedium gefüllt und mit einer Pinzette in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Metall-Nierenschale gesetzt. Bei diesem Schritt war es wichtig, sich durch angemessene Schutzkleidung zu schützen, um Erfrierungen durch den Kontakt mit flüssigem Stickstoff zu vermeiden. Nachdem Gewebe und das Einbettmedium im flüssigen Stickstoff durchgefroren waren, wurden diese mit einer Pinzette in den Kryostaten (siehe 8.1.1) verbracht.

Dort wurde zunächst die Aluminiumform entfernt. Anschließend wurde ein Film mit Kryoschnitt Gewebeeinbettmedium auf der Objektplatte des Kryostaten aufgetragen, auf diesem wurde der Gewebeblock aufgefroren. Darauf folgte die Erstellung von 5 µm dicken Schnitten durch das Nierengewebe. Kammer- und Objekttemperatur waren bei -20°C fixiert. Je drei Schnitte wurden anschließend auf Polylysin beschichtete Objektträger übertragen. Fertiggestellte Objektträger wurden in einer Objektträgerbox 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C bis zu der Fluoreszenzfärbung gelagert.

### 2.6.3 Fluoreszenzfärbung

Jeder Objektträger wurde zunächst 5 Minuten in PBS-T (0,3% v/v Triton X-100 in PBS) äquilibriert und dann weitere 5 Minuten in PBS mit 0,1% w/v SDS inkubiert, wobei SDS als denaturierende Seife der Antigenbereitstellung („antigen retrieval“) diene.

Darauffolgend wurden die Objektträger für 3x5 Minuten in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger im Randbereich außerhalb der Schnitte mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Nun wurden jeweils 150 µl des Primärantikörpers (in PBS-T mit 1% w/v BSA; für Verdünnungen siehe 8.1.4) aufgetragen und jeder Objektträger mit einem Deckglas bedeckt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C.

Je Maus wurden jeweils ein Objektträger mit AQP2- und AE1- und ein weiterer Objektträger mit AQP2- und Pendrin-Antikörpern inkubiert. Dieses Vorgehen erlaubt die spätere Identifikation von Hauptzellen (AQP2 Expression) und Nebenzellen (AE1 bzw. Pendrin Expression). Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst dreimal für 5 Minuten in PBS-T gewaschen. Danach wurden 125 µl des Sekundärantikörpers im Verhältnis 1:400 in PBS-T aufgetragen. Hierbei wurden grün fluoreszierende Sekundärantikörper gegen Meerschweinchen- und rot fluoreszierende Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Antikörper (siehe 8.1.4) eingesetzt. Da der fluoreszierende Sekundärantikörper nur eingeschränkt lichtstabil ist, wurde von

diesem Schritt an abgedunkelt gearbeitet. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

Nach diesem Intervall wurde abermals dreimal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Für eine Zellkernfärbung wurden die Objektträger für 10 Minuten in eine Standfärbeküvette mit 20  $\mu$ l DAPI (1 mg/ml) und 60 ml PBS-T überführt.

Danach wurden die Objektträger noch einmal für 60 Sekunden in PBS-T gespült und abschließend mit je 2 Tropfen eines für die Fluoreszenz-Immunhistochemie optimierten Eindeckmediums (SlowFade Gold, Invitrogen) benetzt. Auf diesem Flüssigkeitsfilm wurde ein Deckglas platziert und der Objektträger bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 4°C in einer Aufbewahrungsmappe vor Licht geschützt.

#### **2.6.4 Auswertung**

Die gefärbten Präparate wurden am Zeiss Axiovert 200M betrachtet und mit Hilfe des Zeiss AxioVision Programms digitalisiert.

Im Anschluss wurden die gespeicherten Dateien mit dem Programm ImageJ betrachtet und ausgewertet, um eine qualitative Wertung zu erlangen. Dabei wurde jeder einzelne Farbkanal zunächst in ein „Threshold-Image“ (Grenzwert-Bild), das nur positive weiße und negative dunkle Areale enthielt, umgewandelt. Über die Funktion „Analyze  $\rightarrow$  Analyze Particles“ wurde die positiv gefärbte Fläche (in Pixeln) für jeden Kanal erfasst. Dieser Wert wurde in Relation zu der positiv gefärbten Fläche in dem DAPI-Kanal (Zellkernfärbung) gesetzt. Daraus resultiert für jede einzelne, spezifische Färbung ein auf die Fläche der Zellkerne normierter Wert.

### **2.7 SDS-PAGE und Western Blot**

In der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erfolgt eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein denaturierendes Detergenz, das die Polypeptidketten entfaltet. Durch die stark negative Ladung von SDS werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt und so eine ladungsunabhängige Auftrennung ermöglicht. In den Maschen des Acrylamid-Polymers werden im elektrischen Feld große Proteine stärker als kleine gebremst (Molekularsiebeffekt). Nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel werden die Proteine auf eine Membran übertragen (Western Blot) und wie in der Fluoreszenz-Immunhistochemie mit Antikörpern nachgewiesen.

### 2.7.1 Probenmaterial und Homogenisierung

Nach Durchführung des beschriebenen Narkoseverfahrens (siehe 2.1.2) wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet und beide Nieren entnommen. Diese wurden zunächst in Dissektionslösung (siehe 8.1.4) überführt und von ihrer Kapsel befreit.

Im Anschluss wurden die Nieren zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und in je 2,0 ml Lyse-Puffer (siehe 8.1.4) gegeben. Um proteolytische Prozesse zu minimieren wurde auf Eis gearbeitet. Die Homogenisierung erfolgte aufeinanderfolgend je fünf Minuten mit einem Dispergierer (8000 rpm) und Glas-Teflon (450 rpm).

Anschließend wurden je 300 µl der homogenisierten Probe mit 100 µl 4x Probenauftragspuffer (siehe 8.1.4) gemischt und für 30 Minuten auf 50°C erwärmt. Diese Probe wurde bis zur Durchführung der SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

### 2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Weitere 10 µl der homogenisierten Probe (ohne Probenauftragspuffer) wurden zunächst in PBS 1:20 verdünnt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines BCA-Kits (siehe 8.1.3). Diese Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischer Lösung und anschließender photometrischer Messung des Bicinchonin-Säure (BCA)-Kupfer-Komplexes bei 562 nm.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit aufsteigender Albumin-Konzentration von 0 bis 2,0 mg/ml PBS erstellt. Danach wurden jeweils 25 µl dieser Standardreihe und der zuvor verdünnten Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Überdies wurden 200 µl des im Kit beiliegenden „Working“ Reagenz zu jeder Probe hinzugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei 562 nm im Photometer (Tecan Genios Microplate Reader) gemessen und mit Hilfe einer Regressionsgerade (Standardreihe) in die Proteinkonzentration umgerechnet.

### 2.7.3 SDS-PAGE

Für die Gelelektrophorese wurden zunächst Trenn- und Sammelgel (siehe 8.1.4) erstellt. Um eine bessere Trennschärfe der Proteinbanden zu erreichen, wurde für den Nachweis von Pendrin, AE1 und V-Typ  $\text{H}^+$ -ATPase ein Trenngel mit 8% und für Aquaporin 2 ein Gel mit 12,5% Acrylamid hergestellt. Die Polymerisation der Gele wurde jeweils mit 0,075% APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und 0,3% TEMED (Tetramethylethylen-diamin) als Katalysator eingeleitet.

Nach Einsetzen der Gele in die Elektrophorese-Kammer wurde diese mit Elektrodenpuffer (siehe 8.1.4) befüllt. Nun wurden neben 5 µl Größenstandard (siehe 8.1.2), die mit reduzierendem Probenauftragspuffer gemischten Homogenisate in je eine Geltasche pipettiert. Dabei wurden die zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen genutzt, um jeweils 20 µg Protein aufzutragen. Hierbei kann eine Protein-Überladung des Gels zu vielseitigen Artefakten, einer Minderung der Trennschärfe und Ergebnisverzerrung führen.

Das im Probenauftragspuffer enthaltene Bromphenolblau diene als Markierung für die Probenfront im Gel. Bis zum Erreichen der Sammel-/Trenngel-Grenze (circa 10 Minuten) wurde eine Elektrodenspannung von 100V gewählt. Danach wurde diese bis zum Erreichen des unteren Trenngelrandes (circa 50 Minuten) auf 140V erhöht.

#### **2.7.4 Western Blot**

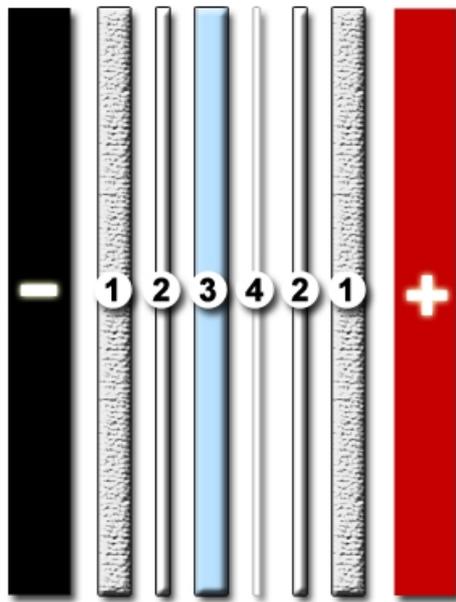
Proteingel, Nitrocellulose-Membran, Filterpapiere und Filzkompressen wurden unmittelbar vor Beginn des Blottens für 10 Minuten in Transferpuffer („Tank-Blot-Puffer“; siehe 8.1.4) äquilibriert. Danach wurde die Western Blot Kammer (siehe 8.1.1) zusammengesetzt (Abbildung 22) und mit Transferpuffer befüllt. Zudem wurde ein Kühlelement in die Kammer eingebracht.

Der Proteintransfer erfolgte bei einem Elektrodenstrom von 500 mA und einer Dauer von 75 Minuten. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-Rot Lösung und das Gel mit Coomassie Blue angefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen.

Danach wurde die Membran zunächst in TBS-T (siehe 8.1.4) gespült und bei Raumtemperatur für 60 Minuten in TBS-T mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Dieser Schritt diene der Absättigung von noch freien Protein-Bindungsstellen der Membran mit Proteinen des Milchpulvers. Nach erneuter Spülung in TBS-T wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem Primärantikörper (in TBS-T mit 1% w/v BSA; Verdünnungen siehe 8.1.4) inkubiert. Dabei befand sich die Membran in einem geschlossenen Glaskasten und wurde auf einem Rotationstisch kontinuierlich bewegt.

Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst dreimalig für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Darauf folgte eine 60 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (in TBS-T mit 1% w/v BSA; Verdünnungen siehe 8.1.4) bei Raumtemperatur. Dieser war an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, wodurch eine spätere Lumineszenz-Detektion möglich war.

Nach diesem Intervall wurde die Blotmembran viermal für 10 Minuten in TBS-T gespült.



**Abbildung 22:** Aufbau und Proteintransfer beim Western Blot

Der Western Blot dient zur Übertragung („Blot“) von Proteinen aus einem Gel (3) auf eine Membran (4). In diesem Fall wurde eine Nitrocellulose-Membran genutzt. Hierbei sind Gel und Membran von Filterpapier (2) und Filzkompressen (1) umgeben. In einem äußeren elektrischen Feld fließen negative Ladungen von der Anode (schwarz) zur Kathode (rot). Dieser Vorgang bewirkt den Transfer der Proteine, deren Eigenladung durch SDS (Natriumdodecylsulfat) negativ überdeckt ist.

Anschließend an den ersten Detektionsprozess wurden die gebundenen Antikörper in einem „stripping“ Prozess von den auf der Membran fixierten Proteinen entfernt. Das ermöglicht die Detektion eines zweiten Proteins mit anderen Antikörpern. Hierbei wurde die Membran in Stripping-Puffer (siehe 8.1.4) überführt und in einem 50°C warmen Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen.

Danach erfolgte ein erneutes Blockieren mit Milchpulver mit den darauf folgenden Schritten, die wie schon oben beschrieben durchgeführt wurden. Als Primärantikörper wurde hierbei allerdings  $\alpha$ -Aktin eingesetzt. Damit war eine Quantifizierung des zuvor detektierten Proteins in Bezug auf  $\alpha$ -Aktin („Housekeeping“ Protein) und somit ein Vergleich der verschiedenen Proben möglich.

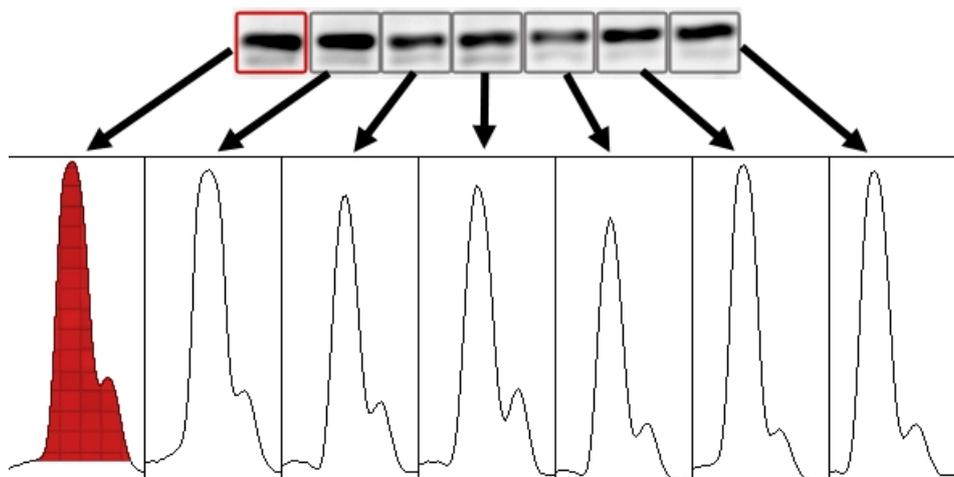
### 2.7.5 Auswertung

Die Auswertung des Western Blots erfolgte nach Beschichtung mit Lumineszenz-Medium an einem Lumineszenz-Analysator (siehe 8.1.1) und Digitalisierung mit verschiedenen Belichtungszeiten, abhängig von der Intensität der Färbung zwischen 1-10 Sekunden.

Zunächst wurde die Größe der angefärbten Proteinbanden mittels des Größenstandards ermittelt und mit den Informationen einer Proteindatenbank (UniProt.org) abgeglichen.

Danach wurde jede digitalisierte Membran mit dem Programm ImageJ geöffnet und die zur Proteingröße gehörende Bande mit dem „Gel Analyser“ ausgewertet (Abbildung 23). Da

dieser Schritt bei jeder Membran sowohl für das gesuchte Protein als auch für  $\alpha$ -Aktin durchgeführt wurde, war der Probenvergleich durch Normierung auf  $\alpha$ -Aktin möglich.



**Abbildung 23:** Quantitative Bestimmung der Proteinexpression im Western Blot

Dieses Bild zeigt exemplarisch die 56 kDa Bande der V-H<sup>+</sup>-ATPase von sieben Mäusen (oben). In dem Programm ImageJ wurde um diese Bande jeweils ein rechteckiger Kasten gleicher Größe gelegt (rot bzw. grau). Der Kasteninhalt wurde mittels des „Gel Analysers“ in einen Flächen-Intensitäts-Plot umgewandelt (unten). In diesem wurde zur unteren Begrenzung des Peaks eine Linie gezogen, um Hintergrundartefakte zu minimieren. Nun wurde mittels des „Wand“ Werkzeuges die AUC („area under the curve“) zwischen Kurve und gezogener Linie auf jedem Plot markiert (exemplarisch: rote Fläche links). Durch die Funktion „Label Peaks“ wurde die AUC-Fläche jeder Kurve in Prozent zur Gesamtfläche aller Kurven ausgegeben. Diese Prozentangabe entspricht der relativen Lumineszenz einer Bande in Relation zur gesamten Lumineszenz aller Banden. Dieses lässt eine Aussage über die relative Quantität des jeweils aufgetragenen Proteins zu.

## 2.8 Datenanalyse

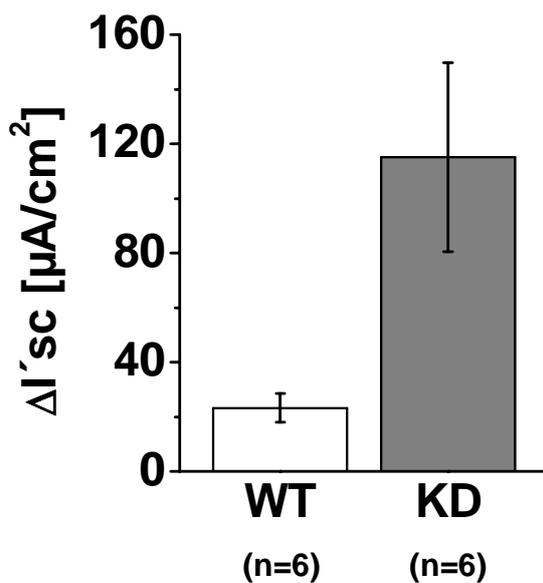
Die Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel 2003 und OriginPro 7.5G analysiert. In den folgenden Diagrammen und Tabellen sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern (SEM) angegeben. Der Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts ist in den Diagrammen als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Signifikanzprüfung zwischen Experimentalwerten der Wildtyp- und CLDN16 Knockdown-Population erfolgte durch den ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Test (\*). Geschlechtsunterschiede wurden gleichermaßen statistisch analysiert (§). Das statistische Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert < 0,05 festgelegt. Die Angabe „n“ bezeichnet die Anzahl untersuchter Tiere.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Tubulusperfusion

Unterschiede in der Wirkung von Amilorid auf das transepitheliale Potenzial wurden am isoliert-perfundierten Sammelrohr gemessen. Sie dienen zur Überprüfung der Hypothese einer verstärkten NaCl-Resorption, bedingt durch eine erhöhte NaCl Konzentration in der distalen Tubulusflüssigkeit [20] und einen latenten NaCl-Verlust mit konsekutiv erhöhtem Plasma-Aldosteron in CLDN16 Knockdown-Mäusen [59].

Knockdown-Mäuse zeigten unter Kontrollbedingungen ein signifikant höheres lumen-negatives Potenzial ( $-6.6 \pm 1.1$  mV in KD versus  $-1.4 \pm 0.5$  mV in WT) und einen vierfach erhöhten äquivalenten Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ :  $-127 \pm 36$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  in KD versus  $-29 \pm 11$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  in WT; Abbildung 24). Nach Zugabe von Amilorid reduzierte sich der  $I_{sc}$  sowohl in der WT ( $-5 \pm 10$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), als auch in der KD Gruppe ( $-12 \pm 8$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Der  $I_{sc}$  der KD sank dabei bis unter das Ausgangsniveaus der WT und war nach Amilorid-Zugabe nicht mehr signifikant unterschiedlich zu dem  $I_{sc}$  der WT Population. Damit war der Amilorid-hemmbarer  $I_{sc}$  (Abbildung 24:  $\Delta I_{sc}$ ), der die ENaC-Aktivität repräsentiert, in KD mit einer 5-fachen Steigerung deutlich erhöht. Da die luminal Konzentration von NaCl in diesem Experiment unter Kontrolle war, muss es sich um einen davon unabhängigen Anpassungsmechanismus handeln.



**Abbildung 24:** Äquivalenter Kurzschlussstrom im Sammelrohr

Änderung des errechneten äquivalenten Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) unter Amilorid-Blockade des ENaC in perfundierten Sammelrohren von Wildtyp- (weiß) und Knockdown-Mäusen (grau). Hierbei ist eine 5-fache Steigerung der elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Resorption in KD zu sehen.

### 3.2 Phänotypisierung mittels metabolischer Käfige

Auf der Basis der Beobachtungen aus den Tubulusperfusionsexperimenten wurde in metabolischen Käfigen untersucht, ob die erhöhte luminale Konzentration von NaCl in den distalen Tubulussegmenten einen Einfluss auf den Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Basen-Haushalt der Mäuse hatte. Überdies sollten zum einen der Phänotyp der Tiere verifiziert und zum anderen über bisher publizierte Charakterisierungen hinausgehende Daten gewonnen werden. Diese sind für Gegenüberstellungen von Mausmodell und FHHNC Erkrankten notwendig.

#### *Metabolische Grundparameter*

Zunächst wurden bei Mäusen gleichen Alters ( $189 \pm 2$  Tage) Körpergewicht, Wasser-, Futteraufnahme, Urinfluss und fäkale Exkretion als metabolische Grundparameter ermittelt (Tabelle 2, Tabelle 3 und Abbildung 25).

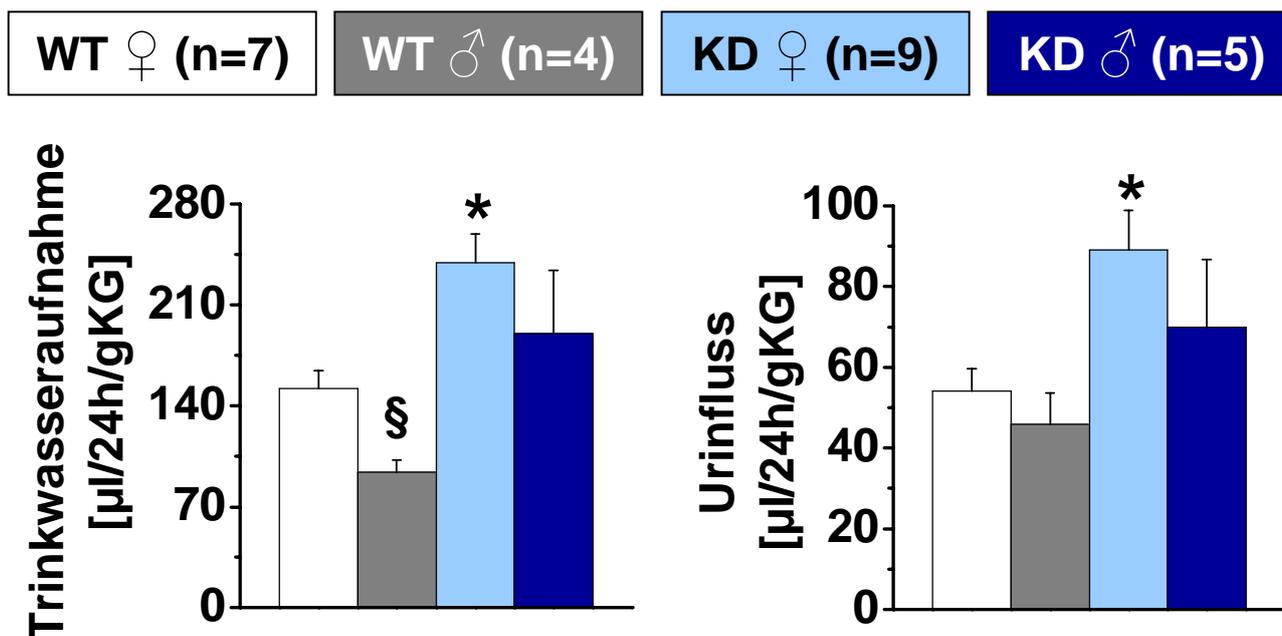
Hierbei war bei weiblichen und männlichen KD das Körpergewicht signifikant niedriger als in der gepaarten WT Gruppe. Zudem wiesen männliche Mäuse jeweils ein höheres Körpergewicht als die weiblichen Versuchstiere auf (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Körpergewicht [g] der Wildtyp und Knockdown Mäuse

<b>Genotyp</b>	<b>Weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>p</b>
<b>WT</b>	$31,6 \pm 1,6$	7	$42,9 \pm 1,3$	4	0,001 <sup>§</sup>
<b>KD</b>	$24,2 \pm 1,4$	9	$31,3 \pm 1,5$	5	0,008 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,004 <sup>*</sup>		0,001 <sup>*</sup>		

Trinkwasseraufnahme und Urinfluss (Abbildung 25) waren in weiblichen KD statistisch signifikant erhöht, wobei die männlichen Mäuse gleichgerichtete Tendenzen zeigten. Überdies nahmen männliche Mäuse der WT Gruppe weniger Wasser als weibliche WT auf.

Die Auswertung der Futteraufnahme (Tabelle 3) zeigte in der weiblichen Population eine signifikant erhöhte Futteraufnahme in KD. Die fäkale Exkretion wies weder Genotyp- noch Geschlechtsunterschiede auf. Interindividuelle Unterschiede führten sowohl bei der Futteraufnahme als auch bei der fäkalen Exkretion zu einer hohen Streuung.



**Abbildung 25:** Trinkwasseraufnahme und Urinfluss im metabolischen Käfigversuch

In diesen Diagrammen sind die Trinkwasseraufnahme (links) und der Urinfluss (rechts) in den oben stehenden Gruppen dargestellt. Die Trinkwasseraufnahme zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen WT (§) sowie weiblichen WT und KD (\*). Der Urinfluss war ebenfalls zwischen weiblichen WT und KD verschieden.

**Tabelle 3:** Futteraufnahme und fäkale Exkretion [mg/24h/gKG]

Genotyp	weiblich	n	männlich	n	p
<i>Futteraufnahme</i>					
WT	108 ± 17	7	86 ± 11	4	0,394
KD	157 ± 10	9	115 ± 26	5	0,093
<b>p</b>	0,019*		0,385		
<i>Fäkale Exkretion</i>					
WT	64 ± 13	7	45 ± 7	4	0,336
KD	73 ± 7	9	54 ± 16	5	0,221
<b>p</b>	0,525		0,662		

#### *Plasma- und Urinosmolalität*

Um zusätzliche Informationen über den Hydratationsstatus und die renale Konzentrationsfähigkeit der Versuchstiere zu erlangen, wurden Plasma- und Urinosmolalität bestimmt.

Tabelle 4 zeigt, dass die Plasmaosmolalitäten in männlichen und weiblichen WT und KD auf einem gemeinsamen Niveau waren. Hierbei ist jedoch ein Trend zu niedrigeren Osmolalitäten in KD zu erkennen. Insbesondere die Urinosmolalitäten streuten bei interindividuell unterschiedlichen Trinkmengen erwartungsgemäß zwischen allen Versuchstieren in hohem Maße.

**Tabelle 4:** Plasma- und Urinosmolalität [mOsm/kg]

<b>Genotyp</b>	<b>weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>p</b>
<i>Plasma</i>					
<b>WT</b>	318 ± 5	7	327 ± 2	4	0,210
<b>KD</b>	315 ± 5	9	321 ± 2	5	0,398
<b>p</b>	0,665		0,051		
<i>Urin</i>					
<b>WT</b>	2272 ± 316	7	2528 ± 411	4	0,635
<b>KD</b>	2071 ± 81	9	2226 ± 397	5	0,621
<b>p</b>	0,501		0,618		

*Osmotische und Freiwasser-Clearance*

Weitere Anzeichen für eine gestörte renale Konzentrationsfähigkeit können aus den errechneten Parametern osmotische und Freiwasser-Clearance gewonnen werden. Dabei beschreibt die osmotische Clearance das von allen osmotisch aktiven Soluten befreite Plasmavolumen und die Freiwasser-Clearance das über die zur isoosmotischen Clearance notwendige Urinmenge hinausgehende Urinvolumen [45].

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass weibliche KD gegenüber der WT-Population eine signifikant höhere osmotische Clearance und eine verstärkt negative Freiwasser-Clearance aufwiesen. In der männlichen Population sind diese Veränderungen gleichsinnig vorhanden, allerdings erreichen sie nicht das statistische Signifikanzniveau.

**Tabelle 5:** Osmotische und Freiwasser-Clearance [ $\mu\text{l}/24\text{h}/\text{gKG}$ ]

<b>Genotyp</b>	<b>weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>P</b>
<i>Osmotische Clearance</i>					
<b>WT</b>	381 ± 60	7	329 ± 24	4	0,544
<b>KD</b>	572 ± 43	9	417 ± 63	5	0,060
<b>p</b>	0,019*		0,277		
<i>Freiwasser-Clearance</i>					
<b>WT</b>	-327 ± 58	7	-283 ± 26	4	0,596
<b>KD</b>	-483 ± 35	9	-347 ± 49	5	0,043 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,030*		0,323		

*Hämatokrit*

Der Hämatokrit wurde gemessen, da dieser Parameter von der Erythropoietin-Ausschüttung und dem Hydrationszustand des Organismus beeinflusst wird.

Hierbei konnten jedoch außer eines geringen Trends zu höheren Hämatokrit-Werten in männlichen Mäusen keine Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Hämatokrit [%]

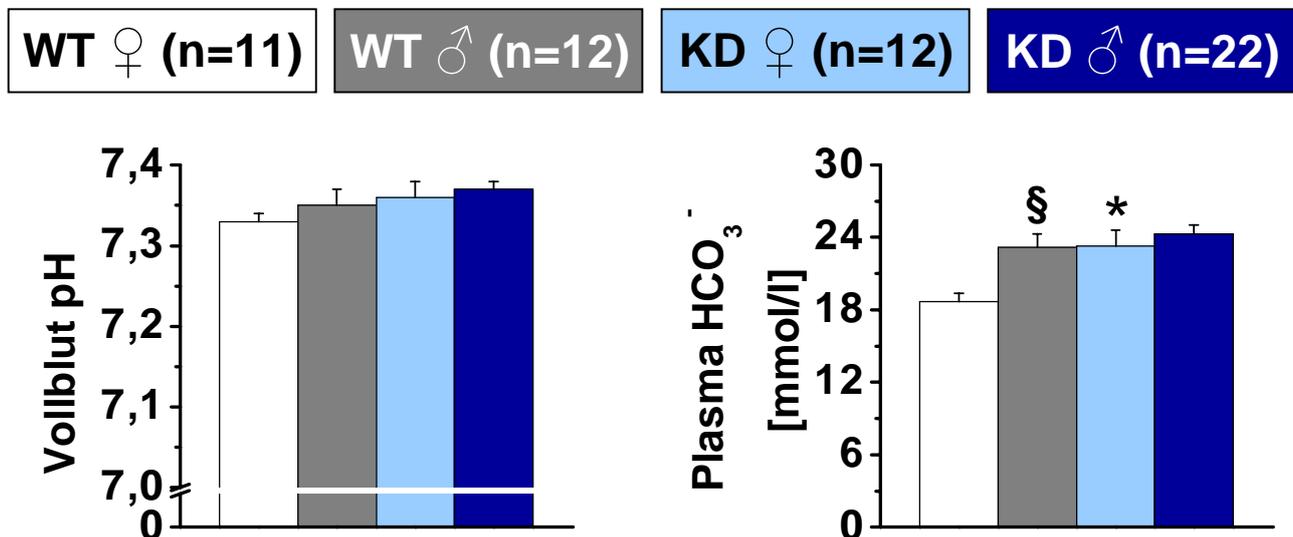
Genotyp	weiblich	n	männlich	n	p
<i>Hämatokrit</i>					
WT	42,40 ± 0,40	7	43,56 ± 0,31	4	0,080
KD	42,64 ± 0,58	9	44,16 ± 0,94	5	0,172
p	0,753		0,601		

*Blut-Gas- und Urin-Gas-Analyse*

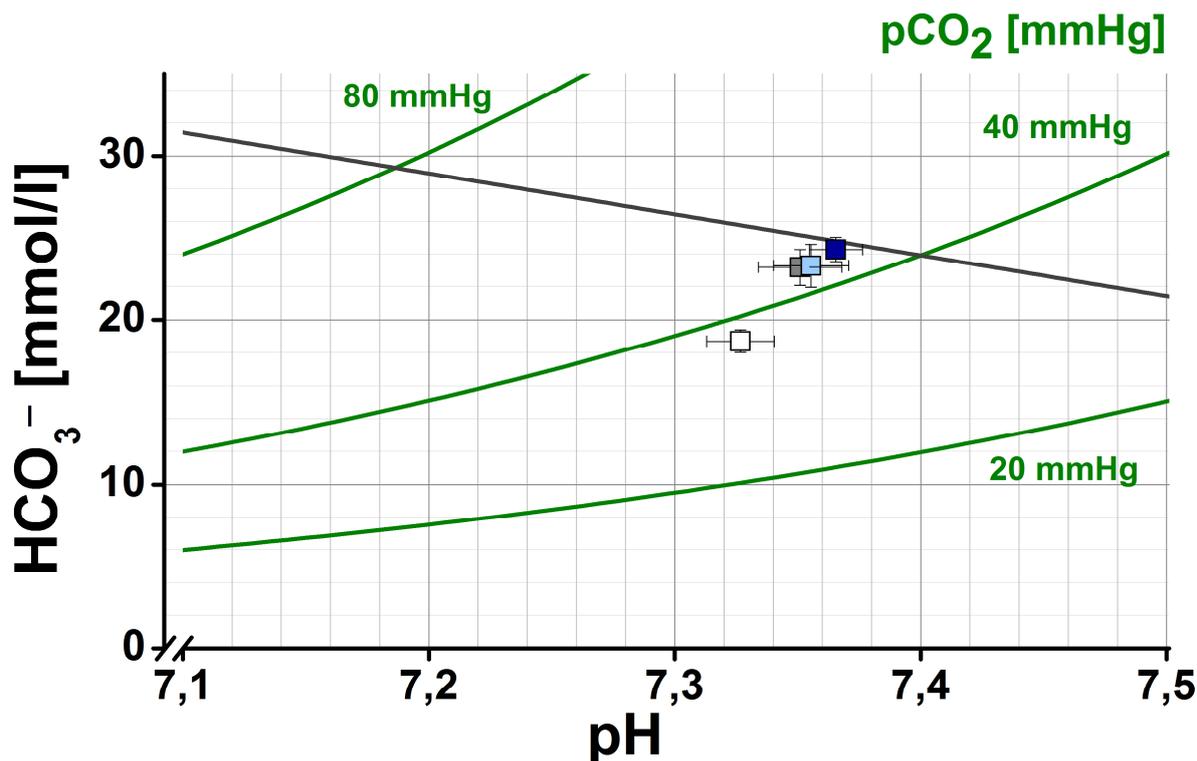
Die Niere nimmt eine zentrale Stellung in der Resorption und Exkretion von Säuren und Basen ein. Aus diesem Grund können Anpassungsvorgänge an pathophysiologische Zustände und daraus resultierende Änderungen der zellulären Leitfähigkeiten und des transepithelialen Potenzials in den verschiedenen Nephronsegmenten den Säure-Basen-Haushalt beeinflussen.

Die Analyse der Blutgase (Abbildung 26 und 27) zeigte einen gleichwertigen pH im venösen Vollblut aller Gruppen. In der WT Gruppe zeigten die weiblichen Tiere deutlich erniedrigte Plasma-Hydrogencarbonat-Werte. Daraus resultierte ein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen Genotypen und den Geschlechtern innerhalb der WT Gruppe.

Im Urin der KD Gruppe waren sowohl pH-Wert als auch Hydrogencarbonat niedriger als in der WT Gruppe. Hierbei war die Hydrogencarbonat-Konzentration in männlichen 3,5-fach und in weiblichen KD 16,5-fach erniedrigt (Abbildung 28).

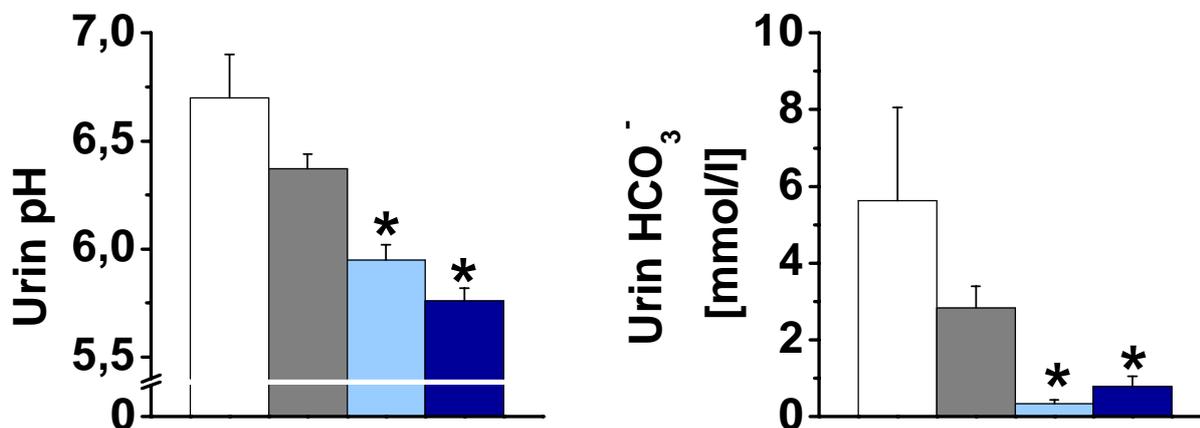
**Abbildung 26:** Parameter der Blut-Gas-Analyse

Die Balkendiagramme zeigen keine Unterschiede in den Vollblut pH-Werten. Die Plasma-Hydrogencarbonat-Konzentration war in weiblichen WT erniedrigt, sodass sich Geschlechts- und Genotyp-Unterschiede ergaben.



**Abbildung 27:** Davenport-Diagramm

Das Davenport-Diagramm verdeutlicht, dass die Blut-Gas-Zusammensetzung in weiblichen WT in Richtung eines niedrigeren pH-Wertes bei gleichzeitig erniedrigtem Hydrogencarbonat verändert ist. Dabei handelt es sich bei den grünen Kurven um Isobaren des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks und bei der schwarzen Gerade um die Pufferlinie der Nicht-Hydrogencarbonat-Puffer des Blutes. Bei reinen respiratorischen Störungen findet eine Verschiebung auf der Puffergeraden und bei reinen metabolischen Störungen eine Parallelverschiebung der Puffergeraden selbst statt [60, 61].



**Abbildung 28:** Urin-Gas-Analyse

In KD waren der pH-Wert und die Hydrogencarbonat-Konzentration des Urins in beiden Geschlechtern deutlich niedriger als in WT.

#### *Plasmaelektrolyte und Harnstoff*

Die Niere nimmt eine zentrale Stellung in der Regulation der Gesamtkörper-Elektrolythomöostase ein. Die Plasma-Elektrolytkonzentrationen sollen zeigen, inwieweit der Knockdown von Claudin-16 auch systemische Einflüsse zur Folge hat. Zudem machen die in der Literatur be-

schriebenen erhöhten Aldosteron-Werte [20] in KD Auswirkungen auf den Elektrolythaushalt wahrscheinlich.

Plasma-Natrium und -Chlorid aller Gruppen befanden sich auf einem einheitlichen Niveau (Tabelle 7: Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>).

Die K<sup>+</sup>-Konzentration zeigte eine Tendenz zu höheren Werten in männlichen Mäusen, die in der KD Gruppe signifikant wurde. Im Vergleich von WT und KD waren keine Unterschiede zu erkennen (Tabelle 7: K<sup>+</sup>).

In männlichen und weiblichen KD war überdies das Plasma-Kalzium erhöht (Tabelle 7: Ca<sup>2+</sup>). Die Mg<sup>2+</sup>-Werte waren in männlichen und weiblichen KD gegenüber WT erniedrigt. Zudem war in der KD Population ein signifikanter Geschlechtsunterschied vorhanden, wobei die weiblichen Tiere höhere Werte aufwiesen. In WT zeigte sich ein gleichgerichteter Trend, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte (Tabelle 7: Mg<sup>2+</sup>).

Das Plasma-Phosphat zeigte eine Tendenz zu erniedrigten Werten in KD gegenüber WT und war in männlichen KD signifikant niedriger als in weiblichen KD. Dieser ebenfalls vorhandene Trend erreichte in der WT Population erneut nicht das Signifikanzniveau (Tabelle 7: Phosphat).

Einzig weibliche KD neigten zu erhöhten Harnstoff-Konzentrationen, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren (Tabelle 7: Harnstoff).

**Tabelle 7:** Konzentration von Plasmaelektrolyten und Harnstoff [mmol/l]

<b>Genotyp</b>	<b>weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>p</b>
<i>Na<sup>+</sup></i>					
<b>WT</b>	152 ± 2	7	154 ± 2	4	0,445
<b>KD</b>	153 ± 1	9	155 ± 1	5	0,174
<b>p</b>	0,613		0,701		
<i>Cl<sup>-</sup></i>					
<b>WT</b>	115 ± 2	7	113 ± 1	4	0,457
<b>KD</b>	114 ± 1	9	114 ± 1	5	0,657
<b>p</b>	0,586		0,393		
<i>K<sup>+</sup></i>					
<b>WT</b>	3,7 ± 0,2	7	4,0 ± 0,2	4	0,197
<b>KD</b>	3,3 ± 0,2	9	4,1 ± 0,2	5	0,018 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,193		0,848		
<i>Ca<sup>2+</sup></i>					
<b>WT</b>	2,30 ± 0,04	7	2,37 ± 0,03	4	0,211
<b>KD</b>	2,46 ± 0,03	9	2,51 ± 0,04	5	0,292
<b>p</b>	0,003 <sup>*</sup>		0,035 <sup>*</sup>		

**Mg<sup>2+</sup>**

<b>WT</b>	0,95 ± 0,07	7	0,82 ± 0,03	4	0,171
<b>KD</b>	0,73 ± 0,03	9	0,61 ± 0,04	5	0,024 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,004 <sup>*</sup>		0,006 <sup>*</sup>		

**Phosphat**

<b>WT</b>	2,0 ± 0,2	7	1,7 ± 0,1	4	0,160
<b>KD</b>	1,8 ± 0,1	9	1,4 ± 0,1	5	0,046 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,476		0,063		

**Harnstoff**

<b>WT</b>	8,5 ± 0,7	7	9,2 ± 1,1	4	0,564
<b>KD</b>	12,1 ± 1,4	9	9,7 ± 0,7	5	0,240
<b>p</b>	0,063		0,713		

*Kreatinin-Clearance*

Anhand der Kreatinin-Clearance lässt sich die glomeruläre Filtrationsrate abschätzen und eine eingeschränkte Aussage über die Nierenfunktion machen [62].

Hierbei ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Kreatinin-Clearance [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gKG}$ ]

<b>Genotyp</b>	<b>weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>p</b>
<b>WT</b>	10,63 ± 0,81	7	9,33 ± 1,76	4	0,462
<b>KD</b>	12,02 ± 1,21	9	8,56 ± 0,66	5	0,068
<b>p</b>	0,385		0,666		

*Urinausscheidung einzelner Elektrolyte und Harnstoff*

Die Ausscheidung einzelner Elektrolyte kann unter Beachtung des Harnflusses entscheidende Hinweise auf eine Nierendysfunktion und die potenziell betroffenen Nephronsegmente geben. Da der CLDN16 Knockdown primär die Niere betrifft, ist die Analyse der renalen Elektrolyt-Exkretion zum einen zur Verifizierung der Knockdown Persistenz und zum anderen für eine detaillierte Phänotypanalyse essenziell.

Weibliche KD schieden im Gegensatz zu weiblichen WT signifikant mehr Na<sup>+</sup> aus. Männliche KD neigten ebenfalls zu erhöhter Na<sup>+</sup>-Ausscheidung, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Im Geschlechtsvergleich zeigte sich im Urin von weiblichen KD eine Tendenz zu vermehrter Na<sup>+</sup>-Ausscheidung (Tabelle 9: Na<sup>+</sup>).

Die Urin-Exkretionen von Cl<sup>-</sup> und K<sup>+</sup> verliefen gleichgerichtet mit der Na<sup>+</sup>-Ausscheidung (Tabelle 9: Cl<sup>-</sup> und K<sup>+</sup>).

Sowohl weibliche als auch männliche KD schieden mit dem Urin signifikant mehr Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Phosphat als WT aus. Überdies war die Urinausscheidung von Mg<sup>2+</sup> in weiblichen KD

signifikant höher als in männlichen KD. In der WT Population bestand ein gegenläufiger Trend (Tabelle 9:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und Phosphat).

Die Harnstoff-Ausscheidung war in weiblichen KD sowohl im Geschlechts- als auch im Genotypvergleich signifikant erhöht (Tabelle 9: Harnstoff).

**Tabelle 9:** Urinausscheidung von Elektrolyten und Harnstoff [ $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ ]

<b>Genotyp</b>	<b>weiblich</b>	<b>n</b>	<b>männlich</b>	<b>n</b>	<b>p</b>
<i>Na<sup>+</sup></i>					
<b>WT</b>	7,96 ± 1,15	7	7,01 ± 0,30	4	0,560
<b>KD</b>	11,24 ± 0,84	9	8,74 ± 1,61	5	0,153
<b>p</b>	0,033*		0,380		
<i>Chlorid</i>					
<b>WT</b>	10,64 ± 1,83	7	8,98 ± 0,69	4	0,529
<b>KD</b>	15,23 ± 0,99	9	11,28 ± 2,39	5	0,097
<b>p</b>	0,035*		0,436		
<i>K<sup>+</sup></i>					
<b>WT</b>	18,29 ± 3,05	7	17,76 ± 1,37	4	0,904
<b>KD</b>	28,68 ± 2,55	9	21,47 ± 3,85	5	0,132
<b>p</b>	0,020*		0,439		
<i>Ca<sup>2+</sup></i>					
<b>WT</b>	0,13 ± 0,02	7	0,14 ± 0,01	4	0,539
<b>KD</b>	1,69 ± 0,17	9	1,87 ± 0,24	5	0,540
<b>p</b>	< 0,001*		< 0,001*		
<i>Mg<sup>2+</sup></i>					
<b>WT</b>	0,75 ± 0,12	7	0,99 ± 0,17	4	0,279
<b>KD</b>	2,33 ± 0,16	9	1,71 ± 0,22	5	0,040 <sup>§</sup>
<b>p</b>	< 0,001*		0,045*		
<i>Phosphat</i>					
<b>WT</b>	2,32 ± 0,46	7	3,18 ± 0,25	4	0,218
<b>KD</b>	7,37 ± 1,04	9	6,48 ± 1,11	5	0,596
<b>p</b>	0,001*		0,037*		
<i>Harnstoff</i>					
<b>WT</b>	67,12 ± 10,04	7	63,29 ± 4,41	4	0,790
<b>KD</b>	106,21 ± 8,38	9	74,69 ± 10,44	5	0,040 <sup>§</sup>
<b>p</b>	0,009*		0,390		

### Fraktionelle Exkretionen

Die fraktionelle Exkretion (FE) beschreibt den Anteil des Filtrates, der mit dem Urin ausgeschieden wird. Im Gegensatz zu der Urinausscheidung, die weder die Filtrationsleistung noch die Plasmakonzentration eines Stoffes einbezieht, erlaubt die FE bei Imbalancen eine validere Aussage über die Beteiligung der Nieren zu treffen.

Die FE von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und Phosphat war sowohl in weiblichen als auch in männlichen KD signifikant höher als in WT. Im Geschlechtsvergleich war die FE von Phosphat in männlichen WT und KD höher. Für die FE von  $\text{Ca}^{2+}$  traf dies nur in KD und für die FE von  $\text{Mg}^{2+}$  nur in WT zu. Für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  waren diese Unterschiede lediglich als Trend erkennbar. Eine signifikante Differenz war einzig in der FE von  $\text{K}^+$  zwischen weiblichen WT und KD vorhanden (Abbildung 29).

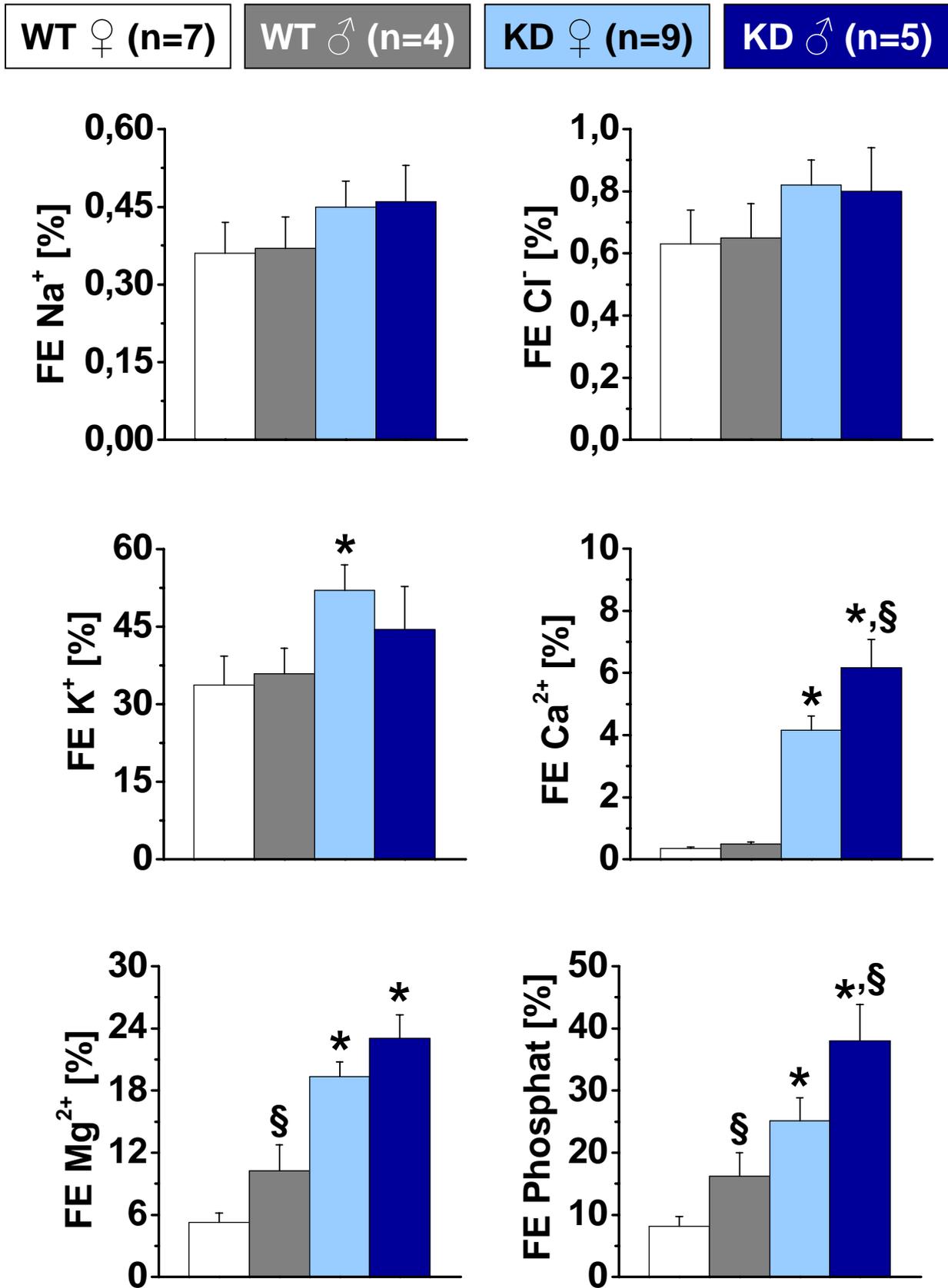


Abbildung 29: Fraktionelle Exkretionen von Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Phosphat

### 3.3 Quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR

Aufbauend auf den Ergebnissen der Tubulusperfusion und den erhobenen metabolischen Parametern stellte sich die Frage, ob sich zugehörige Veränderung in der Genexpression aufzeigen lassen.

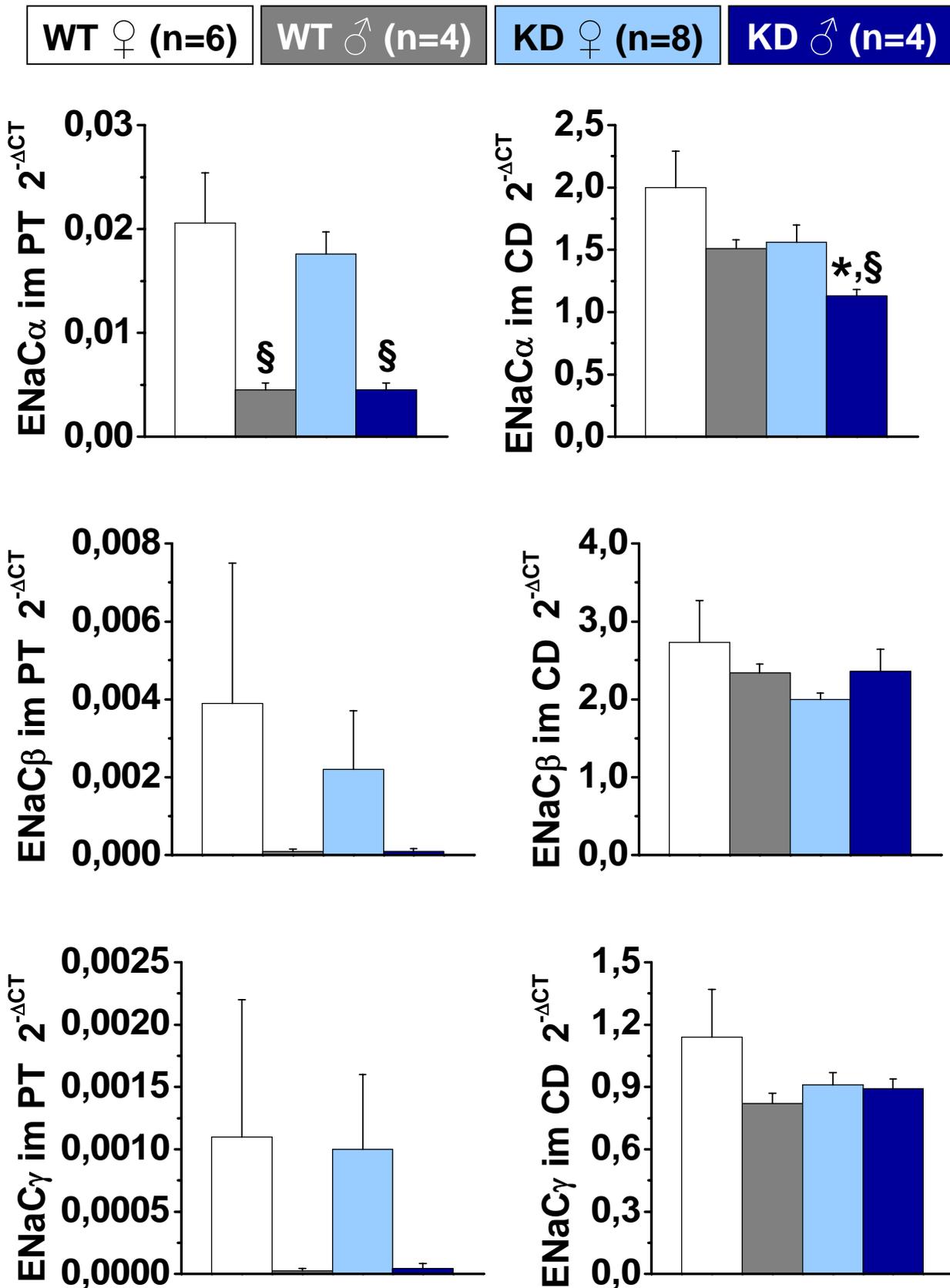
#### *ENaC*

Nachdem die Tubulusperfusion einen stimulierten Amilorid-hemmbareren Transport im Sammelrohr zeigte, wurde die mRNA der drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  des epithelialen Natriumkanals ENaC quantifiziert. Es sollte überprüft werden, ob sich die erhöhte Aldosteron-Konzentration [20] und der Natriumverlust in KD [59] in einer erhöhten ENaC-Expression widerspiegeln.

Darüber hinaus wurde die ENaC-Expression im proximalen Tubulus (PT) untersucht. Neben dem Amilorid-sensitiven ENaC im Sammelrohr (CD), wurde in der Literatur ein ebenfalls durch Amilorid hemmbarer Kanal im PT beschrieben [32, 63]. Diesbezüglich sollte in dieser Arbeit überprüft werden, inwieweit ENaC proximal-tubulär vorhanden ist und ob dieser zur Kompensation des latenten  $\text{Na}^+$ -Verlustes beiträgt.

Die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit im PT wies sowohl in WT als auch in KD einen signifikanten Geschlechtsunterschied auf. Dieser war ebenfalls als gleichgerichteter Trend für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zutreffend. Die Expressionswerte für die  $\alpha$ -Untereinheit lagen im PT etwa 100- bis 400-fach unter denen des CD und für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten waren die Werte sogar circa 600- bis 30000-fach niedriger als im CD (Abbildung 30). Bei diesem sehr niedrigen Expressionsniveau streuten die Werte verstärkt, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten.

Im Sammelrohr war die Expression der ENaC  $\alpha$ -Untereinheit in männlichen KD signifikant um etwa 130 Prozent gegenüber der männlichen WT Vergleichsgruppe reduziert. Zudem wiesen die KD hier einen Geschlechtsunterschied auf. In den Daten zu den übrigen ENaC-Untereinheiten zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Allerdings wiesen männliche WT gegenüber weiblichen WT in allen Untereinheiten einen Trend zu einer niedrigeren Expression auf. In den weiblichen WT streuten die Expressionswerte ungeachtet des größeren Kollektivs stärker (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Relative mRNA Menge für ENaC $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  in proximalem Tubulus und Sammelrohr  
Diese Diagramme zeigen die auf die „Housekeeping“ Gene HPRT1 und GAPDH normierte Expression des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im proximalen Tubulus (PT) und Sammelrohr (CD) der oben dargestellten Gruppen.

### *NCC und TRPV5*

Sowohl der NaCl-Kotransporter (NCC) als auch der Kalzium-Kanal TRPV5 werden im distalen Konvolut (DCT) exprimiert. Der DCT befindet sich stromabwärts des CLDN16 Knockdowns in der TAL. Die Expression dieser beiden Transportwege wurde untersucht, um zum einen die Hypothese der Kompensation des latenten NaCl-Verlustes in der TAL zu bestätigen [20, 59] und zum anderen zu prüfen, inwieweit die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Urin einen Einfluss auf die Expression des TRPV5 Kanals hat.

Der NCC wurde im distalen Tubulus von männlichen KD signifikant höher exprimiert als in WT. In weiblichen Tieren zeigte sich dieses lediglich als Trend (Abbildung 31).

Die Expression von TRPV5 war über beide Geschlechter hinweg in KD signifikant höher als in WT. Zudem bestand sowohl in WT als auch in KD ein deutlicher Geschlechtsunterschied (Abbildung 31).

### *NHE3*

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher 3 (NHE3) wird in der luminalen Membran des proximalen Tubulus (PT) exprimiert und dient der  $\text{Na}^+$ -getriebenen Protonenausscheidung. KD wiesen gegenüber WT einen niedrigeren Urin pH-Wert auf (siehe 3.2) und waren zudem in der Lage, ihren  $\text{Na}^+$ -Verlust (siehe 3.1 und 3.2) zu kompensieren. Deshalb wurde die NHE3 Expression als ein potenzieller Kompensationsmechanismus analysiert.

Die NHE3 Expression war in weiblichen Mäusen auf einem Niveau. Demgegenüber wiesen männliche KD signifikant höhere Werte als männliche WT auf. Überdies bestand ein signifikanter Geschlechtsunterschied in der WT Population, welcher sich in KD lediglich als Tendenz manifestierte (Abbildung 32).

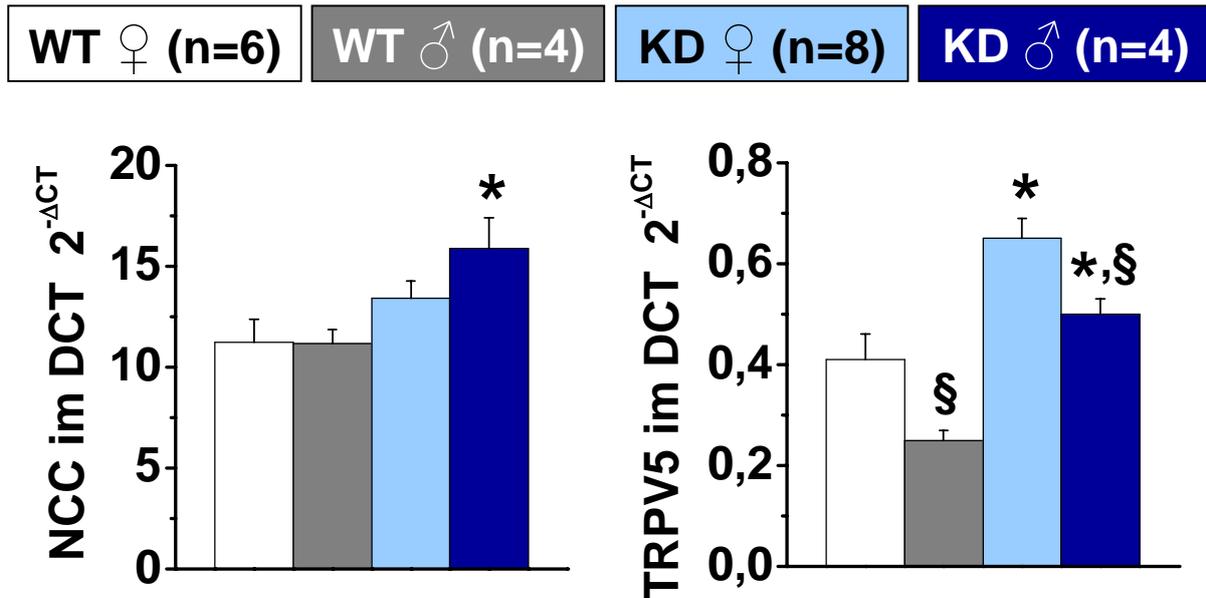


Abbildung 31: Relative mRNA Menge für NCC und TRPV5 in distalem Konvolut

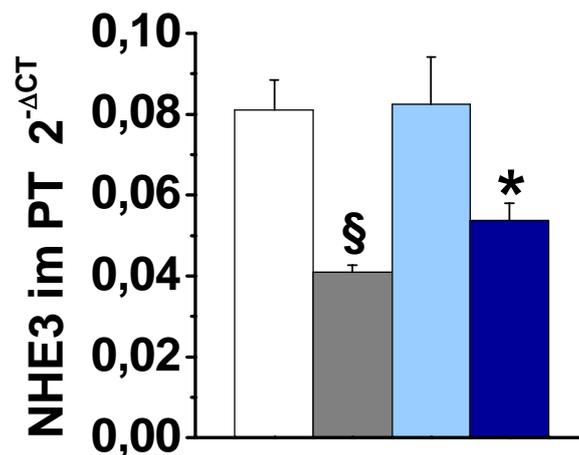
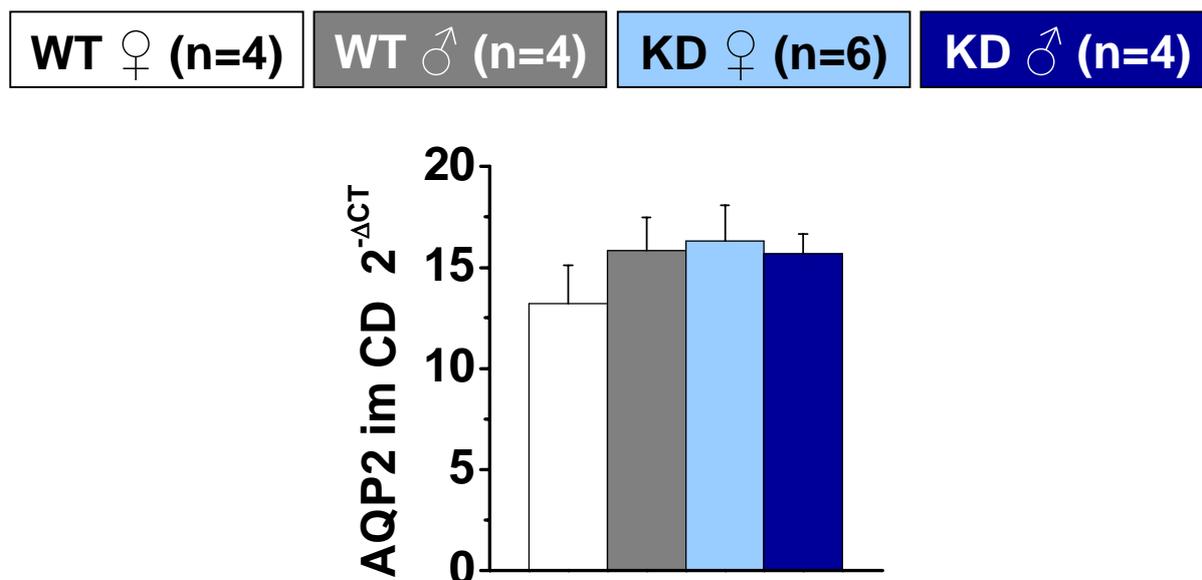


Abbildung 32: Relative mRNA Menge für NHE3 in proximalem Tubulus

### AQP2

Aquaporin-2 (AQP2) ist ein apikal lokalisierter Wasserkanal in den Hauptzellen des Sammelrohres. Die Expression von AQP2 wurde vor allem auf dem vermehrten Urinfluss aufbauend (siehe 3.2) mittels der quantitativen Real-Time PCR untersucht.

Neben einer Tendenz zu erhöhten Werten in männlichen gegenüber weiblichen WT befanden sich die Expressionsdaten für AQP2 auf einem vergleichbaren Niveau (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Relative mRNA Menge für AQP2 im Sammelrohr

*Claudine (3, 10, 11, 16, 19)*

Die Claudin-Expression in der TAL wurde ermittelt, da bisher nicht hinreichend bekannt war, ob der Knockdown eines Gens die Expression anderer Gene kompensatorisch heraufregulieren kann, so wie es beim Knockout der Fall ist [64, 65]. Zudem sind diese Expressionsdaten für eine Interpretation der Daten aus dem Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt von entscheidender Bedeutung.

Da die mRNA-Menge für die einzelnen Claudine unter der Detektionsgrenze für die quantitative Real-Time PCR lag, wurden die Proben in einen WT und einen KD Pool aus jeweils 16 Mäusen zusammengeführt. Aus diesem Grund sind diese Daten lediglich qualitativ zu interpretieren. Die KD zeigten gegenüber den WT eine deutliche Minderung, jedoch kein Fehlen der CLDN16 Expression. Bei den übrigen Claudinen zeigte sich eine gleichgerichtete Tendenz. Die Messwerte für CLDN11 lagen nur marginal oberhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 34).

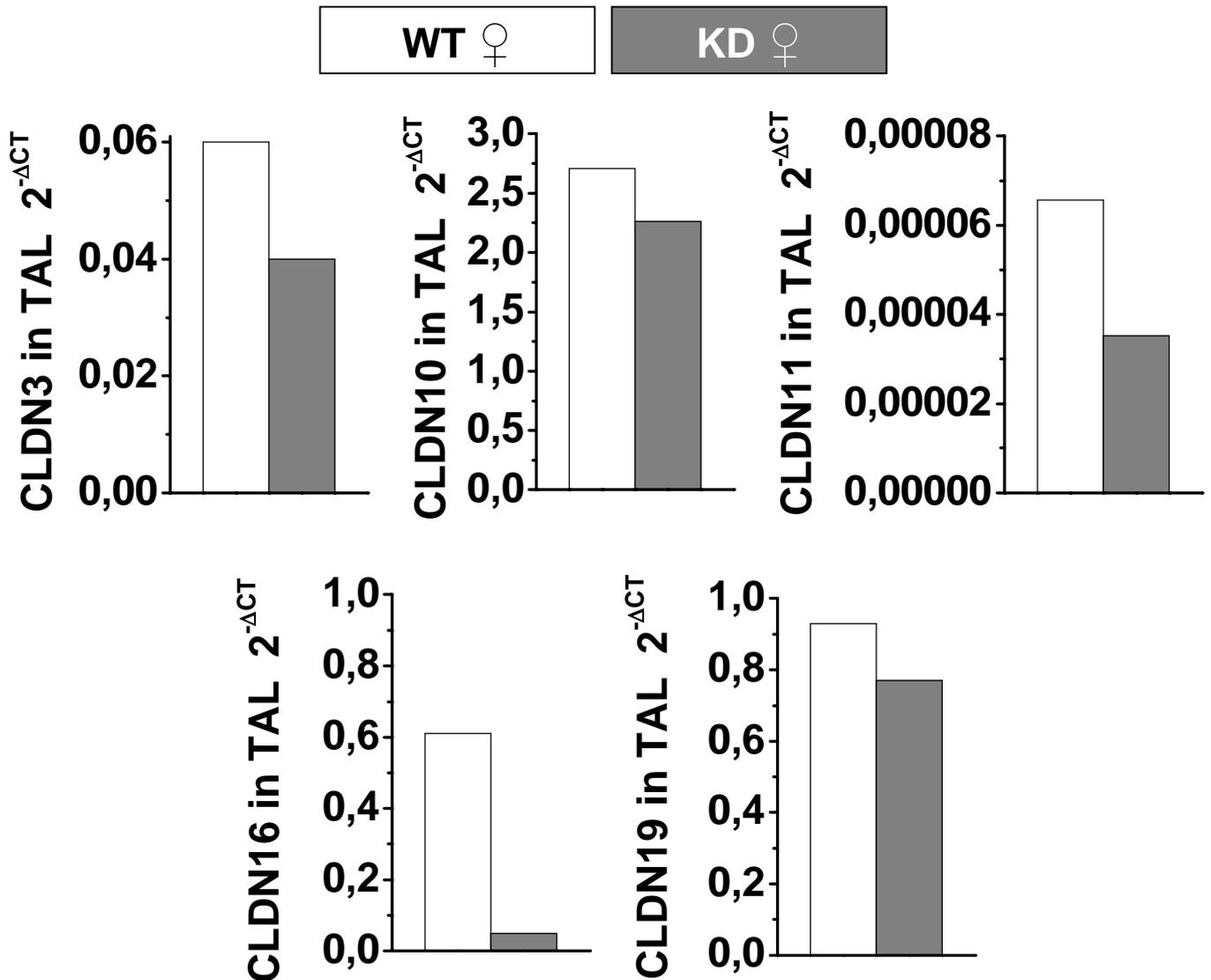


Abbildung 34: Relative mRNA Menge für Claudin-3, -10, -11, -16, -19 in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife

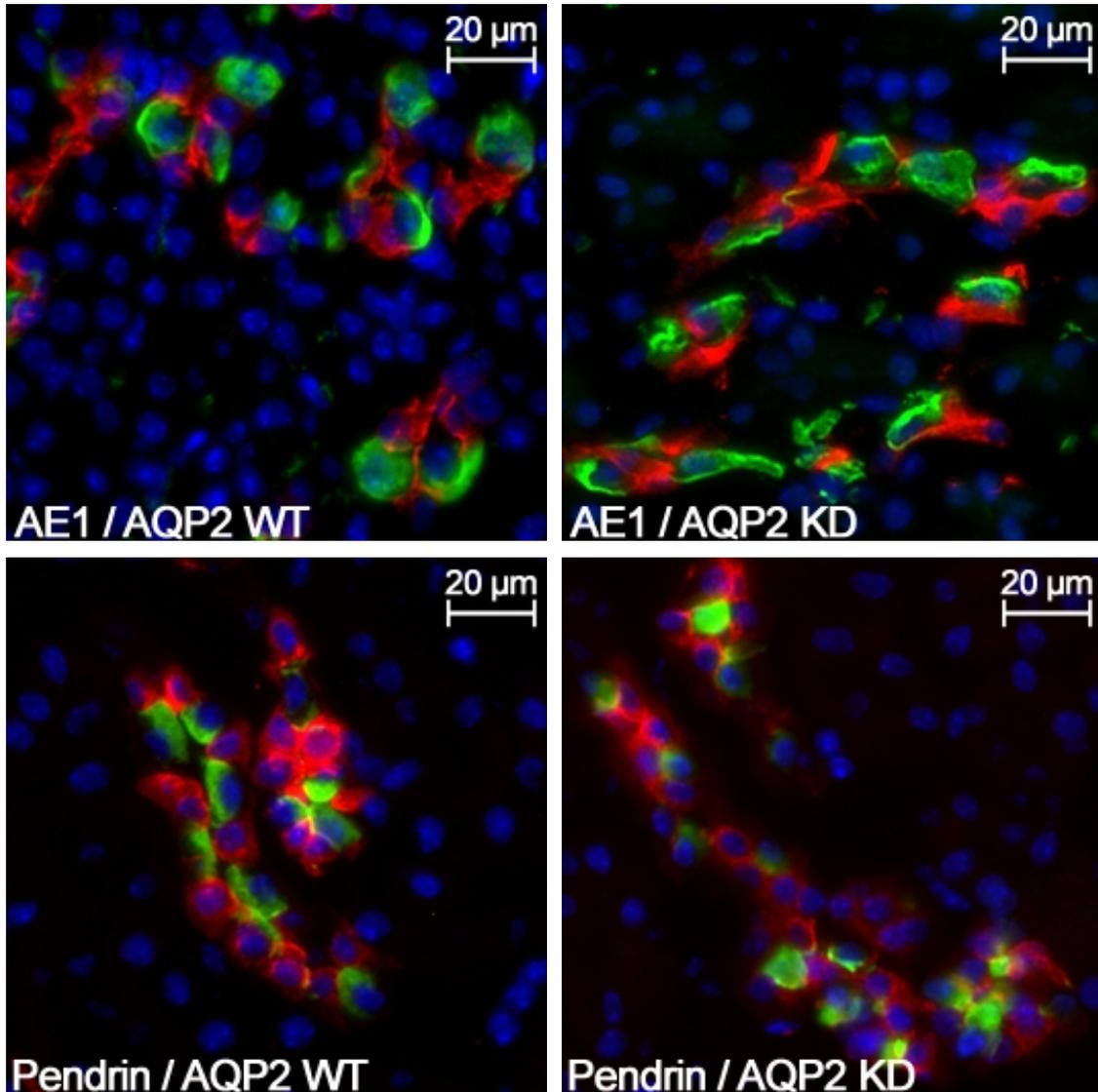
### 3.4 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die quantitative Real-Time PCR kann keine Aussage über den Funktionszustand und die intrazelluläre beziehungsweise membranständige Lokalisation einzelner Proteine geben. Deshalb wurden die Proteine AE1 und Pendrin mit Fokussierung auf die Säure-Basen-Imbalance fluoreszenz-immunhistochemisch analysiert. Eine Doppelfärbung mit AQP2 diente hierbei zur Differenzierung von Haupt- und Zwischenzellen. Die digitalisierten Bilder wurden ausgewertet und unter qualitativen Gesichtspunkten betrachtet.

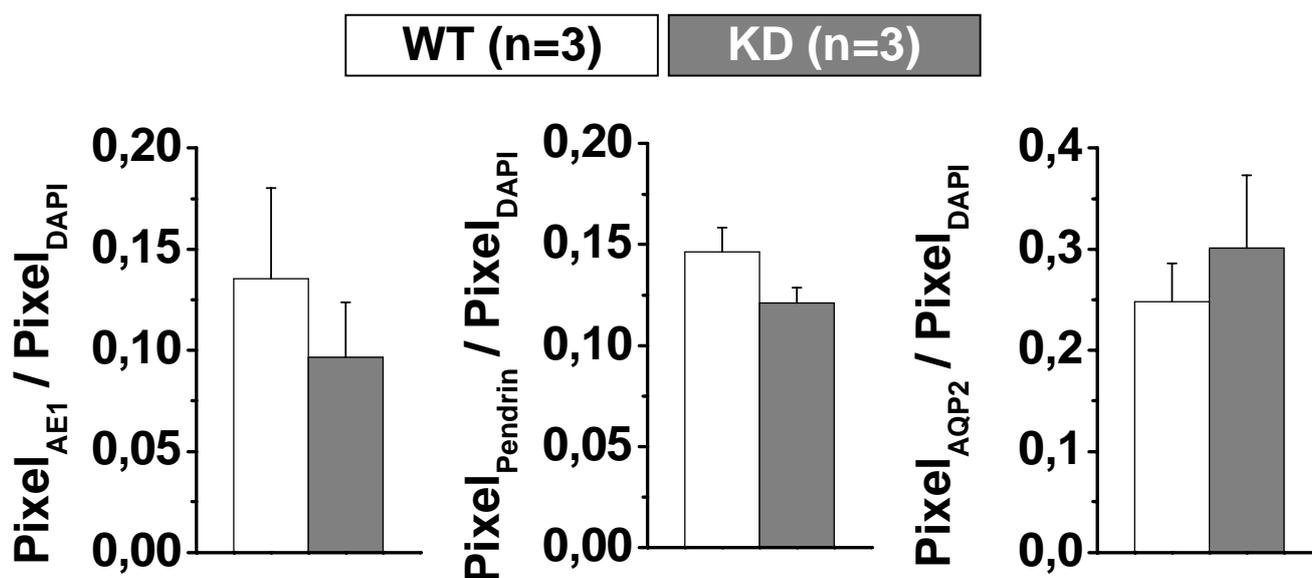
#### *AE1, Pendrin und AQP2*

Die Lokalisation von AE1 (basolateral), Pendrin (luminal) und Aquaporin-2 (luminal und intrazellulär) war in der Fluoreszenz-Immunhistochemie in WT und KD mit den Angaben in der Literatur übereinstimmend (Abbildung 35 oben).

Im Rahmen dieser ersten Untersuchung zeigten sich keine deutlichen qualitativen Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 35 unten).



**Abbildung 35:** Immunfluoreszenz von AE1 und AQP2 beziehungsweise Pendrin und AQP2 in WT und KD. Dargestellt sind 400 x 400 Pixel große Bildausschnitte, die mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. In der ersten Reihe sind der Anionen-Austauscher 1 (grün; AE1) und Aquaporin 2 (rot; AQP2) in WT (links) und KD (rechts) dargestellt. In der zweiten Reihe sind Pendrin (grün) und AQP2 (rot) angefärbt. Die Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) hervorgehoben.



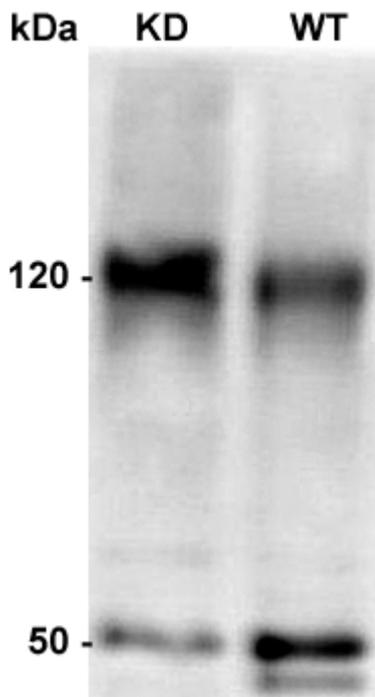
**Abbildung 36:** Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenz  
Qualitative Auswertung der AE1-, Pendrin- und AQP2-Fläche im Verhältnis zur DAPI-Fläche (Kernfärbung).

### 3.5 SDS-PAGE und Western Blot

Da eine quantitative Auswertung von Fluoreszenz-mikroskopischen Bildern nicht sehr sensitiv und durch viele Faktoren (vor allem Schnittebene und ausgewähltes Areal) beeinflussbar ist, wurden die Proteine AE1, Pendrin und AQP2 im Western Blot in Relation zu  $\alpha$ -Aktin („Housekeeping“ Protein) quantifiziert. Überdies wurde die Expression der ebenfalls am Säure-Basen-Haushalt beteiligten Proteine V-Typ  $H^+$ -ATPase und P-Typ  $H^+/K^+$ -ATPase bestimmt.

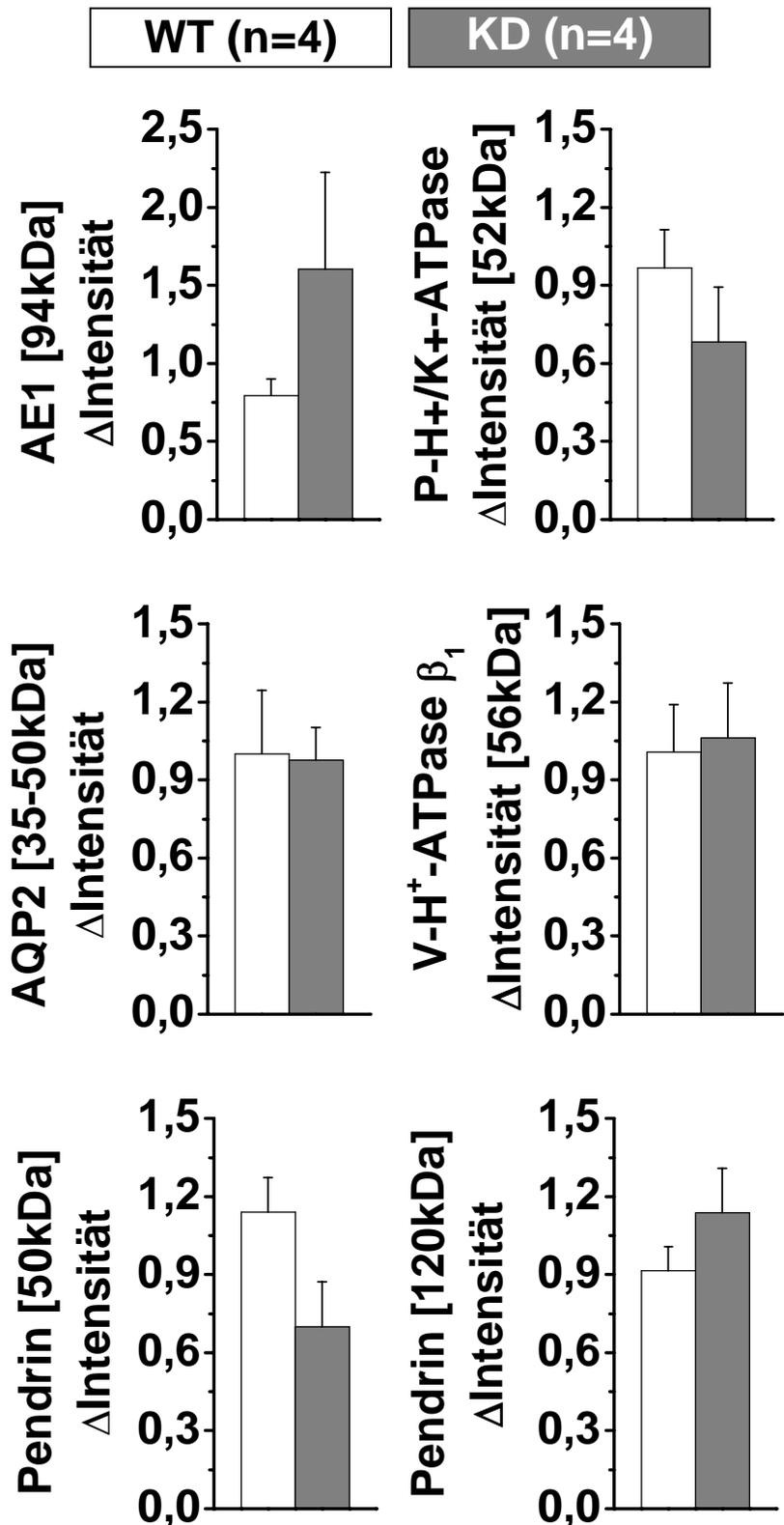
Bei der Auswertung der relativen Intensität ( $\Delta$ Intensität) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen. Es war jedoch ein Trend zu vermehrter AE1- und verminderter P-Typ  $H^+/K^+$ -ATPase-Expression vorhanden (Abbildung 38). Pendrin nahm eine Sonderstellung ein, da ein 50 kDa Fragment tendenziell herunter- und ein 120 kDa Fragment heraufreguliert war (Abbildung 37).

Ergänzend zu den in Abbildung 38 gezeigten Daten wurden  $\Delta$ Intensitäten für die 103 kDa Bande von AE1 ( $0,9 \pm 0,5$  in WT versus  $1,2 \pm 0,2$  in KD), die 29 kDa Bande von AQP2 ( $1,0 \pm 0,3$  in WT versus  $1,1 \pm 0,1$  in KD) und die 60-80 kDa Bande der P-Typ  $H^+/K^+$ -ATPase ( $1,1 \pm 0,3$  in WT versus  $0,9 \pm 0,2$  in KD) bestimmt.



**Abbildung 37:** Pendrin Fragmente im Western Blot

In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot Ausschnitt mit KD (links) und WT (rechts) dargestellt. Es ist jeweils Pendrin markiert, wobei die oberen Banden ein Protein der Größe 120 kDa und die unteren Banden ein Protein von 50 kDa markieren. In diesem Beispiel werden die Tendenz zu der Hochregulation des 120 kDa Proteins und die Herunterregulation des 50 kDa Fragments in KD deutlich.



**Abbildung 38:** Quantitative Auswertung des Western Blots  
Aufgetragen wurde die Intensität der jeweiligen Proteinbanden in Relation zum „Housekeeping“ Protein  $\alpha$ -Aktin ( $\Delta$ Intensität). Dabei wurden die oben stehenden Gruppen miteinander verglichen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methoden

#### 4.1.1 Mausmodell

Tier- und insbesondere Mausmodelle sind in der modernen Grundlagenforschung unverzichtbar. Auch wenn sich Mäuse in Genom und Anatomie vom Menschen unterscheiden, zeigen sie auch große Gemeinsamkeiten und teilen viele physiologische Grundprozesse und Interaktionen mit dem Menschen.

Moderne molekularbiologische und -genetische Methoden erlauben gezielte Manipulationen des murinen Genoms für die experimentelle Grundlagenforschung. Diese Technik nimmt in der modernen medizinischen Grundlagenforschung einen hohen Stellenwert ein. Sobald für eine menschliche Krankheit über moderne gentechnische Verfahren ein mögliches pathophysiologisch verändertes Kandidatenprotein identifiziert wurde, ist es heutzutage möglich ein murines Modell der Krankheit zu generieren. Zu diesen modernen molekulargenetischen Methoden gehören hierbei der Knockout und der Knockdown. Dabei werden beim klassischen Knockout Gene auf der Ebene der nukleären DNA durch genetische Modifikation deaktiviert. Dieses unterbindet deren Transkription. Der Knockdown Ansatz, auch als posttranskriptionelles „Gen-Silencing“ bezeichnet, basiert auf der erstmals 1998 von Fire und Mello beschriebenen RNA Interferenz [66]. Hierbei wird eine zielerkennende RNA-Sequenz mittels eines Vektors in den Zielorganismus eingeführt. Die in den Wirt eingeführte RNA interferiert mit Zielsequenzen auf der transkribierten mRNA und führt dadurch zu einer spezifischen Translationsblockade und einer beschleunigten Degradation.

Im Gegensatz zum klassischen Knockout können bei dem Knockdown Ansatz Restfunktion beziehungsweise Proteinreste vorhanden sein. In der Erstbeschreibung des Claudin-16 Knockdown Modells [20] war bei der Prüfung der Knockdown-Effektivität die Claudin-16-mRNA Expression 100-fach reduziert, demgegenüber zeigten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mäuse nur eine circa 10-fache Reduktion. Als mögliche Ursache kommt hier ein gradueller Verlust der Expressionseffektivität über die Generationen in Frage, da die hier eingesetzten Versuchstiere von männlichen F2-F3 Claudin-16-Knockdown Mäusen abstammten. In der Literatur ist der Verlust des Knockdown-Effekts über Generationen beschrieben [67], aber nicht systematisch untersucht. Zwei Studien an Ratte und Maus zeigten aber auch eine über Generationen gleichbleibende Knockdown-Effizienz [68, 69]. Trotzdem zeigten die hier

verwendeten Mäuse durchweg die Symptome der FHHNC, sodass davon auszugehen ist, dass die siRNA-Effizienz, wenn auch geringer, so doch ausreichend war.

Um die Tiergruppe möglichst homogen zu halten, wurden außerdem Geschwistertiere untersucht. Der Phänotyp der Claudin-16 Knockdown Maus im Kontext der menschlichen FHHNC wird in einem späteren Abschnitt diskutiert werden.

#### **4.1.2 Tubulusperfusion**

Die Perfusion von Nierentubuli stellt ein überaus anspruchsvolles Verfahren dar, mit dem wichtige Daten zu den Transportvorgängen an nativem Nierengewebe gewonnen werden können. Für eine konstante Messqualität und somit unverzerrte Ergebnisse ist eine lange Einarbeitungs- und Übungszeit erforderlich, weshalb die in dieser Arbeit gezeigten Daten durch Dr. Qixian Shan erhoben wurden.

Ungeachtet der hohen Anforderungen an den Untersucher bietet die Tubulusperfusion die Möglichkeit das transepitheliale Potenzial und den transepithelialen Widerstand des Tubulus zu bestimmen. Über diese Parameter lassen sich direkt während der Messung Aussagen bezüglich Gewebektivität und Präparationsqualität treffen. Außerdem besteht die Möglichkeit, Lumen und Tubulusaußenseite mit verschiedenen Lösungen zu perfundieren, womit elektrogene Transportvorgänge wie zum Beispiel der Natriumtransport durch ENaC mittels Pharmaka wie Amilorid blockiert und analysiert werden können. Dadurch bietet diese Methode einen Zugang zur Erfassung dynamischer, funktioneller Regulationsmechanismen, die mit anderen Methoden wie zum Beispiel molekularbiologischen Verfahren nicht erfasst werden können.

#### **4.1.3 Metabolische Daten**

Die Versuchstiere wurden auf metabolischen Käfigen untersucht. Diese stellen ein hilfreiches Instrument zur Analyse und zum Vergleich bestimmter Stoffwechselfparameter dar. Allerdings sind diese Versuche mit einer Änderung der gewohnten Umgebung und auch Stress verbunden [70]. Die dadurch entstehenden Messfehler sind jedoch systematisch für alle Versuchstiere und lassen sich zudem durch eine ausreichende Experimentalzeit (in diesem Fall 24 Stunden) minimieren. Ein weiteres Problem der Stoffwechselkäfige lag in der Trennung von Kot und Urin (Abbildung 17). So funktionierte diese nicht immer vollständig, wodurch die Urin-Elektrolyte und der Säure-Basen-Status beeinflusst wurden. Eine Auswertung dieser Veränderungen zeigte jedoch, dass diese ohne signifikanten Einfluss auf das Endergebnis waren.

Die anschließende Messung der Plasma- und Urin-Elektrolyte erfolgte im Zentrallabor Kiel des UK-SH mit etablierten Messverfahren, die durch regelmäßige Qualitätskontrollen geprüft werden. Während die Konzentrationsbestimmung von chemischen Komponenten wie Harnstoff und Ionen über ionenselektive Elektroden dabei soweit unproblematisch war, ist gerade für die Kreatinin-Bestimmung zu bedenken, dass das Messverfahren für menschliche Blut- und Urinproben optimiert ist. Dieser Umstand führte zu einer gewissen Ungenauigkeit, vor allem der Plasma-Werte, und einer dadurch bedingten größeren Streuung der Werte. Geringe Unterschiede in den Nierenparametern Kreatinin-Clearance und den fraktionellen Exkretionen werden somit eventuell übersehen.

Die Bestimmung der Osmolalität mittels Gefrierpunktniedrigung ist ein Standardverfahren. Die Urin-Osmolalität zeigte dabei durch interindividuelle Unterschiede im Trinkverhalten eine große Streubreite.

Die Analyse der Blut- und Urin-Gase ist ein sehr gutes Mittel um Störungen im Säure-Basen-Haushalt zu identifizieren. Trotz der integrierten Kalibrierung in unserem Blutgas-Analysator sind regelmäßige Qualitätskontrollen erforderlich, um einen Defekt von Messsonden auszuschließen. Ein weiteres Problem stellt die Äquilibration der Proben mit atmosphärischem Kohlenstoffdioxid dar. Neben luftdichtem Verschließen nach Probenentnahme ist eine umgehende Messung notwendig, um verfälschte  $p\text{CO}_2$ - und dadurch auch  $\text{HCO}_3^-$ -Werte (siehe 2.4.4) zu vermeiden.

#### **4.1.4 Expressionsanalysen**

Eine Messung der mRNA mittels quantitativer Real-Time PCR erlaubt Einblicke in die Expression ausgewählter Gene. Diese Methode ist sehr empfindlich und eignet sich zur Detektion geringster Mengen an mRNA. Die Empfindlichkeit stellt allerdings auch ein Problem dar. Dadurch kann am Beispiel der Messung von ENaC im PT (Abbildung 30) mit teils 30000-fach niedrigeren Messwerten als im CD nicht ausgeschlossen werden, dass eine minimale Kontamination mit einzelnen Sammelrohr-Epithelzellen als Störfaktor wirkte. Überdies macht der Einsatz geringer Volumina diese Methode trotz Mehrfachbestimmungen empfindlicher für Pipettierfehler. Diese waren jedoch bei einer sehr geringen Streuung innerhalb der Mehrfachbestimmungen vernachlässigbar. Ein weiteres Problem stellen die auf einen definierten mRNA-Abschnitt hin generierten TaqMan-Sonden dar. Im Rahmen der Auswertung lässt sich nicht eindeutig verifizieren, ob das gewünschte Gen vollständig detektiert oder zum Beispiel eine potenziell vorhandene Splice-Variante desselben übersehen wurde. Dies könnte beispielsweise bei der Messung von ENaC-Untereinheiten im PT und auch bei

der Bestimmung der Claudin-11 Expression in der TAL zu falsch-niedrigen Messwerten geführt haben.

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie ermöglicht die Darstellung der intrazellulären Lokalisation und Kolo-kalisation von Proteinen. Für diesen Zweck ist dieses Verfahren sehr gut geeignet. Die Quantifizierung von Proteinen mit dieser Methode ist allerdings nicht oder nur sehr bedingt möglich, denn im Falle einer semiquantitativen Auswertung von Einzelschnitten sind die Ergebnisse stark abhängig von Schnittebene und jeweiligem Sichtfeld.

Der Western Blot stellt das geeignetere Verfahren zur Bestimmung der Proteinexpression dar. Die Qualität der Ergebnisse ist dabei jedoch von geeigneten, spezifischen Antikörpern, einem einheitlichen experimentellen Protokoll und einer ausreichenden Gewebemenge abhängig. Um diese notwendige Gewebemenge zu erreichen, wurde in dieser Arbeit das Homogenisat je einer gesamten Niere untersucht. Dadurch wurden jedoch die zu untersuchenden Proteine, die nur einen geringen Anteil des gesamten Organs ausmachen, verdünnt. Dies kann dazu führen, dass auch mit dieser Methode geringe Änderungen in der Proteinexpression übersehen werden.

Unsere Untersuchungsverfahren gaben keinen Einblick in die Regulation der entsprechenden Proteine durch Phosphorylierung, durch regulatorische Untereinheiten oder durch kontrolliertes „Trafficking“ von sub- nach transmembranär. Eine weitere wichtige Regulationsform stellt die proteolytische Spaltung von Membranproteinen dar [71]. Von den eingesetzten Methoden kann einzig der Western Blot diese erfassen, wenn der genutzte Antikörper neben dem gesamten Protein auch das kleinere, abgespaltene Fragment bindet oder ein zusätzlicher für das Spaltprodukt spezifischer Antikörper eingesetzt wird.

Allgemein darf bei allen Expressionsanalysen nicht vernachlässigt werden, dass diese Momentaufnahmen darstellen und damit keine Informationen über funktionelle Aspekte wie Aktivitäts- und Verlaufsänderungen bieten können.

## **4.2 Phänotyp der Claudin-16 defizienten Maus im klinischen Kontext**

Die CLDN16 Knockdown Maus (KD) weist vielseitige Störungen in der Elektrolyt-Homöostase auf und zeigt gegenüber Wildtyp-Mäusen veränderte metabolische Grundparameter, dabei spiegeln die KD die Kernmerkmale von FHHNC Patienten wieder (Tabelle 10).

Dennoch ist ein Vergleich zwischen einem Mausmodell und einem Patientenkollektiv mit Problemen behaftet. Der Phänotyp einer Maus wird unter kontrollierten Umweltbedingungen mit definiertem Futter analysiert.

Der Vergleich erfolgt mit einer relativ seltenen Erbkrankheit, wobei klinisch einzelne Familien ohne direkte Vergleichsgruppen untersucht und die Ergebnisse dabei auf zum Teil streuende Normwerte bezogen werden [19, 72].

**Tabelle 10:** Phänotypische Kernmerkmale von FHHNC Patienten und CLDN16 Knockdown Mäusen

Parameter	FHHNC	CLDN16 Knockdown	
		weiblich	männlich
Körpergewicht	<sup>a</sup>	↓	↓
Trinkwasseraufnahme	↑ <sup>[16, 17, 19, 72, 73]</sup>	↑	↔
Urinfluss	↑ <sup>[16, 17, 19, 72-75]</sup>	↑	↔
<b>Urin</b>			
Ca <sup>2+</sup>	↑ <sup>[16, 17, 19, 72, 73, 75]</sup>	↑	↑
Mg <sup>2+</sup>	↑ <sup>[16, 17, 19, 73, 75]</sup>	↑	↑
<b>Serum/Plasma</b>			
Ca <sup>2+</sup>	↔ <sup>[17, 73]</sup>	↑	↑
Mg <sup>2+</sup>	↓ <sup>[16, 17, 19, 72-75]</sup>	↓	↓

<sup>a</sup> eingeschränktes Längenwachstum beschrieben [72]

Hierbei sei zudem angemerkt, dass neuere Studien Anlass zur weiteren Differenzierung des FHHNC Patientenkollektivs geben. So sind neben Claudin-16 auch Claudin-19 Mutationen beschrieben, die neben einer Nierenbeteiligung auch Sehstörungen hervorrufen und somit einen abweichenden Phänotyp nahelegen [11, 19]. Hier sind weitere differenziertere Studien notwendig. So ist bei der Bewertung früherer klinischer Studien Vorsicht angebracht, denn mehrere dieser berichten neben den Kernsymptomen auch über Sehstörungen einiger Patienten [12, 17, 76, 77]. Der Phänotyp der FHHNC in Bezug auf die Schwere der Erkrankung wird überdies stark durch die Lokalisation der CLDN16 Mutation und dem daraus resultierenden partiellen oder kompletten Funktionsverlust beeinflusst [19]. Diesem Aspekt wurde bisher in keiner der vorliegenden klinischen Studien Achtung geschenkt, was die klinische Datenlage weiter kompliziert.

Allgemein bestehen neben vielen Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Maus auch viele nicht zu vernachlässigende Unterschiede. Diese haben zur Folge, dass keine direkte, interpretationsfreie Übertragung von experimentellen Resultaten aus dem Tiermodell möglich ist. Diese Differenzen können eine Ursache für widersprüchliche Ergebnisse beim Vergleich von Tierversuchs- und Studiendaten sein.

### 4.2.1 Claudin-Expression

Zur Evaluation des Mausmodells und zum Ausschluss einer potenziellen Beeinträchtigung der Expression wurden die Claudin-Subtypen in der TAL quantifiziert. Erwartungsgemäß zeigte sich hierbei eine deutliche Reduktion der Claudin-16 Expression, allerdings war überraschenderweise noch eine geringe Basisexpression vorhanden (siehe 4.1.1). Auch die Expression des nach neuesten Erkenntnissen mit Claudin-16 kolocalisierenden Claudin-19 war nicht wesentlich verändert [18]. Für eine Hochregulation anderer Claudine im Sinne einer Kompensation gab es keine Anhaltspunkte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass kein anderes Claudin, die Claudin-16 Funktion ersetzen kann.

### 4.2.2 Schlüsselsymptome

Die ersten Symptome, die zum Aufsuchen eines Arztes führen, treten bei Patienten mit familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) im Mittel im Alter von  $1,5 \pm 1,3$  Jahren auf. Das mittlere Diagnosealter beträgt dabei  $5,9 \pm 4,3$  Jahre [16]. Frühsymptome sind Karpopedalspasmen, Konvulsionen, Rachitis, Nierenkoliken bei Steinabgang, Polydipsie, Polyurie und rezidivierende Harnwegsinfekte. Klinisch-chemisch präsentiert sich stets eine deutliche Hypomagnesiämie. Eine Hyperkalziurie liegt ebenfalls bei allen Patienten ohne fortgeschrittene Niereninsuffizienz vor [16, 17]. Zudem bestehen erhöhte Parathormonkonzentrationen [17], die mit einer vermehrten Mobilisierung von Knochenkalzium einhergehen. Darüber hinaus kann bei allen Patienten eine bilaterale Nephrokalzinose, deren Schwere mit der Progressionsrate der Niereninsuffizienz korreliert, nachgewiesen werden [16, 17].

In Claudin-16 Knockdown Mäusen waren die Urinausscheidung und die fraktionelle Exkretion von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  wie auch in FHHNC Patienten massiv erhöht (Tabelle 10). Ebenso wiesen KD eine Hypomagnesiämie auf. Einzig die erhöhten Plasma- $\text{Ca}^{2+}$ -Werte, die in den Versuchstieren vorhanden waren, sind nicht in Patientenstudien beschrieben (Tabelle 10). Auch bei diesem Phänomen ist es dabei durchaus möglich, dass die Veränderungen in Mäusen aufgrund des homogenen Kollektivs aufgedeckt wurden und demgegenüber in Patienten nicht auffallen, wo sie in der großen Streubreite untergehen. Die Plasma- $\text{Ca}^{2+}$ -Werte sind „hoch-normal“ und erst im Vergleich mit den WT Geschwistern auffällig. Auch in einer Studie, in der fünf Patienten mit FHHNC und bekannter Mutation in Claudin-16 über Jahre beobachtet wurden, zeigten sich hoch-normale Plasma- $\text{Ca}^{2+}$ -Werte, die jedoch im Klinikalltag nicht abgegrenzt wurden und mangels direkter Vergleichsgruppe auch nicht anders bewertet werden konnten [72]. Betrachtet man das Salzverlustsyndrom durch Mutation in Claudin-16

als mildes Bartter-Syndrom, lassen sich auch Parallelen zu einem Mausmodell mit bekannter Mutation im NKCC2 finden [78]. Die Mäuse zeigen neben deutlich ausgeprägterem NaCl-Verlust (siehe 4.2.3) auch eine Erhöhung in der Plasma- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wahrscheinlich aufgrund einer Hyperprostaglandinämie [79]. Auch ein klinischer Fallbericht zeigt, dass ein Hyperprostaglandin E Syndrom mit Hyperkalziämie und -urie einhergeht [80]. Somit ist neben der bekannten Erhöhung der Vitamin-D-Plasmakonzentration in KD [20] auch eine erhöhte Prostaglandin-Synthese zu diskutieren. Messbar ist die hochregulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückresorption als TRPV5 Expression in KD [81, 82]. In Patienten konnten im Vergleich erhöhte Parathormon Konzentrationen und gestörtes Knochenwachstum nachgewiesen werden [12, 17, 72]. Bei den durchgeführten Experimenten wiesen die KD gegenüber den WT ein niedrigeres Körpergewicht bei erhöhtem Urinfluss und vermehrter Trinkwasseraufnahme auf. Auch bei FHHNC Patienten sind Polyurie und Polydipsie wegweisende Kernmerkmale, die übereinstimmend in Patientenstudien berichtet werden (Tabelle 10). Hierbei sei darauf hingewiesen, dass die phänotypischen Merkmale in weiblichen Mäusen überwiegend ausgeprägter waren. Ebenso wurde über mehr weibliche FHHNC Patienten berichtet [12, 72, 76]. Dieses könnte wie in den Versuchstieren durch einen ausgeprägteren Phänotyp und eine dadurch deutlichere klinische Manifestation mit folglich erleichterter Diagnosestellung verursacht sein.

Die aufgrund der Literatur wahrscheinlichste Ursache der Polyurie liegt in der hohen Urin- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Nach neuesten Erkenntnissen [83, 84] führt dabei die Aktivierung des luminalen kalziumsensitiven Rezeptors (CaSR) im Sammelrohr einerseits zu einem verminderten Einbau des AQP2-Wasserkanals und andererseits zu einer vermehrten Protonen-Sekretion über die luminalen  $\text{H}^+$ -ATPase. In Kombination führt dies zu einer deutlich erhöhten Produktion von angesäuertem Urin, sodass es trotz massiv erhöhten Urin- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht zur Präzipitation kommt. Über die Membranlokalisation von AQP2 können wir auf Grund unserer Ergebnisse keine Aussage treffen, jedoch scheint die Expression auf genetischer Ebene in Claudin-16 Knockdown Mäusen nicht erhöht zu sein, was mit einer reinposttranslationalen Regulation über den CaSR vereinbar wäre.

Über die untersuchten Parameter hinausgehend wurden in der Erstpublikation zu der KD Kalkablagerungen entlang der Basalmembran von medullären Tubuli und im Interstitium im Sinne einer Nephrokalzinose beschrieben [20]. Diese gehören ebenfalls zu dem Vollbild der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose.

### 4.2.3 NaCl-Homöostase

In der Perfusion von isolierten Sammelrohren konnte gezeigt werden, dass der Amilorid-abhängige Transport in KD stimuliert ist (siehe 3.1). Dies spricht für einen stimulierten  $\text{Na}^+$ -Transport im Sammelrohr (CD), da Amilorid ein spezifischer Blocker des ENaC ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Natrium-Rückstrom-Hypothese [20].

Weitere Daten von der Claudin-16 Knockdown Maus zeigen, dass diese unter einer Behandlung mit dem ENaC-Inhibitor Amilorid renal vermehrt NaCl ausscheiden und darüber eine Hyponatriämie entwickeln [59]. Dass sich unter den Normbedingungen in dieser Arbeit keine Hyponatriämie und einzig eine Tendenz zu einer erhöhten fraktionellen Exkretion für Natrium in KD zeigte, spricht neben den bekannten erhöhten Plasma-Aldosteronwerten [20] für einen latenten Natriumverlust.

Unter diesem Aspekt überraschend ist das ausgeglichene Plasma-Kalium, da  $\text{Na}^+$ -Resorption im CD direkt an die Sekretion von  $\text{K}^+$  gekoppelt ist. Dies spricht für eine Gegenregulation der NaCl- und  $\text{H}_2\text{O}$ -Homöostase auf der Ebene des gesamten Organismus. An dieser Stelle sind vor allem, die eng in die renale Regulation eingebundenen Hormone, Renin, Angiotensin II, Aldosteron und ADH zu nennen. Durch eine vermehrte Aktivierung dieser Hormonachsen ließe sich eine Änderung des Transporterprofils im distalen Konvolut (DCT) und Sammelrohr erklären. In diesem Sinne wurde im DCT eine erhöhte NCC Expression detektiert. Auf die Expression des ENaC konnte jedoch überraschenderweise kein vergleichbarer Effekt gezeigt werden. Das lässt vermuten, dass im  $\text{Na}^+$ -Transport des CD größere Reserven existieren und eine Anpassung an erhöhte luminale Salzkonzentrationen primär auf funktioneller Ebene abläuft. Diese Vermutung wird durch aktuelle Forschungsergebnisse gestützt, nach denen die ENaC-Funktion unter anderem durch *sgk1*-vermittelte Phosphorylierung, proteolytische Spaltung der Untereinheiten und weniger durch eine Änderung der Expression moduliert wird [49, 71, 85, 86].

Die Untersuchung der ENaC Expression im proximalen Tubulus (PT) ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass sich die Expression auf einem äußerst niedrigen Niveau befand und in einigen Proben nicht detektierbar war. Dieses Ergebnis zeigt die Grenzen der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) auf. So ist entgegen der postulierten Expression von ENaC im PT [32, 63] eine Expression im PT der KD als Kompensationsmechanismus unwahrscheinlich und der Nachweis in einigen Proben am ehesten als eine Kontamination mit CD Zellen zu diskutieren. Andererseits könnte es sich im PT jedoch auch um Splice-Varianten handeln, die nicht von den TaqMan Sonden erkannt werden. Die qRT-PCR weist jegliche zur eingesetzten Sonde passende mRNA nach. Aus

diesem Grund ist eine Aussage zur Expression von minimal exprimierten Genen in Organuntereinheiten problematisch, da Kontaminationen selbst bei akkurater Trennung der Segmente nicht zu vermeiden sind. Die Konsequenz daraus ist, dass sich in diesem Fall die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR auf ganze Organe oder auf selektiv in dem jeweiligen Organsegment exprimierte Strukturen beschränken sollte.

#### 4.2.4 Säure-Basen-Haushalt

Für FHHNC Patienten sind Säure-Basen-Veränderungen im Sinne einer inkompletten distalen renal-tubulären Azidose (dRTA) beschrieben. Störungen im Sinne einer dRTA konnten in KD nicht festgestellt werden.

Die weiblichen KD wiesen bei unverändertem Vollblut pH ein erhöhtes Plasma  $\text{HCO}_3^-$  auf. Überdies zeigten weibliche und männliche KD einen deutlich erniedrigten Urin pH und ein vermindertes Urin  $\text{HCO}_3^-$  (Tabelle 11). Im Sinne einer Azidose wären diese Veränderungen allenfalls mit einer metabolisch kompensierten respiratorischen Azidose vereinbar. Dieses ist jedoch unwahrscheinlich, da der Gendefekt der Mäuse in der Niere und nicht im respiratorischen System liegt. Aus diesem Grund ist eine respiratorisch kompensierte metabolische Alkalose die passendere Interpretation der Säure-Basen-Störung.

**Tabelle 11:** Säure-Basen-Status in FHHNC Patienten und CLDN16 Knockdown Mäusen

Parameter	FHHNC	CLDN16 Knockdown	
		weiblich	männlich
Vollblut pH	$\leftrightarrow$ [17, 73] / $\downarrow$ [74, 75]	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$
Plasma $\text{HCO}_3^-$	$\leftrightarrow$ [17, 73, 75]	$\uparrow$	$\leftrightarrow$
Urin pH	$\uparrow$ [19, 75]	$\downarrow$	$\downarrow$
Urin $\text{HCO}_3^-$	-	$\downarrow$	$\downarrow$

Für die Entwicklung einer metabolischen Alkalose sprechen weitere Argumente. Im isolierten proximalen Tubulus wurde in männlichen KD mittels der qRT-PCR eine vermehrte Expression des  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauschers 3 (NHE3) festgestellt. Dabei waren weibliche Tiere bereits von Beginn an auf einem höheren Niveau. Eine Hochregulation des NHE3 führt zu vermehrter  $\text{Na}^+$  Resorption bei gleichzeitiger Protonen Sekretion. NHE3 könnte somit potenziell zur Kompensation des  $\text{Na}^+$  Verlustes in der TAL beitragen und im gleichen Zuge an der vermehrten Urinansäuerung beteiligt sein. Die vorhandenen Unterschiede in der NHE3 Expression können die ausgeprägte Säure-Basen-Störung jedoch nicht allein erklären, da der Protonenverlust in beiden Geschlechtern gleichermaßen vorhanden ist. Zudem ist der NHE3 dem Defekt in der TAL vorgeschaltet. Dennoch könnte der bereits diskutierte, potenziell

vorhandene latente NaCl Verlust [59], auch bei kompensiertem, systemischem Phänotyp (Tabelle 7) die Expression und Funktion des NHE3 beeinflussen.

Eine weitere Erklärung für die veränderte Expression in männlichen KD bietet das erhöhte Aldosteron [20]. Dieses kann die NHE3 Expression und Aktivität über den *sgk1* Signalweg stimulieren [87].

Zudem wurde in KD ein verringertes lumenpositives Potenzial ( $+V_{te}$ ) in der TAL festgestellt (siehe 1.3.3). Dieses könnte neben der Triebkraftminderung für divalente Kationen auch eine parazelluläre  $\text{HCO}_3^-$  Sekretion senken. Trotz der Kationen-Selektivität der TAL in WT gibt es Hinweise auf parazelluläre  $\text{HCO}_3^-$  Sekretion unter Normbedingungen [88]. So wird unter anderem Claudin-8 in der aTL, TAL und Macula densa nicht exprimiert (Abbildung 3). Für dieses wiederum wurde gezeigt, dass es den parazellulären Weg für saure und basische Ionen blockiert und Zellen ohne Claudin-8 stark permeabel für diese Ionen sind [89].

Auch das im Betrag erhöhte lumennegative Potenzial ( $-V_{te}$ ) im Sammelrohr kann zu einem Protonenverlust führen (siehe 3.1). Ein hohes  $-V_{te}$  erhöht die Effizienz der Protonenpumpen (V-Typ  $\text{H}^+$ -ATPase und P-Typ  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) in Schaltzellen Typ A (Abbildung 12) und bewirkt darüber eine vermehrte Sekretion von Protonen. Um das Ausmaß des dadurch entstehenden Protonenverlustes abzuschätzen, zeigt Abbildung 39 den Einfluss einer Membranpotenzialänderung um +10 mV auf die Protonenausscheidung am Beispiel der V- $\text{H}^+$ -ATPase. Diese Änderung entspricht dem beobachteten höheren  $-V_{te}$  im Sammelrohr von KD. Dabei

1. 
$$U_{\text{ATP}} = \frac{W_{\text{ATP}}}{Q_{\text{H}^+}} = \frac{W_{\text{ATP}}}{F * 2 \text{ mol H}^+} = 295,38 \text{ mV} \quad (\text{bei } 57 \text{ kJ / mol ATP [90]})$$
2. 
$$[\text{H}^+]_{e1} = \frac{[\text{H}^+]_i}{10^{(U_{\text{ATP}} + E_M) / (-61,54 \text{ mV})}} = 1,84 * 10^{-4} \text{ mol/l} = \text{pH } 3.74 \quad \text{bei } \text{pH}_i = 7.4 ; E_M = -70 \text{ mV}$$
3. 
$$[\text{H}^+]_{e2} = \frac{[\text{H}^+]_i}{10^{(U_{\text{ATP}} + E_M) / (-61,54 \text{ mV})}} = 2,67 * 10^{-4} \text{ mol/l} = \text{pH } 3.57 \quad \text{bei } \text{pH}_i = 7.4 ; E_M = -60 \text{ mV}$$
4. 
$$\frac{[\text{H}^+]_{e2}}{[\text{H}^+]_{e1}} = 1,45 \rightarrow 145\%$$

**Abbildung 39:** Einfluss des Membranpotenzials auf die Effizienz der Protonenpumpen

Diese Rechnung approximiert den Einfluss einer Membranpotenzialänderung um +10 mV auf die Protonenausscheidung am Beispiel der V- $\text{H}^+$ -ATPase. Zunächst wurde die durch ATP-Spaltung erreichbare Spannung für den aktiven Protonentransport berechnet (1). Hierbei wurde die Stöchiometrie der primär aktiven  $\text{H}^+$ -ATPase von 0,5 ATP pro Proton berücksichtigt [91] und zur Ladungsberechnung ( $Q_{\text{H}^+}$ ) die Faraday-Konstante ( $F = 96485,3399 \text{ C/mol}$ ) genutzt. In Schritt 2 und 3 wurden schließlich die maximal erreichbaren extrazellulären Protonen-Konzentrationen berechnet, wobei zwischen den Schritten das Membranpotenzial um 10 mV variiert wurde. Dabei entspricht  $[\text{H}^+]_{e1}$  der extrazellulären  $\text{H}^+$  Konzentration in WT und  $[\text{H}^+]_{e2}$  der in KD.

Aus der Berechnung resultiert, dass eine Erhöhung des luminalen Membranpotenzials um 10 mV bzw. des transepithelialen Potenzials um -10 mV die Protonenkonzentration um 45% steigern kann (4).

kann die errechnete Steigerung der Protonenkonzentration um 45 Prozent im Sammelrohr lumen nicht allein die über 500-fache Steigerung in KD erklären.

Der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus wurde schon im Abschnitt 4.2.2 kurz diskutiert und stellt die, CaSR vermittelt, hochregulierte V-H<sup>+</sup>-ATPase dar. Dieser Mechanismus vermindert ergänzend zu der vermehrten Urinausscheidung die Präzipitation von Ca<sup>2+</sup> in der Niere und stellt dadurch einen wichtigen Schutzmechanismus bei Hyperkalziurie dar [83, 92]. Die Aldosteron-Erhöhung [20] hat im Sammelrohr eine gleichgerichtete Wirkung. Unter anderem durch Aktivierung des PLC/PKC-Signalwegs wird in Hauptzellen die Sekretion von Protonen über NHE2 stimuliert. Dies führt bei langfristig erhöhtem Aldosteron zu einer hypokaliämischen, metabolischen Alkalose [47]. Diese Tatsache ist auch gleichzeitig mein Hauptkritikpunkt an den klinischen Studien. So wurde die inkomplette dRTA als mögliches Diagnosekriterium, die hypokaliämische, metabolische Alkalose jedoch als Ausschlusskriterium für die FHHNC definiert. Dieser Umstand kann dazu führen, dass die FHHNC in einigen Patienten nicht oder verspätet diagnostiziert wird.

Neben diesen primär funktionellen Erklärungen des Protonenverlustes wurde zudem die Expression von Protonen- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transportsystemen im Sammelrohr analysiert.

Die Expression und intrazelluläre Lokalisation der Chlorid-/Hydrogencarbonat-Austauscher AE1 [44, 93] und Pendrin [41, 94, 95] sind sehr eng an den Säure-Basen- und Elektrolyt-Haushalt geknüpft. Zudem stellen beide Proteine mögliche Kompensationsmechanismen für die Störungen im Säure-Basen-Haushalt der KD dar.

Bei der qualitativen Auswertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie fand sich jedoch kein Hinweis auf eine veränderte intrazelluläre Lokalisation oder deutliche Änderung der Expression. Auch die semiquantitative Auswertung des Western Blots zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede, mit den Einschränkungen, die bereits unter 4.1.4 diskutiert wurden. Für Pendrin wurde gezeigt, dass die Expression unter chronischer Furosemid Behandlung in Ratten erhöht war [94]. Dabei hat die Therapie mit Furosemid ähnliche Auswirkungen wie der Knockdown von Claudin-16. So kommt es in der TAL ebenfalls zur verminderten Aufnahme von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Cl<sup>-</sup> und wie in KD zu erhöhten Konzentrationen dieser Ionen in den distalen Tubulussegmenten. Diese Änderung der Pendrin-Expression konnten wir in unseren Versuchen nicht nachweisen. Eine mögliche, Methoden-unabhängige Erklärung für diese Differenzen stellen neben der Zeitkomponente die unterschiedlichen Plasma-Elektrolytkonzentrationen dar. Während KD sich im K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Haushalt nicht von WT unterschieden, wiesen die Ratten unter Furosemid-Behandlung eine Hypokaliämie und -chlorämie auf [94]. Dabei ist die Hypochlorämie mit großer Wahrscheinlichkeit ausschlag-

gebend, denn für diese wurde eine stimulierende Wirkung auf die Pendrin Expression gezeigt [95]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Expression von AE1 im Rahmen einer Azidose [93] und die Pendrin-Expression bei einer vorhandenen Alkalose gesteigert bzw. bei einer Azidose gesenkt wird [41]. Dass die potenziell vorliegende metabolische Alkalose in KD keine Auswirkungen auf die Expression der beiden Proteine hatte, könnte dadurch erklärt werden, dass die Störung kompensiert war und keine Auswirkungen auf den Vollblut pH-Wert hatte. Dies legt eine Expressionsregulation dieser Säure-Basen-Proteine von der Blutseite nahe.

Die Expression der Protonenpumpen (V-H<sup>+</sup>-ATPase und P-H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) im Sammelrohr wurde ebenfalls im Western Blot semiquantitativ ermittelt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KD. Dieses Ergebnis war unerwartet und nicht mit der Hypothese vereinbar, dass auch in Claudin-16 Knockdown Mäusen eine Hyperkalziurie zu einem Expressionsanstieg der V-H<sup>+</sup>-ATPase führt [83]. Allerdings scheint die V-H<sup>+</sup>-ATPase Aktivität bei Hyperkalziurie weniger auf Expressionsebene als auf funktioneller Ebene reguliert zu sein [83].

In der Summe sind an den Störungen im Säure-Basen-Haushalt wahrscheinlich mehrere Mechanismen beteiligt. Im Hinblick auf klinische Studien sollte der Ausschluss von Patienten mit einer hypokaliämischen Alkalose erneut überdacht werden. Die in diesem Mausmodell gewonnenen Daten suggerieren eine kompensierte Alkalose und die Möglichkeit eines K<sup>+</sup>-Verlustes (siehe 4.2.3).

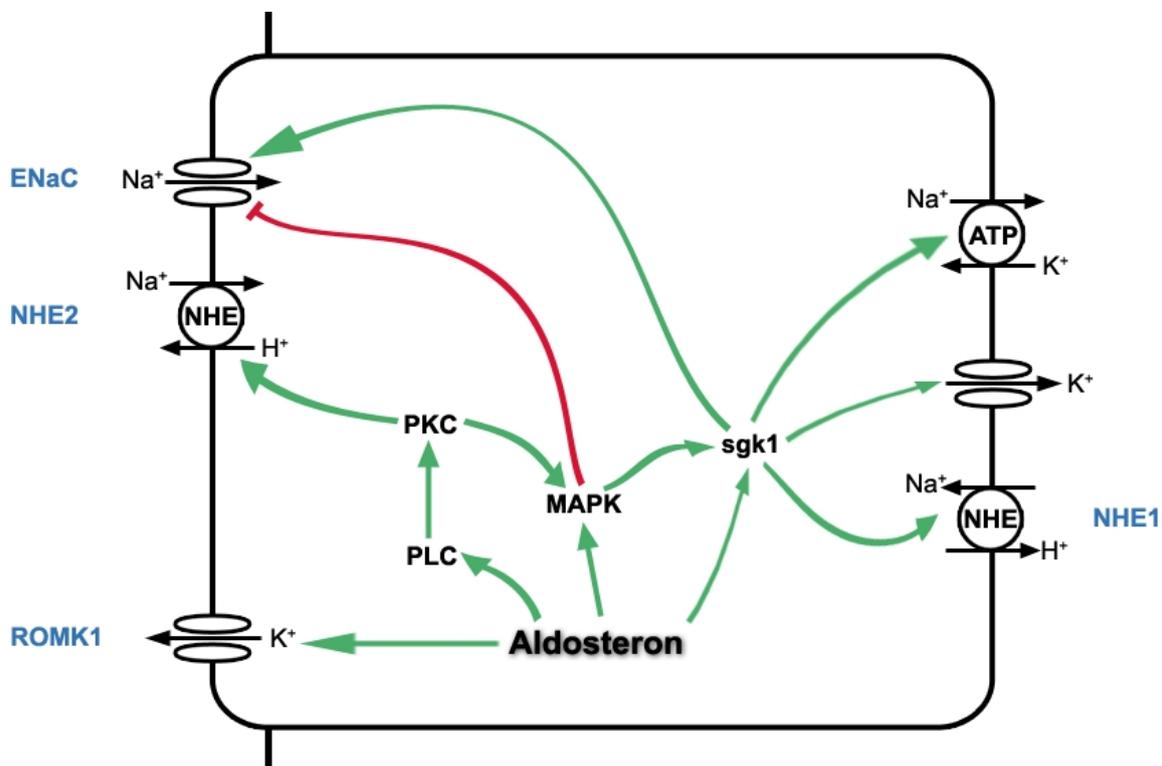
### 4.3 Ausblick

Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten metabolischen Experimenten, den Expressionsdaten und der Gegenüberstellung mit Patientenstudien gezeigt werden, dass die KD ein gutes Modell für die FHHNC darstellt. Insbesondere zur Identifikation von molekularen Mechanismen, die in Menschen nicht untersucht werden können, stellen die KD ein potentes Hilfsmittel dar. Sie bietet zudem neben den bisher klinisch beobachteten Hauptsymptomen weitere Symptomkomplexe, die eventuell ebenfalls von klinischer Relevanz sein könnten, jedoch ohne dieses Modell im klinischen Alltag in der Streubreite der Normwerte untergehen würden. Ungeachtet dessen könnten die aus KD gewonnenen neuen Symptomkomplexe zu alternativen, neuen Therapieansätzen führen.

Insbesondere im Hinblick auf eine vor kurzem generierte Claudin-19 Knockdown Maus [96] ist interessant welchen Phänotyp diese präsentiert und inwieweit sie ähnliche Störungen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt zeigt. Anhand des Vergleichs wird eine Einschätzung des Stellenwertes beider Gene möglich sein. Ein zweifach transgenes Mausmodell unter

Ausschaltung von Claudin-16 und -19 würde weitere Einblicke in die Genese und molekularen Mechanismen der FHHNC ermöglichen. Zudem könnte die funktionelle Relevanz der Interaktion zwischen Claudin-16 und Claudin-19 näher betrachtet werden [18, 96].

Überdies erfordern die diskutierten Ursachen der vermehrten Protonenausscheidung in KD weitere Experimente. Bisher nicht hinreichend untersucht, sind dabei vor allem die kurzfristigen Auswirkungen (< 30 Minuten) von Aldosteron auf den zellulären Säure-Basen-Transport [97]. Die in Abbildung 40 gezeigten Signalwege beeinflussen allesamt die Protonenausscheidung in Sammelrohr Hauptzellen. Diese Signalwege könnten bei zeitgleicher Tubulusperfusion und intrazellulärer pH-Messung mittels spezifischer Inhibitoren blockiert werden. Damit wäre eine Wertung der kurzfristigen Aldosteron-Auswirkungen und beteiligten Signalwege möglich.



**Abbildung 40:** Aldosteron-Wirkungen auf Hauptzellen im Sammelrohr

Aldosteron ist ein Hormon mit vielseitiger Wirkung auf den Ionentransport in Epithelzellen. Über die in der Abbildung dargestellten Signalwege beeinflusst es vor allem die Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>- und Säure-Basen-Homöostase. Dabei aktiviert Aldosteron vorrangig Mechanismen, die der Na<sup>+</sup>-Resorption dienen [97-101]. (ENaC = Epithelialer Natriumkanal; NHE = Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher; ROMK = Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks; PLC = Phospholipase C; PKC = Proteinkinase C; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; sgk1 = Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1)

## 5 Zusammenfassung

Von Familiärer Hypomagnesiämie und Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose (FHHNC) betroffene Patienten weisen die im Krankheitsnamen enthaltenen Kernsymptome auf. Ursächlich für diese Erkrankung sind Mutationen in den Tight Junction Proteinen Claudin-16 und Claudin-19.

Die in dieser Arbeit untersuchten Claudin-16 Knockdown Mäuse (KD) zeigen die FHHNC-Kernsymptomatik und dienen als Krankheitsmodell um die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu untersuchen. Der parazelluläre Transportweg in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) weist dabei eine verminderte Kationenselektivität in KD gegenüber ihren Wildtyp Geschwistern (WT) auf. Dieser Defekt hat einen Zusammenbruch der lumenpositiven Diffusionsspannung, die sich normalerweise im Verlauf der TAL aufbaut, zur Folge. Diese wiederum trägt im Gesunden wesentlich zum lumenpositiven Potenzial bei, das für die parazelluläre Reabsorption von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  in der TAL notwendig ist. Durch die verminderte Kationenselektivität ist zudem, neben der verminderten Reabsorption der divalenten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ , mit einem Rückstrom von  $Cl^-$  zusammen mit  $Na^+$  in das Tubuluslumen zu rechnen. Diese Hypothese unterstützend zeigten erste Untersuchungen neben einer erhöhten Aldosteron-Plasmakonzentration auch einen erniedrigten Blutdruck.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Elektrolyt-Haushalt von KD im Vergleich zu WT weiter charakterisiert.

In isolierten, perfundierten Sammelrohren wurde der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom als Maß für die  $Na^+$ -Aufnahme über den epithelialen Natriumkanal ENaC untersucht und war in KD gegenüber WT 5-fach höher.

Die detaillierte Phänotypisierung einer Kohorte von ca. 27 Wochen alten KD und WT beiderlei Geschlechts mittels metabolischer Käfige bestätigte den FHHNC Phänotyp der KD (25% niedrigeres Plasma  $Mg^{2+}$ , 13-fach erhöhte  $Ca^{2+}$  Ausscheidung über den Urin). Die KD wiesen zusätzlich 6-7% höhere Plasma  $Ca^{2+}$  Konzentrationen auf. NaCl Parameter in Urin und Plasma waren zwischen den beiden Gruppen nicht unterschiedlich und lediglich die fraktionelle  $K^+$  Ausscheidung in weiblichen Tieren etwa 1,5-fach erhöht.

Darüber hinausgehend zeigten KD eine Störung im Säure-Basen Haushalt mit einer verminderten  $HCO_3^-$  Ausscheidung und einem um ca. 0,5 pH Einheiten niedrigeren Urin pH. Der Plasma pH-Wert war kompensiert, lediglich die weiblichen KD Tiere wiesen zusätzlich ein leicht erhöhten Plasma  $HCO_3^-$  Wert auf.

Expressionsanalysen auf Ebene der mRNA und Proteine wurden durchgeführt, um den Veränderungen zugrundeliegende Anpassungen im Elektrolyttransport aufzudecken. Dabei zeigte sich in der quantitativen Real-Time PCR, neben Geschlechtsunterschieden, eine ca. 1,3 fach erhöhte Expression des Natrium-Protonen-Austauschers NHE3 im proximalen Tubulus und eine ca. 1,4 fach erhöhte Expression des Natrium-Chlorid Kotransporters NCC im distalen Konvolut von männlichen KD. Die qualitative Auswertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie für die Anionen-Austauscher AE1 und Pendrin im Sammelrohr ergab keine Hinweise auf eine deutliche Änderung der Expression. Auch die semiquantitative Auswertung des Western Blots, bei dem ergänzend die Protonenpumpen V-H<sup>+</sup>-ATPase und P-H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase einbezogen wurden, zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Defekt in Claudin-16 zu komplexen Veränderungen in der Ionen-Homöostase führt. Dabei bestätigen der funktionelle Nachweis einer erhöhten ENaC Aktivität im Sammelrohr, sowie die erhöhte Expression der am renalen Na<sup>+</sup> Transport beteiligten Proteine NHE3 und NCC den latenten Verlust von NaCl und stützen somit die Hypothese der veränderten Kationenselektivität in der TAL. Unter Normalbedingungen ist dieser Verlust in Bezug auf Plasma und Nierenparameter kompensiert und lediglich die fraktionelle Exkretion von K<sup>+</sup> deutet auf die bereits beschriebene erhöhte Aldosteron Konzentration hin. Zusätzlich wurde eine Störung des renalen Säure-Basen Transportes aufgedeckt, deren genauer pathophysiologischer Ursprung es noch aufzuklären gilt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Furuse, M., Tsukita, S.** (2006): Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology*. 16: 181-188.
2. **Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., Sawada, N.** (2008): Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1778: 588-600.
3. **Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Brickwedde, M. K. M. Z., Suzuki, A., Imhof, B. A., Vestweber, D.** (2003): The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of Cell Science*. 116: 3879-3891.
4. **Mankertz, J., Waller, J. S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Florian, P., Schoneberg, T., Fromm, M., Schulzke, J. D.** (2002): Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 298: 657-666.
5. **Muresan, Z., Paul, D. L., Goodenough, D. A.** (2000): Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 627-634.
6. **Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Anderson, J. M.** (2003): Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 285: F1078-F1084.
7. **Hou, J., Paul, D. L., Goodenough, D. A.** (2005): Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J.Cell Sci*. 118: 5109-5118.
8. **Van Itallie, C. M., Anderson, J. M.** (2004): The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc.Am.Thorac.Soc*. 1: 38-41.
9. **Van Itallie, C. M., Anderson, J. M.** (2006): Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*. 68: 403-429.
10. **Angelow, S., Yu, A. S. L.** (2007): Claudins and paracellular transport: an update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 16: 459-464.
11. **Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakkaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhaus, S. C. F., Nurnberg, P., Weber, S.** (2006): Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American Journal of Human Genetics*. 79: 949-957.
12. **Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Ronnefarth, G., Boswald, M., Bonzel, K. E., Seeman, T., Sulakova, T., Kuwertz-Broking, E., Gregoric, A., Palcoux, J. B., Tasic, V., Manz, F., Scharer, K., Seyberth, H. W., Konrad, M.** (2001): Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 12: 1872-1881.
13. **Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, C., Bettinelli, A., Colussi, C., Rodriguez-Soriano, J., Mccredie, D., Milford, D., Sanjad, S.,**

- Lifton, R. P.** (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*. 285: 103-106.
14. **Gunzel, D., Yu, A. S.** (2009): Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflugers Arch*. 458: 77-88.
15. **Angelow, S., Ahlstrom, R., Yu, A. S.** (2008): Biology of claudins. *American journal of physiology. Renal physiology*. 295: F867-876.
16. **Kari, J. A., Farouq, M., Alshaya, H. O.** (2003): Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Pediatric Nephrology*. 18: 506-510.
17. **Praga, M., Vara, J., Gonzalezparra, E., Andres, A., Alamo, C., Araque, A., Ortiz, A., Rodicio, J. L.** (1995): Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *Kidney International*. 47: 1419-1425.
18. **Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., Waldegger, S., Goodenough, D. A.** (2008): Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J.Clin.Invest*. 118: 619-628.
19. **Konrad, M., Hou, J., Weber, S., Dotsch, J., Kari, J. A., Seeman, T., Kuwertz-Broking, E., Peco-Antic, A., Tasic, V., Dittrich, K., Alshaya, H. O., Von Vigier, R. O., Gallati, S., Goodenough, D. A., Schaller, A.** (2008): CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J.Am.Soc.Nephrol*. 19: 171-181.
20. **Hou, J., Shan, Q., Wang, T., Gomes, A. S., Yan, Q., Paul, D. L., Bleich, M., Goodenough, D. A.** (2007): Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J.Biol.Chem*. 282: 17114-17122.
21. **Bleich, M., Shan, Q. X.** (2007): Epithelial K(+) channels: driving force generation and K(+) recycling for epithelial transport with physiological and clinical implications. *Sheng Li Xue.Bao*. 59: 443-453.
22. **Unwin, R. J., Capasso, G., Shirley, D. G.** (2004): An overview of divalent cation and citrate handling by the kidney. *Nephron Physiol*. 98: p15-20.
23. **Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R., Sheffield, V. C.** (2002): Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nature genetics*. 31: 171-174.
24. **Dai, L. J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H. S., Cole, D. E., Quamme, G. A.** (2001): Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiological reviews*. 81: 51-84.
25. **Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M.** (2005): Epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> channels in health and disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 16: 15-26.
26. **Hoenderop, J. G., Nilius, B., Bindels, R. J.** (2002): Molecular mechanism of active Ca<sup>2+</sup> reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol*. 64: 529-549.
27. **Riccardi, D., Brown, E. M.** (2010): Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*. 298: F485-499.
28. **Vezzoli, G., Soldati, L., Gambaro, G.** (2009): Roles of calcium-sensing receptor (CaSR) in renal mineral ion transport. *Current pharmaceutical biotechnology*. 10: 302-310.

29. **Hebert, S. C., Brown, E. M., Harris, H. W.** (1997): Role of the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *The Journal of experimental biology*. 200: 295-302.
30. **Bapty, B. W., Dai, L. J., Ritchie, G., Jirik, F., Canaff, L., Hendy, G. N., Quamme, G. A.** (1998): Extracellular Mg<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-sensing in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* 53: 583-592.
31. **Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., Sugatani, J., Degawa, M., Miwa, M.** (2008): Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochimica et biophysica acta*. 1778: 283-290.
32. **Willmann, J. K., Bleich, M., Rizzo, M., Schmidthieber, M., Ullrich, K. J., Greger, R.** (1997): Amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> conductance in rat proximal tubule. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 434: 173-178.
33. **Bachmann, S., Bostanjoglo, M., Schmitt, R., Ellison, D. H.** (1999): Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anatomy and Embryology*. 200: 447-468.
34. **Klinke, Rainer, Pape, Hans-Christian, Kurtz, Armin, Silbernagl, Stefan** (2010): *Physiologie*. Stuttgart: Thieme.
35. **Gradogna, A., Babini, E., Picollo, A., Pusch, M.** (2010): A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *The Journal of general physiology*. 136: 311-323.
36. **Lang, K., Wagner, C., Haddad, G., Burnekova, O., Geibel, J.** (2003): Intracellular pH activates membrane-bound Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger and vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase in human embryonic kidney (HEK) cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 13: 257-262.
37. **Krug, A. W., Papavassiliou, F., Hopfer, U., Ullrich, K. J., Gekle, M.** (2003): Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 446: 492-496.
38. **Karim, Z., Attmane-Elakeb, A., Bichara, M.** (2002): Renal handling of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in relation to the control of acid-base balance by the kidney. *Journal of Nephrology*. 15: S128-S134.
39. **Good, D. W., George, T., Watts, B. A., 3rd** (2011): High sodium intake increases HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in medullary thick ascending limb through adaptations in basolateral and apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *American journal of physiology. Renal physiology*.
40. **Watts, B. A., 3rd, George, T., Good, D. W.** (2006): Aldosterone inhibits apical NHE3 and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption via a nongenomic ERK-dependent pathway in medullary thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology*. 291: F1005-1013.
41. **Wagner, C. A., Finberg, K. E., Stehberger, P. A., Lifton, R. P., Giebisch, G. H., Aronson, P. S., Geibel, J. P.** (2002): Regulation of the expression of the Cl<sup>-</sup>/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney International*. 62: 2109-2117.
42. **Milton, A. E., Weiner, I. D.** (1998): Regulation of B-type intercalated cell apical anion exchange activity by CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 43: F1086-F1094.
43. **Purkerson, J. M., Schwartz, G. J.** (2007): The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int.* 71: 103-115.

44. **Barone, S., Amlal, H., Kujala, M., Xu, J., Karet, F., Blanchard, A., Kere, J., Soleimani, M.** (2007): Regulation of the basolateral chloride/base exchangers AE1 and SLC26A7 in the kidney collecting duct in potassium depletion. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 22: 3462-3470.
45. **Schmidt, Robert F., Lang, Florian** (2005): *Physiologie des Menschen: Springer-Lehrbuch*.
46. **Perazella, M. A., Setaro, J. F.** (2003): Renin-angiotensin-aldosterone system: Fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *Journal of Nuclear Cardiology*. 10: 184-196.
47. **Brem, A. S.** (2009): The Janus effect: two faces of aldosterone. *Kidney International*. 75: 137-U115.
48. **Zhang, D., Yu, Z. Y., Cruz, P., Kong, Q., Li, S., Kone, B. C.** (2009): Epigenetics and the control of epithelial sodium channel expression in collecting duct. *Kidney Int*. 75: 260-267.
49. **Lang, F., Henke, G., Embark, H. M., Waldegger, S., Palmada, M., Bohmer, C., Vallon, V.** (2003): Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 13: 41-50.
50. **Moeller, H. B., Olesen, E. T., Fenton, R. A.** (2011): Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification. *American journal of physiology. Renal physiology*. 300: F1062-1073.
51. **Knepper, M. A., Wade, J. B., Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Mandon, B., Chou, C. L., Kishore, B. K., Nielsen, S.** (1996): Renal aquaporins. *Kidney Int*. 49: 1712-1717.
52. **Nielsen, S.** (2002): Renal aquaporins: an overview. *BJU.Int*. 90 Suppl 3: 1-6.
53. **Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., Baltimore, D.** (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 295: 868-872.
54. **Greger, R.** (1981): Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Arch*. 390: 30-37.
55. **Schafer, J. A., Watkins, M. L., Li, L., Herter, P., Haxelmans, S., Schlatter, E.** (1997): A simplified method for isolation of large numbers of defined nephron segments. *Am.J.Physiol*. 273: F650-F657.
56. **Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N.** (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med*. 27: 95-125.
57. **Applied Biosystems** (2008): *Essentials of Real Time PCR*.
58. **Pfaffl, M. W.** (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ans.,tze zur exakten mRNA Quantifizierung. pp. 92-95.
59. **Himmerkus, N., Shan, Q., Goerke, B., Hou, J., Goodenough, D. A., Bleich, M.** (2008): Salt and acid-base metabolism in claudin-16 knockdown mice: impact for the pathophysiology of FHHNC patients. *American journal of physiology. Renal physiology*. 295: F1641-1647.

60. **Boron, Walter F., Boulpaep, Emile L.** (2009): Medical physiology : a cellular and molecular approach. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
61. **Davenport, Horace Willard** (1974): The ABC of acid-base chemistry : the elements of physiological blood-gas chemistry for medical students and physicians. 6th ed. Chicago: University of Chicago Press.
62. **Neumeister, Birgid, Claudi-Böhm, Simone** (2009): Klinikleitfaden Labordiagnostik : [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]. 4. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
63. **Gogelein, H., Greger, R.** (1986): Na<sup>+</sup> selective channels in the apical membrane of rabbit late proximal tubules (pars recta). *Pflugers Arch.* 406: 198-203.
64. **Sun, X., Petrovic, S.** (2008): Increased acid load and deletion of AE1 increase Slc26a7 expression. *Nephron Physiol.* 109: 29-35.
65. **Burnett, A. L., Nelson, R. J., Calvin, D. C., Liu, J. X., Demas, G. E., Klein, S. L., Kriegsfeld, L. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Snyder, S. H.** (1996): Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol.Med.* 2: 288-296.
66. **Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
67. **Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T., Okabe, M.** (2002): Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS letters.* 532: 227-230.
68. **Saito, Y., Yokota, T., Mitani, T., Ito, K., Anzai, M., Miyagishi, M., Taira, K., Mizusawa, H.** (2005): Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *The Journal of biological chemistry.* 280: 42826-42830.
69. **Dann, C. T., Alvarado, A. L., Hammer, R. E., Garbers, D. L.** (2006): Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103: 11246-11251.
70. **Gil, M. C., Aguirre, J. A., Lemoine, A. P., Segura, E. T., Barontini, M., Armando, I.** (1999): Influence of age on stress responses to metabolic cage housing in rats. *Cellular and molecular neurobiology.* 19: 625-633.
71. **Rossier, B. C., Stutts, M. J.** (2009): Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu.Rev.Physiol.* 71: 361-379.
72. **Wolf, M. T. F., Dotsch, J., Konrad, M., Boswald, M., Rascher, W.** (2002): Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatric Nephrology.* 17: 602-608.
73. **Tasic, V., Dervisov, D., Koceva, S., Weber, S., Konrad, M.** (2005): Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study. *Pediatric Nephrology.* 20: 1003-1006.
74. **Michelis, M. F., Davis, B. B., Linarell, Lg, Derubert, Fr, Drash, A. L.** (1972): Decreased Bicarbonate Threshold and Renal Magnesium Wasting in A Sibship with Distal Renal Tubular-Acidosis - (Evaluation of Pathophysiologic Role of Parathyroid-Hormone). *Metabolism-Clinical and Experimental.* 21: 905-920.

75. **Manz, F., Scharer, K., Janka, P., Lombeck, J.** (1978): Renal Magnesium Wasting, Incomplete Tubular-Acidosis, Hypercalciuria and Nephrocalcinosis in Siblings. *European Journal of Pediatrics*. 128: 67-79.
76. **Benigno, V., Canonica, C. S., Bettinelli, A., Von Vigier, R. O., Truttmann, A. C., Bianchetti, M. G.** (2000): Hypomagnesaemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol.Dial.Transplant*. 15: 605-610.
77. **Torralbo, A., Pina, E., Portoles, J., Sanchez-Fructuoso, A., Barrientos, A.** (1995): Renal magnesium wasting with hypercalciuria, nephrocalcinosis and ocular disorders. *Nephron*. 69: 472-475.
78. **Kemter, E., Rathkolb, B., Bankir, L., Schrewe, A., Hans, W., Landbrecht, C., Klaften, M., Ivandic, B., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabe De Angelis, M., Wolf, E., Wanke, R., Aigner, B.** (2010): Mutation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia. *American journal of physiology. Renal physiology*. 298: F1405-1415.
79. **Li, X., Tomita, M., Pilbeam, C. C., Breyer, R. M., Raisz, L. G.** (2002): Prostaglandin receptor EP2 mediates PGE2 stimulated hypercalcemia in mice in vivo. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 67: 173-180.
80. **Welch, T. R.** (1997): The hyperprostaglandin E syndrome: a hypercalciuric variant of Bartter's syndrome. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 12: 1753-1754.
81. **Hoenderop, J. G., Muller, D., Van Der Kemp, A. W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P. H., Van Os, C. H., Bindels, R. J.** (2001): Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J.Am.Soc.Nephrol*. 12: 1342-1349.
82. **Van De Graaf, S. F., Boullart, I., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J.** (2004): Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 by 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 and dietary Ca<sup>2+</sup>. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol*. 89-90: 303-308.
83. **Renkema, K. Y., Velic, A., Dijkman, H. B., Verkaart, S., Van Der Kemp, A. W., Nowik, M., Timmermans, K., Doucet, A., Wagner, C. A., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G.** (2009): The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J.Am.Soc.Nephrol*. 20: 1705-1713.
84. **Procino, G., Carmosino, M., Tamma, G., Gouraud, S., Laera, A., Riccardi, D., Svelto, M., Valenti, G.** (2004): Extracellular calcium antagonizes forskolin-induced aquaporin 2 trafficking in collecting duct cells. *Kidney Int*. 66: 2245-2255.
85. **Haerteis, S., Krueger, B., Korbmacher, C., Rauh, R.** (2009): The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J.Biol.Chem*. 284: 29024-29040.
86. **Kleyman, T. R., Carattino, M. D., Hughey, R. P.** (2009): ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J.Biol.Chem*. 284: 20447-20451.
87. **Musch, M. W., Lucioni, A., Chang, E. B.** (2008): Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na<sup>+</sup> pump activity. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*. 295: G909-G919.

88. **Capasso, G., Unwin, R., Rizzo, M., Pica, A., Giebisch, G.** (2002): Bicarbonate transport along the loop of Henle: Molecular mechanisms and regulation. *Journal of Nephrology*. 15: S88-S96.
89. **Angelow, S., Kim, K. J., Yu, A. S.** (2006): Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J.Physiol*. 571: 15-26.
90. **Berg, Jeremy M., Stryer, Lubert, Tymoczko, John L.** (2002): *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
91. **Portner, H. O., Bock, C., Reipschlager, A.** (2000): Modulation of the cost of pHi regulation during metabolic depression: a <sup>31</sup>P-NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J.Exp.Biol*. 203: 2417-2428.
92. **Wang, W., Praetorius, J., Li, C., Praetorius, H. A., Kwon, T. H., Frokiaer, J., Nielsen, S.** (2007): Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase expression is increased in acid-secreting intercalated cells in kidneys of rats with hypercalcaemia-induced alkalosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 189: 359-368.
93. **Fejestoth, G., Chen, W. R., Rusvai, E., Moser, T., Narayfejestoth, A.** (1994): Differential Expression of AE1 in Renal HCO<sub>3</sub>-Secreting and HCO<sub>3</sub>-Reabsorbing Intercalated Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 26717-26721.
94. **Quentin, F., Chambrey, R., Trinh-Trang-Tan, M. M., Fysekidis, M., Cambillau, M., Paillard, M., Aronson, P. S., Eladari, D.** (2004): The Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 287: F1179-F1188.
95. **Verlander, J. W., Kim, Y. H., Shin, W., Pham, T. D., Hassell, K. A., Beierwaltes, W. H., Green, E. D., Everett, L., Matthews, S. W., Wall, S. M.** (2006): Dietary Cl<sup>-</sup> restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 291: F833-F839.
96. **Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S., Goodenough, D. A.** (2009): Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 106: 15350-15355.
97. **Markos, F., Healy, V., Harvey, B. J.** (2005): Aldosterone rapidly activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway. *Nephron Physiol*. 99: 1-9.
98. **Oberleithner, H.** (1990): Aldosterone-regulated ion transporters in the kidney. *Klin.Wochenschr*. 68: 1087-1090.
99. **Verrey, F., Schaerer, E., Zoerkler, P., Paccolat, M. P., Geering, K., Kraehenbuhl, J. P., Rossier, B. C.** (1987): Regulation by aldosterone of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase mRNAs, protein synthesis, and sodium transport in cultured kidney cells. *J.Cell Biol*. 104: 1231-1237.
100. **Loffing, J., Summa, V., Zecevic, M., Verrey, F.** (2001): Mediators of aldosterone action in the renal tubule. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 10: 667-675.
101. **Christ, M., Meyer, C., Sippel, K., Wehling, M.** (1995): Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 213: 123-129.

102. **Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 227: 680-685.
103. **Ecri Institute - Healthcare Product Comparison System** (2004): Blood Gas/pH Analyzers.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Epitheliale Transportprozesse .....	1
<b>Abbildung 2:</b> Grundaufbau der Claudin-Familie .....	3
<b>Abbildung 3:</b> Verteilung der Claudin-Subtypen entlang des Nephrons.....	4
<b>Abbildung 4:</b> Häufige Claudin-16 Mutationen bei FHHNC .....	5
<b>Abbildung 5:</b> Aufbau eines Nephrons .....	6
<b>Abbildung 6:</b> Transportmechanismen in der TAL.....	7
<b>Abbildung 7:</b> Folgen des Claudin-16 Knockdown in der TAL .....	8
<b>Abbildung 8:</b> Transzellulärer Kalziumtransport im distalen Konvolut.....	9
<b>Abbildung 9:</b> Natriumtransport im PT .....	10
<b>Abbildung 10:</b> Natriumtransport im DCT .....	10
<b>Abbildung 11:</b> Natriumtransport im Sammelrohr .....	11
<b>Abbildung 12:</b> Schaltzellen im Sammelrohr .....	12
<b>Abbildung 13:</b> Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	14
<b>Abbildung 14:</b> Claudin-16 Knockdown Vektorkonstrukt.....	16
<b>Abbildung 15:</b> Schematische Übersichtsskizze des Tubulusperfusionsaufbaus .....	19
<b>Abbildung 16:</b> Originalexperiment einer Tubulusperfusion mit transepithelialer Spannung .	20
<b>Abbildung 17:</b> Funktionsprinzip eines metabolischen Käfigs.....	20
<b>Abbildung 18:</b> Unsortierte Nierentubuli und Beispiele isolierter Tubulussegmente .....	25
<b>Abbildung 19:</b> Arbeitsschritte zur RNA Isolierung .....	26
<b>Abbildung 20:</b> Prinzip der TaqMan Sonden.....	28
<b>Abbildung 21:</b> Beispielhafte Aufzeichnung einer quantitativen Real-Time PCR .....	29
<b>Abbildung 22:</b> Aufbau und Proteintransfer beim Western Blot .....	35
<b>Abbildung 23:</b> Quantitative Bestimmung der Proteinexpression im Western Blot.....	36
<b>Abbildung 24:</b> Äquivalenter Kurzschlussstrom im Sammelrohr.....	37
<b>Abbildung 25:</b> Trinkwasseraufnahme und Urinfluss im metabolischen Käfigversuch .....	39
<b>Abbildung 26:</b> Parameter der Blut-Gas-Analyse .....	41

<b>Abbildung 27:</b> Davenport-Diagramm .....	42
<b>Abbildung 28:</b> Urin-Gas-Analyse .....	42
<b>Abbildung 29:</b> Fraktionelle Exkretionen von Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> und Phosphat .....	47
<b>Abbildung 30:</b> Relative mRNA Menge für ENaC $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ in PT und CD .....	49
<b>Abbildung 31:</b> Relative mRNA Menge für NCC und TRPV5 in distalem Konvolut.....	51
<b>Abbildung 32:</b> Relative mRNA Menge für NHE3 in proximalem Tubulus .....	51
<b>Abbildung 33:</b> Relative mRNA Menge für AQP2 im Sammelrohr.....	52
<b>Abbildung 34:</b> Relative mRNA Menge für Claudin-3, -10, -11, -16, -19 in der TAL .....	53
<b>Abbildung 35:</b> Immunfluoreszenz von AE1 und AQP2 bzw. Pendrin und AQP2.....	54
<b>Abbildung 36:</b> Semiquantitative Auswertung der Immunfluoreszenz.....	55
<b>Abbildung 37:</b> Pendrin Fragmente im Western Blot.....	56
<b>Abbildung 38:</b> Quantitative Auswertung des Western Blots.....	56
<b>Abbildung 39:</b> Einfluss des Membranpotenzials auf die Effizienz der Protonenpumpen .....	66
<b>Abbildung 40:</b> Aldosteron-Wirkungen auf Hauptzellen im Sammelrohr .....	69
<b>Abbildung 41:</b> Prinzip der Sensoren im Blutgas Analysator.....	89

## 7.2 Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Analyseverfahren .....	22
<b>Tabelle 2:</b> Körpergewicht der Wildtyp und Knockdown Mäuse .....	38
<b>Tabelle 3:</b> Futteraufnahme und fäkale Exkretion .....	39
<b>Tabelle 4:</b> Plasma- und Urinosmolalität .....	40
<b>Tabelle 5:</b> Osmotische und Freiwasser-Clearance .....	40
<b>Tabelle 6:</b> Hämatokrit .....	41
<b>Tabelle 7:</b> Konzentration von Plasmaelektrolyten und Harnstoff.....	43
<b>Tabelle 8:</b> Kreatinin-Clearance .....	44
<b>Tabelle 9:</b> Urinausscheidung von Elektrolyten und Harnstoff.....	45
<b>Tabelle 10:</b> Phänotypische Kernmerkmale von FHHNC Patienten und KD .....	61
<b>Tabelle 11:</b> Säure-Basen-Status in FHHNC Patienten und KD .....	65

## 8 Anhang

### 8.1.1 Geräte

Blutgasvollautomat	ECOSYS II – Eschweiler, Kiel, D
Bunsenbrenner	Gasbrenner nach Teclu mit Hahn und Sparflamme (#1393/1) – Hecht-Assistent, Sondheim, D
Dispergierer	IKA Ultra-Turrax T25 – IKA, Staufen, D
Dumont Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Elektrophorese Kammer	Mini-PROTEAN II – Bio-Rad, München, D
feine Federschere	Vannas Spring Scissors, 2,5 mm Blades, gerade – Fine Science Tools, Heidelberg, D
feuchte Kammer	Assistent-Glasschale mit Edelstahldeckel (#2910/7) – Hecht-Assistent, Sondheim, D
Flammenphotometer	EFOX 5053 – Eppendorf, Hamburg, D
Gefäßklemme	Bulldog Serrefine, gerade – Fine Science Tools, Heidelberg, D
Gefrierschrank (-20°C)	Comfort NoFrost – Liebherr, Kirchdorf an der Iller, D
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus HERAfreeze – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
geschliffene Dumont Pinzette	Dumostar 5 – WPI
Glaskasten (Western Blot)	Assistent- Färbetrog (#1205) – Hecht-Assistent, Sondheim, D
Glasschneider	neoLab Schreibdiamant mit Holzgriff (#1-7624) – neoLab, Heidelberg, D
Glas-Teflon	Potter S (#853 202) – B. Braun, Melsungen, D
Isofluran-Vaporisator	Dräger-Vapor 19.n – Dräger AG, Lübeck, D
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD – Leica, Wetzlar, D
Kryostat	CM3050S – Leica, Wetzlar, D
Lumineszenz-Analysator	LAS-3000mini – Fuji Photo Film, Düsseldorf, D
Magnetrührer	RCT basic – IKA Labortechnik, Staufen, D
Messverstärker	FD223 – WPI, Sarasota, FL, USA
Metabolische Käfige	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskope	
Fluoreszenz	Axiovert 200M – Carl Zeiss, Jena, D
Tubulisortierung	MZ16 Stereomikroskop – Leica, Wetzlar, D
Operation	M8 Discussion Stereo Zoom Microscope Typ 355110 – Wild Heerbrugg (Leica, Wetzlar, D)
Tubulusperfusion	Axiovert 10 – Carl Zeiss, Jena, D
Osmometer	Micro-Osmometer, Model 210 – Fiske Associates, Norwood, MA, USA
Photometer	Tecan Genios Microplate Reader – Tecan Group, Männedorf, CH
pH-Meter	Präzisions pH-Meter – Knick, Berlin, D
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Rotationstisch	Stuart Scientific Mini Orbital Shaker SO5 – Sigma-Aldrich, München, D
Schlauchadapter	Schlauchverbinder 1/16“ - Luer Lock weiblich – Hero, Berlin, D
Schüttelgerät	REAX 2000 und REAX top – Heidolph Instruments, Schwabach, D
Spannungsquelle (SDS-PAGE / Western Blot)	Consort E835 – Consort, Turnhout, Belgium
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spritzenwärmeinkubator	Physiologie der CAU zu Kiel (Werkstatt), Kiel, D
Standfärbeküvette	Assistent-Färbezylinder (#1230) – Hecht-Assistent, Sondheim, D
Thermoblock	Thermomixer comfort – Eppendorf, Hamburg, D
Volumenmessgeräte	Schott, Grünenplan, D / Brand, Wertheim, D
Waagen	AE160 – Mettler (Mettler-Toledo, Giessen, D) AX205 DeltaRange – Mettler-Toledo, Giessen, D
Wärmeschrank	U25 – Memmert, Schwabach, D
Wasseraufbereitung	miniRO und UV-C System – ELGA Berkefeld, Celle, D
Wasserkühlung	F3 Thermostat mit Wasserbad – Thermo Haake (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Western Blot Kammer	Mini Trans-Blot Cell – Bio-Rad, München, D
Zentrallaboranalysator	Hitachi Modular – Roche Diagnostics, Mannheim, D
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 3SR und Heraeus Biofuge vito – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA EBA 21 mit Hämatokrit-Rotor (#1450) – Hettich, Tuttlingen, D

### 8.1.2 Reagenzien

$\alpha$ -Ketoglutarat	$\alpha$ -Ketoglutarsäure, p.A. – Serva, Heidelberg, D
Albumin (BSA)	Albumin aus Rinderserum, rein – Serva, Heidelberg, D
Amilorid	Sanofi-Aventis, Frankfurt, D
APS	Ammoniumperoxodisulfat – Roth, Karlsruhe, D
BGA Qualitätskontrolle	Liquichek Blood Gas Control Level 2 – Bio-Rad, München, D
BGA Kalibrierlösung 1	BGA 1 (#4061020) – Eschweiler, Kiel, D
BGA Kalibrierlösung 2	BGA 2 (#4061030) – Eschweiler, Kiel, D
BGA Spüllösung	WASH 1 (#4061000) – Eschweiler, Kiel, D
Calciumgluconat-1-hydrat	D-Gluconsäure Kalziumsalz (#7502.1) – Roth, Karlsruhe, D
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid – Roche Diagnostics, Mannheim, D
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	p.a. – Merck, Darmstadt, D
DNase I	Roche, Mannheim, D
Eindeckmedium	Molecular Probes SlowFade Gold – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethanol	≥ 99,9 %, p.a. – Merck, Darmstadt, D

Kryoschnitt Gewebeeinbettmedium	Tissue Freezing Medium, Jung (#020106926) – Leica, Wetzlar, D
Glycin	≥ 99 %, p.a. – Roth, Karlsruhe, D
Größenstandard (Western Blot)	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811) – Fermantas, St. Leon-Rot, D
Heparin	Liquemin N25000, Natriumsalz – Roche, Mannheim, D
Isofluran	Forene – Abbott, Wiesbaden, D
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a. – Merck, Darmstadt, D
Ketamin	Ketaminhydrochlorid 500mg (50mg/ml) – Curamed Pharma, Karlsruhe, D
Kollagenase Typ II	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	p.a. (#105886) – Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol zur Synthese (#805740) – Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
Natriumacetat-Trihydrat	p.a. – Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	p.a. – Merck, Darmstadt, D
Natronlauge	Natronlauge 1 mol/l – Merck, Darmstadt, D
PBS	Dulbecco's PBS (10x) without Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup> (#H15-011) – PAA Laboratories, Pasching, A
Protease Typ XIV	P5147 – Sigma-Aldrich, München, D
Paraffinöl	Paraffinöl dickflüssig Ph. Eur. 1000 ml – Walter CMP, Kiel, D
Paraformaldehyd (PFA)	reinst, DAC – Roth, Karlsruhe, D
Protease Inhibitor Tabletten	complete, Mini, EDTA-free (#04693124001) – Roche, Mannheim, D
Rompun (Xylazine)	Rompun – Bayer, Leverkusen, D
Salzsäure	Salzsäure 1 mol/l – Merck, Darmstadt, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SDS ultra pure, ≥ 99 % – Roth, Karlsruhe, D
Stickstoff (flüssig)	Air Liquide, Düsseldorf, D
TaqMan Hauptreagenz	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (#4324018) – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan Sonden (Gene Expression Assays)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
AQP2 (Mm00437575_m1)	
CNGA3 (Mm00802288_m1)	
ENaCα/Scnn1a (Mm00803386_m1)	
ENaCβ/Scnn1b (Mm00441219_m1)	
ENaCγ/Scnn1g (Mm01163272_m1)	
GAPDH (Mm99999915_g1)	
HPRT1 (Mm00446968_m1)	
NCC/Slc12a3 (Mm01249625_m1)	
NHE3/Slc9a3 (Mm01352473_m1)	
TRPV5 (Mm01166036_m1)	
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Merck, Darmstadt, D
Trypsin-Inhibitor	Trypsin Inhibitor from soybean – Fluka (Sigma- Aldrich, München, D)

### 8.1.3 Kits

BCA-Kit	BCA Protein Assay Kit (#23227) – Thermo Fisher Scientific (Pierce Protein Research Products), Rockford, IL, USA
cDNA	QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205311) – Qiagen, Hilden, D
Lumineszenz-Medium	ECL Advanced Western Blotting Detection Kit (#RPN2135) – GE Healthcare (Amersham), Braunschweig, D
RNase-freie DNase	RNase-Free DNase Set (#1023460) – Qiagen, Hilden, D
RNA-Isolation	RNeasy Micro Kit (#74004) und RNeasy Mini Kit (#74104) – Qiagen, Hilden, D

### 8.1.4 Antikörper

#### Primärantikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Ursprung	Verdünnung (Immunhistochemie)	Verdünnung (Western Blot)
$\alpha$ -AQP2 (#AQP-002)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	Kaninchen	1:1.000	1:5.000
$\alpha$ -AE1	Carsten Wagner, Physiologie, Zürich, CH	Meerschweinchen	1:500	1:3.000
$\alpha$ -Pendrin		Meerschweinchen	1:500	1:3.000
$\alpha$ -V-H <sup>+</sup> -ATPase (H7659AP; polyclonal)	Jeppe Praetorius, Aarhus, DK	Kaninchen	-	1:2.000
$\alpha$ -alpha-Aktin (A2006)	Sigma-Aldrich, München, D	Kaninchen	-	1:5.000

#### Sekundärantikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Ursprung	Verdünnung (Immunhistochemie)	Verdünnung (Western Blot)
Alexa Fluor 488 goat anti-guinea pig (#A11073)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Ziege	1:400	-
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (#A11037)		Ziege	1:400	-
donkey anti-rabbit (#sc-2313)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Esel	-	1:10.000
donkey anti-guinea pig (#706-035-148)	Dianova, Hamburg, D	Esel	-	1:10.000

## 8.1.5 Lösungen

<b>Dissektionslösung (98b)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mmol/l]</b>
NaCl	140
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1,6
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0
Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O	10
α-Ketoglutarat	1,0
Caliumgluconat x 1 H <sub>2</sub> O	1,3
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / HCl	

<b>Kontrolllösung (Tubulusperfusion)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mmol/l]</b>
NaCl	120
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1,6
Glukose	5
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1
Natriumgluconat	25
Caliumgluconat x 1 H <sub>2</sub> O	3
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / HCl	

<b>Inkubationslösung (Tubulussortierung)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/100 ml]</b>
Glycin	37,5
Trypsin-Inhibitor	4,8
DNase I	2,5
in Dissektionslösung	
Aufreinigung mit Hilfe eines Sterilfilters	

<b>Sortierlösung (Tubulussortierung)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Albumin (BSA)	0,5
in Inkubationslösung	
Aufreinigung mit Hilfe eines Sterilfilters	

<b>Enzymlösung (Tubulussortierung)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Kollagenase Typ II	1
Protease Typ XIV	1
in Inkubationslösung	

<b>Lyse-Puffer (Homogenisierung)</b>	
0,5% v/v Triton X-100	
1 Protease Inhibitor Tablette je 10 ml (siehe 8.1.2)	
in PBS	

<b>4x Probenauftragspuffer (nach Lämmli [102])</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mmol/l]</b>
Tris/HCl	250
8% w/v SDS	
0,004% w/v Bromphenolblau	
40% v/v Glycerol	
20% v/v $\beta$ -Mercaptoethanol	
in H <sub>2</sub> O	
mindestens 30 Minuten durchmischen und dabei 10 Minuten auf 55°C erwärmen	

<b>4x Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Tris/HCl	60,57
0,4% w/v SDS	
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 6,8 mittels NaOH / HCl	

<b>4% Sammelgel (SDS-PAGE)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [ml]</b>
40% Acrylamid	1,00
4x Sammelgel-Puffer	2,50
H <sub>2</sub> O	6,40
30 $\mu$ l TEMED	
75 $\mu$ l 10% APS	

<b>4x Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Tris/HCl	181,71
0,4% w/v SDS	
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 8,8 mittels NaOH / HCl	

<b>Trenngel (SDS-PAGE)</b>		
<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [ml]</b>	
	<b>12,5 %</b>	<b>8%</b>
40% Acrylamid	6,25	4,00
4x Trenngel-Puffer	5,00	5,00
H <sub>2</sub> O	8,54	10,79
60 µl TEMED		
150 µl 10% APS		

<b>10x Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Glycin	144,13
Tris	30,29
1% w/v SDS	
in H <sub>2</sub> O	

<b>Transferpuffer („Tank-Blot-Puffer“)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Glycin	14,40
Tris	2,42
20% v/v Methanol	
in H <sub>2</sub> O	
pH 8,3 (nicht einstellen)	

<b>TBS-T (Western Blot)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Tris/HCl	12,114
NaCl	8,766
0,05% v/v Tween/Polysorbat 20	
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 7,6 mittels NaOH / HCl	

<b>Stripping-Puffer (Western Blot)</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
Tris/HCl	7,50
2% w/v SDS	
100 mmol/l β-Mercaptoethanol	
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf pH 6,7 mittels NaOH / HCl	

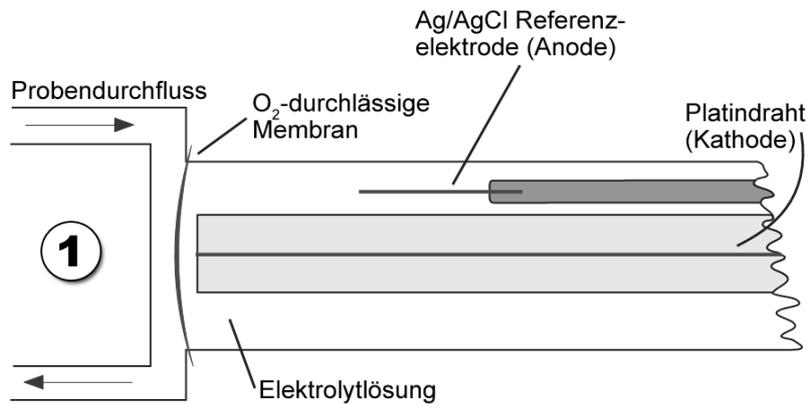
### 8.1.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Standard-Deckgläser 24x50 mm – Knittel Gläser, Braunschweig, D
Futtermittel	ssniff R/M-H – ssniff Spezialdiäten, Soest, D
Hämatokrit-Kapillaren	Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Natriumheparin (#749321) – Brand, Wertheim, D
Kanülen	HSW FINE-JECT – Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen, D / Erosa – Aurelia medical, Achern, D
Kapillaren für die BGA	CLINITUBES Heparinized glass capillary tubes (#D941-8-140) – Radiometer, Kopenhagen, DK
Kulturschale	Gewebekulturschalen im SureGrip Design 35x10mm (#83.1800) – Sarstedt, Nümbrecht, D
Latexhandschuhe (nicht-steril)	Manufix sensitive – B. Braun, Melsungen, D
Mikropipettenspitzen, steril	ep Dualfilter T.I.P.S. – Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipettenspitzen, unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatte	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (#4306737) – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Mikrotiterplattenverschlussfolie	MicroAmp Optical Adhesive Film (#4360954) – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Objektträger	Polylysin Objektträger (25x75x1,0 mm; #041400) – Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträgerbox	Typ eco 50 – A. Hartenstein, Würzburg, D
Pasteurpipette	Assistent-Pasteurpipetten, lange Form, 230 mm (#567/2) – Hecht-Assistent, Sondheim, D
PE-Schlauch (1,0 mm)	PE-Mikroschlauch (#1-7253) – neoLab, Heidelberg, D
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpellklinge	Nr. 24 (gerade) – Bayha, Tuttlingen, D
Spritze (1,0 ml)	HSW NORM-JECT Tuberkulin – Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen, D / Insulin Syringe – Terumo, Eschborn, D
Sterilfilter	Filtropur S 0,2 zur Sterilfiltration (#83.1826.001) – Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D

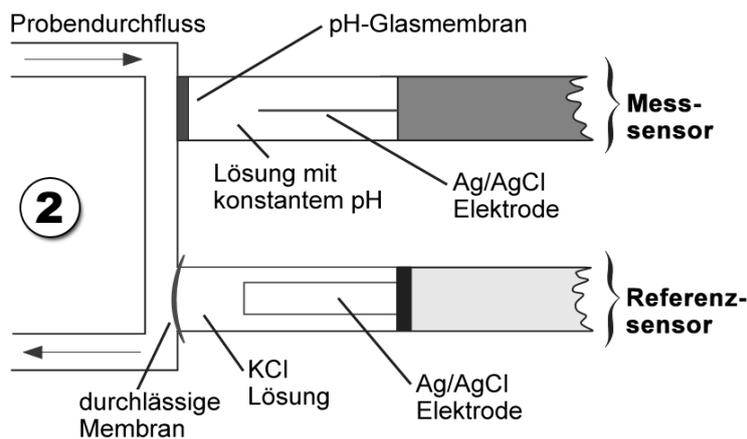
### 8.1.7 Software

Fluoreszenzimmunhistochemie	AxioVision 4.6 – Carl Zeiss, Jena, D ImageJ – Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA
Real-Time PCR	Sequence Detection System Software – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tabellenkalkulation	Excel 2003 – Microsoft, Redmond, WA, USA OriginPro 7.5G – OriginLab, Northampton, MA, USA

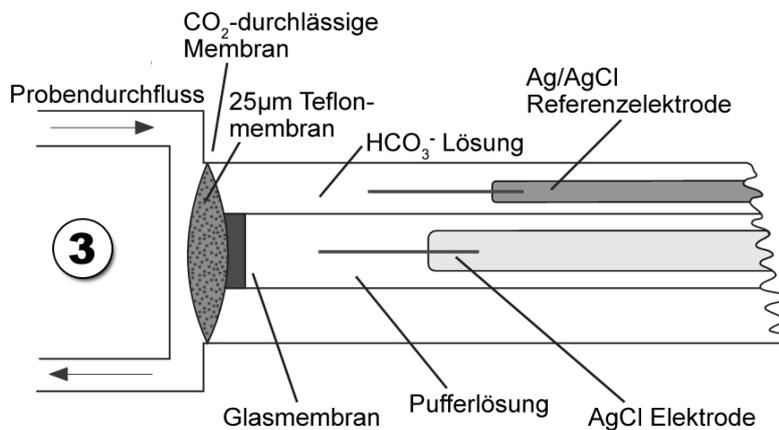
### 8.1.8 Funktionsprinzip des Blut-Gas-Analysators



**Abbildung 41:** Prinzip der Sensoren im Blutgas Analysator Bei der Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes  $pO_2$  (1) wird eine typische Strom-Spannungscharakteristik genutzt. Die in der Probe gelösten Sauerstoffmoleküle diffundieren durch die Membran und werden am Platindraht elektrochemisch reduziert. Dabei steht der Platindraht unter konstanter Polarisationsspannung von  $-700$  mV. Durch die von der Kathode gelieferten Elektronen entsteht ein Strom zur Anode. Dieser ist proportional zur Menge der diffundierenden Sauerstoffmoleküle.



Bei der pH-Messung (2) entsteht an der pH-empfindlichen Glasmembran des Messensors eine Spannung, wenn diese Membran zwei Lösungen mit verschiedenen pH-Werten trennt. Der Referenzsensor liefert eine pH-unabhängige, konstante Spannung. Aus Mess- und Referenzspannung ergibt sich eine Potenzialdifferenz. Diese ist proportional zur pH-Differenz der Lösung mit konstantem pH und der Probe.



Der Kohlenstoffdioxid-Partialdruck wird nach dem Prinzip der indirekten pH-Messung bestimmt (3). Hierbei wird zunächst der pH-Wert einer HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Lösung gemessen. Diese ist durch eine CO<sub>2</sub>-durchlässige Teflonmembran von der Probe getrennt. Bis zu einem Gleichgewichtszustand diffundiert CO<sub>2</sub> durch die Membran in die Hydrogencarbonat-Lösung. Die daraus resultierende pH-Wert Änderung ist direkt proportional zum diffundierten CO<sub>2</sub> und wird als Spannungsdifferenz über der Glasmembran gemessen.

(Eschweiler ECOSYS II Handbuch & Abbildungen modifiziert nach [103])

## Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Markus Bleich, Dr. Nina Himmerkus und Dr. Qixian Shan. Ich danke Euch für die einzigartige Betreuung und Anleitung, die umfassende Unterstützung in allen Punkten, die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und die vielen offenen Gespräche und anregenden Diskussionen. Ich bin sehr froh, dass ich meine Doktorarbeit in Eurem Labor durchgeführt habe. Durch die eingeräumten Freiräume und das damit entgegengebrachte Vertrauen hatte ich die Möglichkeit mir zusätzliche Fertigkeiten anzueignen und Verantwortung zu übernehmen. Nicht zuletzt danke ich für den gut ausgestatteten Arbeitsplatz in sehr angenehmer Atmosphäre und die großzügige, finanzielle Unterstützung zur Beschaffung benötigter Reagenzien und Materialien.

Ebenbürtig danke ich meinen Eltern für das uneingeschränkte Vertrauen und die stete Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meiner Freundin Friederike Zunke gilt mein tiefster und herzlichster Dank für die schönen Stunden fernab jeglicher Laborluft, die richtigen Worte in jeder Situation und Ihre Hilfestellung bei kleinen und großen Problemen.

Meine Dankbarkeit gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der CAU zu Kiel. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. H. Wiese, Herrn Prof. Dr. M. Illert, Herrn Prof. Dr. J. Kuhtz-Buschbeck, Herrn Dr. T. Huth, Herrn Prof. Dr. C. Alzheimer, Herrn PD Dr. Gronow, Herrn T. Stegmann, Frau K. Kronbitter, Herrn D. Schnell, Herrn M. Müller, Frau G. Ach, Herrn G. Ohm, Herrn M. Emde und Herrn C. Richter. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. P. Steels, Herrn Prof. Dr. J. Leipziger, Frau Prof. Dr. R. Lüllmann-Rauch, Herrn Prof. Dr. Saftig, Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger, Herrn Prof. Dr. C. Wagner und Herrn PD Dr. M. Konrad für Ihre wissenschaftliche Unterstützung und Ihren kompetenten Rat.

Birte, Veit, Verena, Sophia, Wiebke, Kerstin, Magda und Sandra danke ich für die nette, gemeinsame Zeit in der AG Bleich.

Last but not least danke ich meinen Kommilitonen Max, Martin, Dirk und Steffen für die vielen gemeinsamen Stunden in Kiel und die ein oder andere Tasse Kaffee zwischen meinen Experimenten.

## Curriculum vitae

### Bören Görke

---

Anschrift	Schlieffenallee 6 24105 Kiel Deutschland
Geburtsdatum/-ort	07. 02. 1984 in Neumünster
Familienstand	Ledig
Konfession	Evangelisch

### Schullaufbahn

---

1990-2003	Grundschule und Gymnasium in Neumünster Abiturnote: 2,1
09/2000 – 07/2001	Traverse City West Senior High School, Michigan, USA

### Zivildienst

---

07/2003 – 04/2004	Gastroenterologie des Friedrich-Ebert-Krankenhauses Neumünster
-------------------	---

### Studium

---

10/2004 – 05/2011	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel 08/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0 05/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
-------------------	---

### Famulaturen

---

Innere Medizin:	Universitätsklinikum Kiel, Privatstation (2007) Universitätsklinikum Kiel, Kardiologie (2007) Städtisches Krankenhaus Kiel, Aufnahmestation (2008)
Neurochirurgie:	Diakonissenkrankenhaus Flensburg (2009)
Anästhesie:	Charité Universitätsklinik Berlin - Campus Benjamin Franklin (2009)

### Praktisches Jahr

---

Anästhesie:	Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, (2010)
Chirurgie:	UniversitätsSpital Zürich, Departement Chirurgie (2010)
Innere Medizin:	Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster, Medizinische Klinik (2010/2011)

### Berufstätigkeit

---

08/2011 – 01/2012	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl)
seit 02/2012	UK-SH, Campus Kiel, Klinik für Innere Medizin IV (Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf)

---

**Wissenschaftliche Laufbahn**

---

2004-2009	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel; Promotionsarbeit von Oktober 2007 bis Oktober 2009
03/2007	Teilnahme am „86th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft“, Hannover
05/2007	Teilnahme am „XII. Treffen der Ostseephysiologen“, Salza
03/2008	Vortrag beim „Annual Meeting of the German Physiological Society“, Köln
04/2008	Vortrag beim „XIII. Treffen der Ostseephysiologen“, Rostock
05/2008	Postervortrag beim „40th Meeting on Membrane Transport“, Sandbjerg, Dänemark
09/2008	Vortrag beim „39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie“, Tübingen
05/2009	Teilnahme am „XIV. Treffen der Ostseephysiologen“, Greifswald

---

**Stipendien**

---

2007	Stipendium der Deutschen Physiologischen Gesellschaft zur Kongressteilnahme in Hannover
2008	Stipendium der Deutschen Physiologischen Gesellschaft zur Kongressteilnahme in Köln
2010	Stipendium zur Förderung der Ableistung des Praktischen Jahres im Ausland

## Publikationsliste

### Vorträge und Poster

---

Goerke B, Himmerkus N, Hou J, Shan Q, Goodenough DA, Bleich M:  
Pathophysiology of renal ion transport in mice lacking paracellular cation selectivity in TAL;  
MTP Meeting - Regulation of Transcellular Transport, Roskilde, Dänemark (2008); Vortrag

**Goerke B**, Himmerkus N, Hou J, Shan Q, Goodenough DA, Bleich M:  
Metabolic implications of claudin-16 knockdown;  
87th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln (2008);  
Vortrag OM2-1-7

Shan Q, Himmerkus N, Hou J, B. Goerke, Goodenough DA, Bleich M:  
Renal Na<sup>+</sup> handling in claudin-16 knockdown mice;  
87th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln (2008); Poster

**Goerke B**, Himmerkus N, Hou J, Shan Q, Goodenough DA, Bleich M:  
Metabolische Konsequenzen des Claudin-16 Knockdowns;  
XIII. Treffen der Ostseephysiologen, Rostock (2008); Vortrag

**Goerke B**, Himmerkus N, Hou J, Shan Q, Goodenough DA, Bleich M:  
Paracellular permeability and acid-base metabolism;  
40th Sandbjerg Meeting on Membrane Transport, Sandbjerg, Dänemark (2008); Poster

**Goerke B**, Himmerkus N, Shan Q, Hou J, Goodenough DA, Bleich M:  
Paracellular permeability in thick ascending limb and acid-base metabolism;  
Kongress für Nephrologie, Tübingen (2008); Vortrag FV 05

Himmerkus N, Vassen V, Sievers B, Goerke B, Shan Q, Harder J, Schröder J-M, Bleich M:  
The antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin 2 enhances cholinergic signaling in colonic cells;  
Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Kopenhagen,  
Dänemark (2010); Poster P-Sun-55

### Publikationen

---

Himmerkus N, Shan Q, **Goerke B**, Hou J, Goodenough DA, Bleich M (2008):  
Salt and acid-base metabolism in claudin-16 knockdown mice: impact for the  
pathophysiology of FHHNC patients. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 295(6):F1641-7

Himmerkus N, Vassen V, Sievers B, **Goerke B**, Shan Q, Harder J, Schröder JM, Bleich M  
(2010): Human beta-defensin-2 increases cholinergic response in colon epithelium. *Pflugers  
Arch.* 2010 Jun;460(1):177-86. Epub 2010 Mar 6