

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. M. Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**INTESTINALE
KOMPENSATIONSMECHANISMEN IN MÄUSEN
MIT EINEM AQP₂-PROMOTOR-ABHÄNGIGEN
KNOCKOUT
DES MINERALOKORTIKOIDREZEPTORS**

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von

VERENA TRZECIAK

aus Linnich

Kiel 2013

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Bleich

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Wedel

Tag der mündlichen Prüfung:

05. 03. 2014

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den 05. 03. 2014

gez. Prof. Dr. T. Baukrowitz

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1 EINLEITUNG	6
1.1 Salz- und Wasserhaushalt des Körpers.....	6
1.2 Grundlagen der Physiologie einer Epithelzelle.....	7
1.2.1 Transportprozesse in Dünndarm und Kolon.....	7
1.2.1.1 Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC)	9
1.2.1.2 Glukoseresorption.....	9
1.2.1.3 TRPM 4	10
1.2.1.4 Der Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher.....	10
1.2.1.5 Der Na ⁺ /Fettsäuren-Cotransporter (slc5a8)	10
1.2.1.6 KCNQ1/E3	11
1.2.1.7 Wasserresorption	11
1.2.2 Transportprozesse in der Niere.....	11
1.2.2.1 Proximaler Tubulus (Abb. 2b).....	12
1.2.2.2 Henle Schleife (Abb. 2c)	12
1.2.2.3 Distales Konvolut (Abb. 2d).....	12
1.2.2.4 Verbindungstubulus und Sammelrohr (Abb. 2e)	12
1.2.2.5 Harnkonzentrierung	12
1.3 Hormone des Salz- und Wasserhaushaltes	13
1.3.1 Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor	13
1.3.2 Adiuretin (ADH, Vasopressin).....	15
1.3.3 Weitere Hormone des RAAS: Renin und Angiotensin	15
1.3.4 Antagonisten des RAAS.....	16
1.4 Das Mausmodell	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	19
2.2 Puffer und Lösungen.....	19
2.2.1 Mausgenotypisierung	19
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus der Mausschwanzspitze	19
2.2.1.2 PCR	19
2.2.1.3 Gelelektrophorese	20
2.2.1.4 Real Time PCR.....	20
2.2.2 Experimentallösungen	20
2.2.3 Experimentalfutter.....	21
2.3 Genotypisierung	21
2.3.1 DNA-Isolierung.....	21
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion	21
2.3.3 Gelelektrophorese.....	22
2.4 Der metabolische Käfig.....	22
2.4.1 Versuchsdurchführung	23
2.4.2 Erfassen der Stoffwechselfparameter	23
2.4.3 Uringewinnung, Blut- und Organentnahme	24
2.4.4 Probenanalyse und Aufarbeitung	24
2.4.4.1 Blutgasanalyse	24
2.4.4.2 Bestimmung des Hämatokrits.....	24
2.4.4.3 Messung der Plasma- und Urinparameter.....	25
2.4.4.4 Bestimmung der Aldosteronwerte im Plasma.....	25
2.4.4.5 Bestimmung der Osmolalitäten	25
2.4.4.6 Berechnung von C _{crea} , C _{osmo} und C _{H₂O} (Clearance).....	25
2.4.4.7 Berechnung der fraktionellen Ausscheidung (FE).....	26

2.4.4.8 Analyse der Kotproben	26
2.5 Ussing Kammer Versuche	27
2.5.1 Konstruktion der Kammer	27
2.5.2 Grundlage der Messtechnik	28
2.5.3 Vorbereitung und Präparation von distalem Kolon und Coecum	30
2.5.4 Versuchsdurchführung	30
2.6 RNA-Isolierung und Real Time PCR	31
2.6.1 RNA-Isolierung	31
2.6.2 cDNA-Synthese	31
2.6.3 Real Time PCR	32
2.7 Immunfluoreszenz	32
2.7.1 Organfixierung und Anfertigen der Schnittpräparate	33
2.7.2 Färbung	33
2.8 Statistik	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 In vivo Versuche	35
3.1.1 Nahrungsaufnahme und Ausscheidung	35
.....	36
3.1.2 Kreatinin-Clearance	36
3.1.3 Tubuläre Nierenparameter	37
3.1.3.1 Wasserbilanz	37
3.1.3.2 Plasma- und Urinosmolalität	39
3.1.3.3 Na ⁺ /Cl ⁻ Homöostase	39
3.1.3.4 K ⁺ -Homöostase	41
3.1.3.5 Säure/Basen-Haushalt	42
3.1.4 Gastrointestinale Stoffwechselfparameter	43
3.1.4.1 Wasser-Homöostase	43
3.1.4.2 Intestinale Homöostase der Elektrolyte Na ⁺ und K ⁺	44
3.1.5 Bilanz der Elektrolyte Na ⁺ und K ⁺	45
3.2 In vitro Versuche	47
3.2.1 Inhibitionsversuche mit Amilorid	47
3.2.2 Inhibition der neuromuskulären Aktivität mit TTX	50
3.2.3 Inhibition von NCX	51
3.2.4 Induktion des Na ⁺ -gekoppelten Fettsäuretransports	51
3.2.5 Inhibition von TRPM4	52
.....	52
3.2.6 Inhibition des Na ⁺ -abhängigen Glukosetransports	54
3.2.7 Inhibition von KCNQ1/E3	55
3.2.8 Plasma- und Urinparameter	56
3.2.8.1 Na ⁺ /Cl ⁻ -Homöostase	56
3.2.8.2 K ⁺ -Homöostase	57
3.2.8.3 Säure-/Basen-Haushalt	57
3.2.8.4 Die transgenen Mäuse als „Hoch-Aldosteron-Modell“	57
3.3 Expressionsanalyse	58
3.3.1 Daten aus den Real Time PCR Versuchen	58
3.3.2 Immunhistochemie	59
3.3.2.1 ENaC- γ wurde in beiden Genotypen nachgewiesen	59
3.3.2.2 TRPM4 war im Coecum beider Genotypen exprimiert	59
4 DISKUSSION	61
4.1 Methodik	61

4.1.1 <i>In vivo</i> Versuche im metabolischen Käfig.....	61
4.1.2 <i>In vitro</i> Versuche mit der Ussing Kammer.....	62
4.1.2.1 Präparation von Kolongewebe.....	62
4.1.2.2 Messtechnik.....	62
4.1.3 Diätfutter	63
4.1.4 Expressionsanalyse.....	63
4.2 Auswirkungen des MR-Knockouts.....	63
4.2.1 Metabolische Befunde und renale Kompensation	64
4.2.1.1 WT.....	64
4.2.1.2 TG.....	65
.....	67
4.3 Intestinale Kompensationsmechanismen	68
4.3.1 Erhöhte Na ⁺ -Resorption in den TG	68
4.3.1.1 ENaC-Aktivierung im distalen Kolon und Rekrutierung ins Coecum.....	68
4.3.1.2 Existenz eines ENaC-unabhängigen Stroms in den TG.....	69
4.3.1.3 Keine Beteiligung von NCX und slc5a8.....	69
4.3.1.4 TRPM4 vermittelt einen Teil des Reststroms	70
4.3.1.5 SGLT1 ist an der Ausbildung des lumennegativen Potenzials beteiligt	70
4.3.1.6 KCNQ1/E3 als basolaterale Triebkraft.....	71
4.3.1.7 Der luminale Reststrom als eine „Gemeinschaftsleistung“	72
4.3.2 Erhöhte Wasserresorption in den TG unter oraler Na ⁺ -Depletion.....	73
5 ZUSAMMENFASSUNG	74
6 LITERATURVERZEICHNIS	75
7 ANHANG	85
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	85
7.2 Danksagung	87
7.3 Lebenslauf.....	88
7.4 Veröffentlichungen.....	90
7.5 Erklärung.....	91

1 Einleitung

1.1 Salz- und Wasserhaushalt des Körpers

Salz- und Wasseraufnahme (durch orale Nahrungszufuhr und durch Bildung von Oxidationswasser) und ihre Ausscheidung (über die Nieren, den Darm, das Schwitzen und die Perspiratio insensibilis) stehen in einem engen Gleichgewicht, das im gesunden Körper streng reguliert werden muss. Der Extrazellularraum, der das interstitielle Volumen und das Plasmavolumen beinhaltet, ist im Gegensatz zum Intrazellularraum reich an Natrium und Chlorid. Die extrazelluläre Osmolalität (normal ca. 290mosm/kg H₂O) und der Volumenhaushalt sind die entscheidenden Regulationsparameter. Eine Vielzahl von Sensoren im Körper (z.B. Dehnungsrezeptoren im rechten Vorhof oder osmosensible Neurone im Hypothalamus) erfassen diese Parameter und durch verschiedene Hormone, wie z.B. ADH für die Wasserhomöostase und Aldosteron für den Natriumhaushalt, werden sie reguliert. Neben der Niere als primäres Zielorgan trägt auch der Darm durch Absorptions- und Sekretionsprozesse einen wichtigen Anteil zur Regulation von Wasser- und Elektrolythaushalt [24] bei.

Abgesehen von passiven Verschiebungen durch osmotisch oder onkotisch wirksame Kräfte stehen den Zellen zur Feinregulation verschiedene Elektrolyttransporter und -kanäle zur Verfügung. Der aktive Transport der Na⁺/K⁺-ATPase (2K⁺ in die Zelle, 3Na⁺ aus der Zelle) sorgt dabei für die Aufrechterhaltung der differentiellen ionalen Zusammensetzung des Extra- und Intrazellularraums. So werden zum einen zu große Schwankungen von Membranpotenzial und Volumen verhindert und zum anderen die Triebkräfte für sekundäre Transportvorgänge bereitgestellt [59].

Die normale Natriumkonzentration im Plasma bzw. im Interstitium variiert zwischen 135 und 145mmol/l und beträgt im Intrazellularraum ca. 15mmol/l. Sowohl das Intra- als auch das Extrazellulärvolumen sind von der Natriumkonzentration abhängig, da Wasser dem starken Osmolyt gemäß den Gesetzen der Diffusion passiv folgt. Der Natriummetabolismus wird maßgeblich durch die Nieren reguliert, die durch Rückresorption und angepasste Diurese die Konzentration stabil halten.

Die Kaliumkonzentration beträgt im Plasma bzw. im Interstitium ca. 4mmol/l, während sie im Inneren der Zelle einen Wert von etwa 140mmol/l aufweist. Dieser Konzentrationsunterschied stellt die wesentliche Stellgröße für das Ruhemembranpotenzial einer Zelle dar. Eine strenge Einstellung der Homöostase ist also essenziell für den Organismus. Die Regulation erfolgt auch hier hauptsächlich über die Nieren. Das Hormon Aldosteron führt zu einer vermehrten

Ausscheidung von Kalium. Auf zellulärer Ebene wird eine Regulation des K^+ -Haushaltes durch konzentrationsabhängige Aufnahme und Abgabe erreicht, z.B. führen sympathomimetische Stoffe und Insulin über eine Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes [52].

1.2 Grundlagen der Physiologie einer Epithelzelle

Epithelien funktionieren als Grenzflächen an inneren und äußeren Körperoberflächen und sind entsprechend ihrer Aufgaben unterschiedlich spezialisiert. So dient z.B. das mehrschichtige verhornte Plattenepithel der Haut vornehmlich dem Schutz vor mechanischen Belastungen, während Dünndarmepithelzellen vor allem die Aufgabe haben, Nahrungsbestandteile zu resorbieren. Drüsenzellen (z.B. Becherzellen oder Schweißdrüsen) wiederum produzieren Sekrete, die exokrin abgegeben werden können.

Im Aufbau sind sich die verschiedenen Epithelzellen ähnlich. So handelt es sich um Zellen mit einer luminalen und einer basolateralen Membran, die eine asymmetrische Verteilung der verschiedenen Ionenkanäle und Carrier aufweisen, wodurch eine Polarität entsteht. Die Zell-Zell-Verbindungen bestehen je nach Vorkommen aus mehr oder weniger dichten Haftkomplexen (engl.: *tight junction*). Dieser Aufbau ermöglicht die transepitheliale Transportfunktion, die entweder auf transzellulärem Wege, also mit Hilfe von Transportern durch die Zelle, oder, abhängig von der Dichte der *tight junction*, parazellulär durch Diffusion zwischen den Zellen hindurch erfolgt [52].

Die Ussing Kammer Methode ist ein gutes Instrument, um elektrogene Ströme und Potenziale über Epithelien zu messen [63]. Durch gezielte pharmakologische Beeinflussung von elektrogenen Kanälen, Pumpen oder auch der transzellulären Permeabilität, kann man anhand eines äquivalenten Kurzschlussstromes bzw. eines Diffusionspotenziales auf die veränderten Transportraten schließen und diese zwischen z.B. Transgenen und Wildtypen vergleichen.

1.2.1 Transportprozesse in Dünndarm und Kolon

Ganz allgemein bestehen die Aufgaben des Gastrointestinaltraktes im Transport der aufgenommenen Nahrung, der Zerlegung in ihre Grundstoffe (Verdauung) und der anschließenden Absorption. Nicht verwertbare Anteile des Speisebreis werden ausgeschieden. Während der Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) vornehmlich für die Resorption von Elektrolyten, Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Vitaminen und Wasser zuständig ist und ein eher leckes Epithel aufweist, nimmt die Abdichtung des Gewebes und damit das transepitheliale Potenzial nach aboral hin zu. Durch Sekretions- und Resorptionsprozesse

findet schließlich im Kolonepithel die Feinabstimmung der gastrointestinalen Wasser- und Elektrolythomöostase sowie der Stuhlkonsistenz statt.

Die Sekretion im Kolon erfolgt hauptsächlich an der Basis der Lieberkühn-Krypten. Über den intrazellulären Botenstoff cAMP kommt es zu einer Aktivierung des luminalen Cl^- -Kanals CFTR (engl.: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und des basolateralen K^+ -Kanals KCNQ1/E3. Durch den elektrochemischen Na^+ -Gradienten kommt es über einen sekundär aktiven Cotransporter (NKCC1) zum basolateralen Einstrom von Na^+ , K^+ und Cl^- . Dieser schafft zusammen mit den basolateralen K^+ -Kanälen (KCNQ1/E3 und KCNN4) wiederum die Triebkraft für die luminalen Cl^- -Sekretion [27]. Na^+ und Wasser folgen parazellulär (s. Abb. 1c).

Die Absorption von Wasser und Elektrolyten erfolgt maßgeblich an der Oberfläche der Lieberkühn-Krypten (Abb. 1a), [69], so dass diese Mechanismen im Folgenden am Beispiel einer oberflächlichen Zelle beschrieben werden (Abb. 1b). Zu bemerken ist jedoch, dass Sekretions- und Absorptionsprozesse potenziell sowohl von Zellen der Kryptenbasis als auch von Oberflächenzellen übernommen werden können [31]. Die Triebkraft für diese Prozesse wird durch den transzellulären Na^+ -Gradienten, der durch die Na^+/K^+ -ATPase geschaffen wird, gewährleistet. Hierbei sorgt die hohe Differenz von extra- zu intrazellulärer Na^+ -Konzentration für den chemischen Na^+ -Gradienten in die Zelle. Eine K^+ -Rezirkulation, die durch basolaterale K^+ -Kanäle (KCNQ1/E3) ermöglicht wird, schafft eine elektrogene Triebkraft, da die Membran so hyperpolarisiert wird. Durch die Kopplung an Na^+ kann dieser elektrochemische Gradient auch zur Absorption anderer Substanzen, wie z.B. Glukose genutzt werden. Prinzipiell kann man die Absorptionsvorgänge in elektroneutrale (z.B. durch den luminalen Na^+/H^+ -Austauscher [20]) und elektrogene Prozesse unterteilen.

Da man durch die Methode der Ussing Kammer Ersteres nicht messen kann, werden im Folgenden nur elektrogene Na^+ (-gekoppelte)-Aufnahmemechanismen näher erläutert. In Abb. 1 ist ein hypothetisches Zellmodell dargestellt. Es beinhaltet alle von uns untersuchten Kanäle und Transporter.

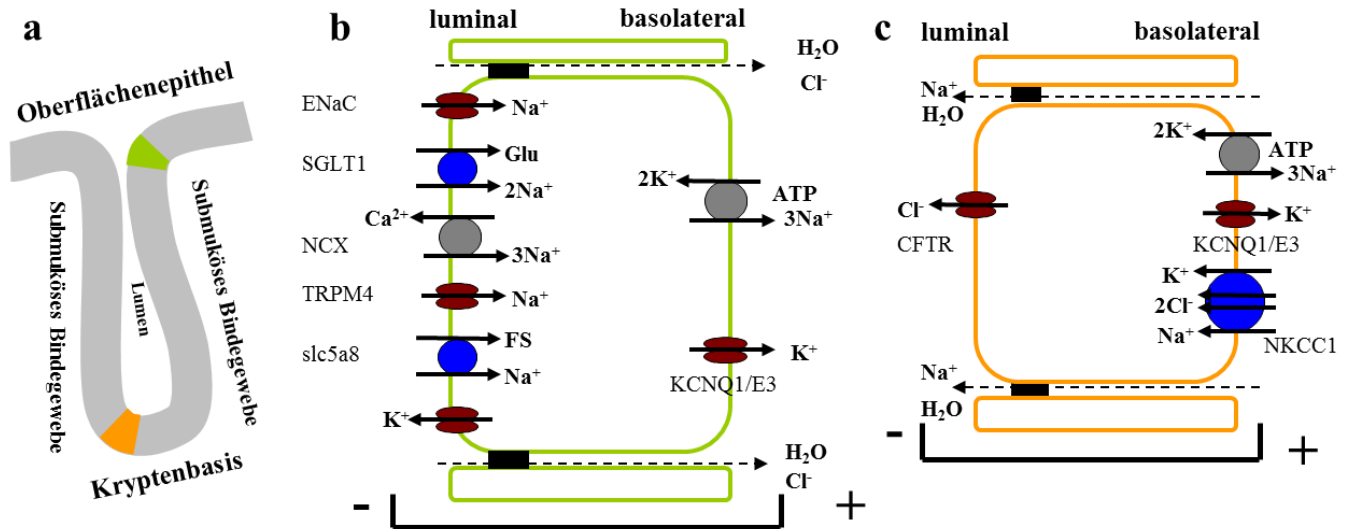


Abb. 1a: Schematische Darstellung einer Krypte.

Abb. 1b: Vereinfachtes Zellschema einer Oberflächenepithelzelle mit den potenziellen Na⁺-Absorptionsmechanismen, die in den Versuchen untersucht wurden.

Abb. 1c: Vereinfachtes Schema einer Epithelzelle der Kryptenbasis mit den wichtigsten Sekretionsmechanismen.

1.2.1.1 Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC)

ENaC kommt in der luminalen Membran der Epithelien von Niere (Hauptzellen der Sammelrohre und Verbindungstübli), Dickdarm und Lunge vor und ist zum einen für die Zusammensetzung der intraluminalen Flüssigkeit und zum anderen für die Kontrolle von Salz- und Wasserhomöostase sowie für den Blutdruck von besonderer Bedeutung [49]. Er ist selektiv für Na⁺ und kleinere Ionen wie Lithium, und stellt die wichtigste Kapazitätsbegrenzung der luminalen Na⁺-Resorption in Epithelzellen dar [23]. ENaC besteht aus drei homologen Untereinheiten (α , β , γ), die seine funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften beeinflussen. Der klassische Inhibitor dieses Kanals ist das K⁺-sparende Diuretikum Amilorid [43].

Die Regulation erfolgt über die eher kurzfristige Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit bzw. der Leitfähigkeit des Kanals, sowie langfristig über die Anzahl der Kanäle in der Membran. Beide Effekte können über das Hormon Aldosteron und den Mineralokortikoidrezeptor (MR) vermittelt werden. Daneben können auch ADH und Insulin über eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung zu einer Aktivierung von ENaC führen [16].

1.2.1.2 Glukoseresorption

Glukose wird vor allem im Bürstensaum von Niere und Dünndarm sekundär-aktiv resorbiert. Dabei wird sie luminal über den Na⁺/Glukose-Symporter (SGLT1) aufgenommen und basolateral über einen Glukose Carrier (GLUT) abgegeben [61].

SGLT1 koppelt den Transport von Glukose an zwei Na^+ -Ionen. Er kommt v. a. an der luminalen Seite von Dünndarmepithelzellen und dem proximalen Tubulus der Niere vor, konnte aber auch im gesamten Dickdarm der Maus detektiert werden [73].

Da es keinen geeigneten spezifischen Inhibitor dieses Transporters gibt, ersetzen wir während des Versuches die Glukose in der Experimentallösung durch Mannitol. Dieses Substrat kann den SGLT1 nicht passieren [44].

1.2.1.3 TRPM 4

TRPM4 (engl.: *transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4*) ist ein unselektiver Kanal für monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ , der impermeabel für Ca^{2+} ist. Er ist spezifisch durch 9-Phenanthrol hemmbar [26]. Die Funktionen des Kanals sind noch weitgehend unbekannt, wobei Genexpressionsstudien seine nahezu ubiquitäre Verbreitung in verschiedensten Geweben der Maus, wie Kolon, Gehirn, Herz, Aorta, Inselzellen des Pankreas und Nebennieren zeigten [38]. Zur Regulation ist bekannt, dass der Kanal durch intrazelluläres Ca^{2+} , Membranpotenzial, ATP und Proteinkinase C (PKC)-phosphorylierung moduliert werden kann [47]. Ähnlich der Verbreitung, scheint der Kanal eine Rolle in verschiedensten physiologischen Abläufen zu spielen, wie z.B. der Insulinsekretion, der Zellvolumenregulation oder der Rhythmusgebung in Herzzellen [65].

1.2.1.4 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Der elektrogene $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) wurde in unseren Experimenten mit Hilfe seines Inhibitors Dichlorobenzamil [57] gehemmt. Er wurde bereits in Kolonepithelzellen detektiert und sorgt hier für einen Ca^{2+} -Ausstrom und einen Na^+ -Einstrom. Seine Hauptaufgabe wird in der Regulation einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermutet [56]. Die Lokalisation des NCX wird in der Literatur meist als basolateral beschrieben. Es gibt aber auch Hinweise für eine luminale Expression des NCX [54].

1.2.1.5 Der Na^+ /Fettsäuren-Cotransporter (slc5a8)

Slc5a8 ist ein Cotransporter von Na^+ -Ionen und kurzkettigen Fettsäuren wie Propionat und Acetat, die im Darmlumen durch bakterielle Fermentation entstehen. Die Na^+ /Fettsäuren-Stöchiometrie ist dabei substratabhängig (z.B. Laktat: 2:1, Propionat: 4:1) [25]. Neben der Niere wurde seine Expression auch in der luminalen Membran von Epithelzellen des Dickdarms nachgewiesen, wo das codierende Gen zunächst als Tumorsuppressorgen bekannt wurde [62].

1.2.1.6 KCNQ1/E3

Der basolaterale K^+ -Kanal KCNQ1 ist in vielen Geweben vertreten. Im Kolon bestimmt die Untereinheit KCNE3 seine elektrophysiologischen Eigenschaften. Er ist durch den Botenstoff cAMP aktivierbar und stellt die maßgebliche Triebkraft für die Cl^- -Sekretion dar [15]. Sein Inhibitor, das Chromanol 293B, bindet an einen Rezeptor innerhalb der Pore und vermindert so die K^+ -Durchlässigkeit [33].

1.2.1.7 Wasserresorption

Das Kolon besitzt eine hohe Kapazität der Flüssigkeitsresorption. Der Hauptmechanismus wird durch die Na^+ -Resorption mittels osmotischem parazellulären Transport geschaffen.

Von Naftalin et al. wurde im distalen Kolon ein unterstützender Mechanismus beschrieben: Eine, die basale Membran der distalen epithelialen Kryptenzellen umgebende Myofibroblastenschicht, die impermeabel für Makromoleküle und Na^+/Cl^- ist, schafft einen hyperosmolaren, so g. „perikryptischen“ Raum. Dadurch wird ein H_2O -Gradient vom Darmlumen in den beschriebenen Raum erzeugt. Der daraus resultierende hydrostatische Druck mündet in einer effektiven Wasser- und Salzaufnahme [41].

Zusätzlich wird vermutet, dass die bei der Glukoseaufnahme beteiligten Transporter (SGLT1 und GLUT2) simultan Wassermoleküle transportieren können [40].

1.2.2 Transportprozesse in der Niere

Die Niere ist ein paariges Organ, das neben Hormonproduktion (Erythropoetin, Vitamin D) und Stoffwechsellleistungen, wie der Glukoneogenese, vor allem die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und die Regulation von Volumen- und Elektrolytgehalt zur Aufgabe hat. Das Prinzip der Harnproduktion beruht darauf, dass im Glomerulum ein großes Volumen mit kleinemolekularen Stoffen, der so g. Primärharn, aus dem Blut in das Tubulussystem abfiltriert wird. Dieser wird dann durch Absorption von Elektrolyten, H_2O und Glukose und Sekretion von z.B. Giftstoffen an den aktuellen Bedarf des Körpers (bezüglich Osmolalität und Volumen) angepasst. Mit Hilfe der Clearance des Stoffwechselproduktes Kreatinin kann man auf die glomeruläre Filtrationsrate schließen.

Ein Nephron lässt sich in verschiedene funktionelle Einheiten unterteilen, die im Folgenden kurz mit ihren wichtigsten Funktionen bzgl. der Na^+/Cl^- -Resorption genannt werden sollen.

Abb. 2a gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau eines Nephrons.

1.2.2.1 Proximaler Tubulus (Abb. 2b)

Neben der aktiven Sekretion von Fremdstoffen, findet hier eine starke Na^+ - und HCO_3^- -Resorption statt, die vor allem über einen Na^+/H^+ -Austaucher (NHE3) vermittelt wird. Im Tubuluslumen katalysiert die Carboanhydrase (CA) die Bildung von CO_2 aus H^+ und HCO_3^- . Dieses diffundiert in die Zelle, wo mit Hilfe einer weiteren CA die Reaktion rückwärts abläuft. Das nun gebildete HCO_3^- verlässt die Zelle über einen basolateralen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter (NBC1). Im proximalen Tubulus werden mit Hilfe verschiedener Na^+ -gekoppelter Symporter weitere Substanzen resorbiert. So erfolgt auch die Glukoseresorption in diesem Abschnitt. H_2O folgt durch Wasserkanäle transzellulär und über die Schlussleisten parazellulär nach.

1.2.2.2 Henle Schleife (Abb. 2c)

Sowohl auf- als auch absteigender dünner Teil der Henle-Schleife dienen vornehmlich der Harnkonzentrierung. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, der H_2O -impermeabel ist, erfolgt die Na^+ -Aufnahme maßgeblich über den $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -Symporter (NKCC2). Durch Rezirkulation von K^+ über luminale Kanäle (ROMK2) und basolateralen Cl^- -Efflux (ClCKb) entsteht ein lumenpositives transepitheliales Potenzial, durch das weitere positiv geladene Ionen parazellulär resorbiert werden.

1.2.2.3 Distales Konvolut (Abb. 2d)

Die Na^+ -Resorption wird hier über den Thiazid-hemmbareren, elektroneutralen Na^+/Cl^- -Symporter gewährleistet (NCC).

1.2.2.4 Verbindungstubulus und Sammelrohr (Abb. 2e)

In den Hauptzellen dieser Nephronabschnitte erfolgt die transepitheliale Na^+ -Aufnahme Aldosteron-gesteuert über ENaC und die Na^+/K^+ -ATPase. Die Wasseraufnahme ist hier über ADH durch Einbau von Aquaporinen reguliert.

1.2.2.5 Harnkonzentrierung

Um das Plasmavolumen und die Osmolalität in einem konstanten Rahmen zu halten, verfügt die Niere über enorme Harnkonzentrierungsfähigkeiten. Die Urinmenge (<0,5l/d - >2l/d) und -osmolalität (ca. 50mosm/kgH₂O - ca. 1200mosm/kgH₂O) können beim Menschen entsprechend angepasst werden.

Im H₂O-impermeablen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird durch die Na⁺/Cl⁻-Resorption eine interstitielle Osmolaritätssteigerung erreicht, die einen Wasserausstrom aus dem absteigenden Teil zur Folge hat. Die Schleifenanordnung im Gegenstromprinzip (s. Abb. 2a) verstärkt diesen Effekt. Die hohe Osmolarität des Interstitiums sorgt vor allem für eine vermehrte Absorption von H₂O aus den Sammelrohren, die durch den Einbau von AQP₂ reguliert werden kann. Über die Vasa recta wird das Wasser abtransportiert. Neben Na⁺/Cl⁻ beteiligt sich auch Harnstoff an der Osmolaritätssteigerung des Interstitiums, in dem er über spezielle, ADH-abhängige Transporter (UT-A1) aus den medullären Sammelrohren in das Interstitium strömt [4,30].

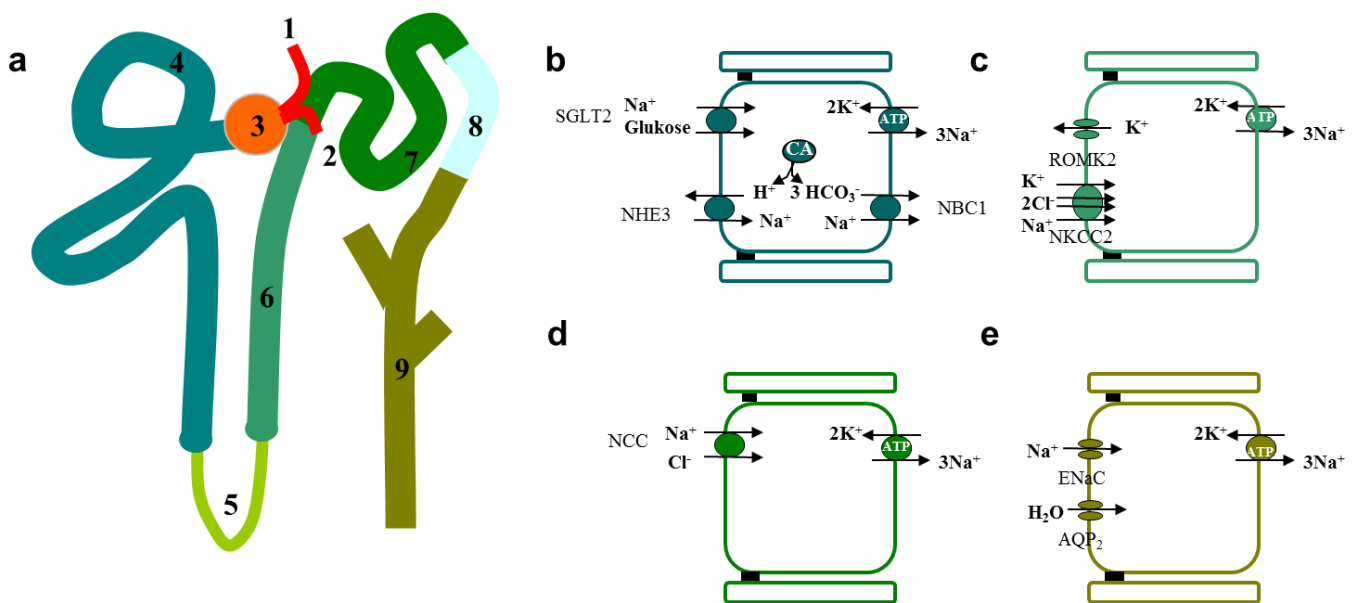


Abb. 2a: Schema eines Nephrons mit Vas afferens (1), Vas efferens (2), Glomerulum mit Bowmann-Kapsel (3), Proximaler Tubulus (PT) (4), dünner ab- und aufsteigender Teil der Henle Schleife (5), dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife (TAL) (6), distales Konvolut (DCT) (7), Verbindungstubulus (CNT) (8), Sammelrohr (CD) (9)

Abb. 2b: Vereinfachtes Zellmodell für die Na⁺-Resorption im PT.

Abb. 2c: Vereinfachtes Zellmodell für die Resorptionsprozesse in der TAL.

Abb. 2d: Vereinfachtes Zellmodell für die Resorptionsprozesse im DCT.

Abb. 2e: Vereinfachtes Zellmodell für die Na⁺- und Wasserresorption im CD.

1.3 Hormone des Salz- und Wasserhaushaltes

1.3.1 Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor

Das Steroidhormon Aldosteron ist an der Steuerung des Na⁺-, K⁺-, Volumen- und Säure-Basen-Haushaltes beteiligt. Somit hat es auch eine herausragende Bedeutung für den Kreislauf.

Sympathikusaktivierung, niedriger Blutdruck, geringe Na⁺-Konzentration an der Macula densa und vermindertes Plasmavolumen führen über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-

Aldosteron-Systems (RAAS) zu einer vermehrten Biosynthese des Mineralokortikoids Aldosteron. Es wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus Cholesterol hergestellt. Zudem verursachen eine Hyperkaliämie und ein erhöhter ACTH-Spiegel ebenfalls eine Steigerung der Aldosteronbildung [17].

Über den MR stimuliert Aldosteron die Na^+/Cl^- -Resorption und die K^+ -Sekretion in den Epithelzellen distal der TAL, des Kolons und der verschiedenen Speichel- und Schweißdrüsen [13]. Als Zielprotein des lipophilen Aldosterons befindet sich der MR im Zytosol. Seine Bindung führt über eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zu einer Induktion der Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase (SGK1) führen. Die SGK1 phosphoryliert ein Regulator-protein (Nedd4-2) von ENaC, das für die Internalisierung und den Abbau des Kanals verantwortlich ist. Die Bindung von Nedd4-2 an ENaC wird so verhindert. Dies führt zu einer erhöhten funktionellen Membranexpression von ENaC mit der Folge einer gesteigerten Na^+ -Absorption [70]. Zusätzlich werden K^+ -Kanäle (ROMK) in der luminalen Zellmembran aktiviert und erzeugen eine erhöhte K^+ -Abgabe in den Harn [71].

Glukokortikoide, die in viel höherer Plasmakonzentration vorliegen als Mineralokortikoide, sind ebenfalls in der Lage den MR zu binden. Durch eine Koexpression mit dem Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11- β HSD2), das Kortisol in seinen unwirksamen Metaboliten Kortison umwandelt, kann eine solche Über- bzw. Fehlstimulation verhindert werden [22]. Abb. 3 zeigt die Wirkung von Aldosteron auf seine Zielzelle.

Neben dem unmittelbaren Effekt des Mineralokortikoids, welcher eine erhöhte Na^+ -Leitfähigkeit induziert, existiert auch eine längerfristige Wirkung des Hormons, die zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von ENaC führt [3].

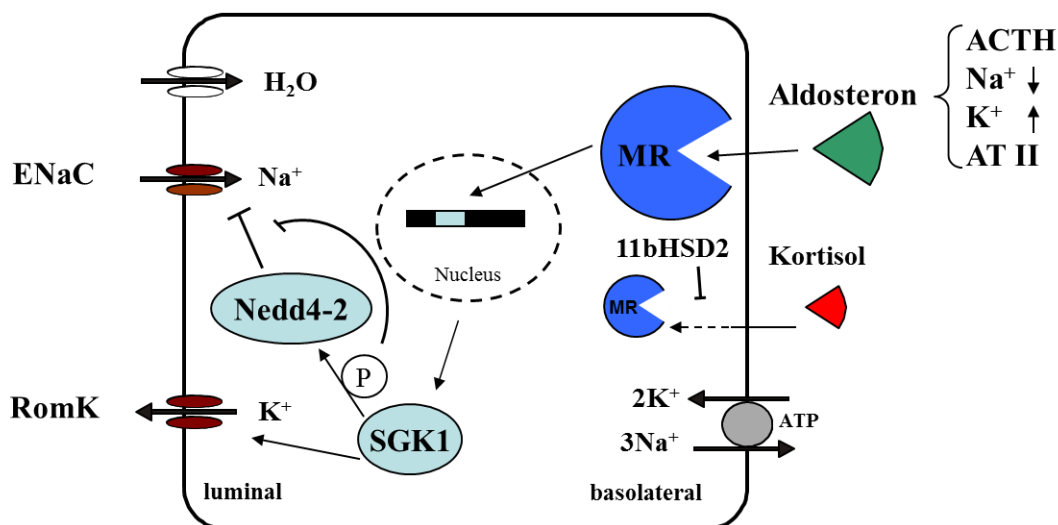


Abb. 3: Aldosteronwirkung über den MR: Aktivierte Transkriptionsfaktoren stimulieren das Enzym SGK1, das Endozytose und Ubiquitierung von ENaC durch Phosphorylierung des Regulatorproteins Nedd4-2 vermindert.

1.3.2 Adiuretin (ADH, Vasopressin)

Das antidiuretische Peptidhormon wird bei steigender Plasmaosmolalität und sinkendem Extrazellulärvolumen aus dem Hypophysenhinterlappen freigesetzt. Seine wichtigste Aufgabe besteht in der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes des Körpers. ADH bindet an die V2-Rezeptoren der renalen Sammelrohrzellen und aktiviert die Proteinkinase A über eine cAMP-Erhöhung. Hierdurch werden vermehrt Wasserkanäle, auch als Aquaporine Typ 2 (AQP₂) bezeichnet, mittels Exozytose aus intrazellulären Vesikeln in die luminale Zellmembran der Sammelrohre integriert [42]. Das Resultat ist eine erhöhte lokale Wasserpermeabilität, so dass das Wasser entsprechend dem osmotischen Gradienten aus dem Lumen in das Zellinnere fließt und die Zelle über basolaterale Aquaporine (AQP3, 4) verlässt. Die osmotischen Gegebenheiten im Nierenmark mit dem Gegenstromprinzip erlauben so eine effektive Wasseraufnahme. Die Konzentration des Harns kann im Menschen durch diesen Mechanismus eine Osmolarität von bis zu 1200mosmol/l erreichen. Andersherum führt eine Erregung von Dehnungsrezeptoren im Körperkreislauf zu einer Reduktion der ADH-Freisetzung (Gauer-Henry-Reflex). Ohne AQP₂-Expression ist die luminale Membran der Sammelrohre nahezu wasserundurchlässig und ermöglicht damit die Ausscheidung eines stark hypotonen Urins.

Des Weiteren wurde neben dem oben beschriebenen V2-vermittelten „Haupteffekt“ auch eine cAMP-abhängige Aktivierung von ENaC durch hohe Konzentrationen von ADH beschrieben. Dies führt - ähnlich wie bei Harnstoff - konsekutiv zu einer weiteren Steigerung der H₂O-Resorptionskapazität [4].

1.3.3 Weitere Hormone des RAAS: Renin und Angiotensin

Eine Verminderung des Blutdrucks, der Cl⁻-Konzentration an der Macula densa und eine erhöhte Sympathikusaktivierung führen zu einer gesteigerten Freisetzung der Protease Renin aus den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates. Diese spaltet das Protein Angiotensinogen zu Angiotensin I (AT I), welches durch das Angiotensin-converting-Enzym (ACE) zu Angiotensin II (AT II) gespalten wird. Über den AT1-Rezeptor wirkt AT II vasokonstriktorisch und stimuliert die Freisetzung von ADH und Aldosteron. Daneben sind in der Niere noch weitere, lokale Wirkmechanismen bekannt: Neben erhöhtem Filtrationsdruck und Proteinurie (durch Vasokonstriktion des Vas efferens) stimuliert AT II die Proliferation verschiedener Zelltypen, wie z.B. Mesangium- oder Endothelzellen [50]. Außerdem wurde ein direkter konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Absorptionsmechanismen im proximalen Tubulus und eine AT II-bedingte Erhöhung der Elektrolytleitfähigkeit im distalen Tubulus beobachtet [68].

1.3.4 Antagonisten des RAAS

Natriuretische Peptide reduzieren das Flüssigkeitsvolumen im Körper und senken den systemischen Blutdruck. Sie können als Gegenspieler des RAAS verstanden werden, da sie in den Nieren eine vermehrte GFR mit erhöhter Na^+ - und H_2O -Ausscheidung induzieren und eine vasodilatatorische und antiproliferative Wirkung auf Gefäßendothelien besitzen. Außerdem hemmen sie die Ausschüttung von Renin, Aldosteron und ADH [45].

Obwohl es im Körper ubiquitär vorhanden ist, ist der wichtigste Reiz für die Ausschüttung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) aus den Myozyten des Herzens eine Dehnung der Herzvorhöfe bei erhöhter Volumenbelastung. Daneben wurden zusätzliche Stimuli für seine Freisetzung, wie ADH, AT II oder Sympathomimetika entdeckt [45]. Abgesehen von ANP sind noch zwei weitere dieser Peptide bekannt: BNP (engl.: *brain natriuretic peptide*) und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid).

1.4 Das Mausmodell

Während Mäuse mit einem totalen Knockout des MRs aufgrund einer stark verminderten tubulären Na^+ -Rückresorption im Sinne eines Pseudohypoaldosteronismus ohne supportive Maßnahmen nicht lebensfähig sind [10], können Mäuse mit einem inkompletten Fehlen des MR über verschiedene Kompensationsmechanismen ihren Na^+ -Haushalt zumindest teilweise ausgleichen. Das von uns untersuchte Mausmodell wurde uns freundlicherweise vom Krebsforschungszentrum Heidelberg zur Verfügung gestellt [48]. Es wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems erzeugt.

Das MR-Gen war in den Versuchstieren mit zwei loxP Stellen versehen, die von einem Restriktionsenzym namens Cre-Rekombinase (Cre) spezifisch erkannt und exzidiert wurden. Das Cre-Gen war in diesem Fall so in das Genom eingebracht, dass es unter der Kontrolle des AQP_2 -Promotors stand. Die Cre war also nur in den Geweben exprimiert, in denen auch der AQP_2 -Promotor physiologischer Weise aktiv ist. Dies ist v. a. in den Hauptzellen der Sammelrohre der Fall, so dass der MR in den transgenen Mäusen (TG) folglich hier exzidiert wurde (s. Abb. 4a).

Die verwendeten TG waren heterozygot für das dominante Cre-Gen und homozygot für das gefloxtes MR-Gen. Die Kontrolltiere (WT) wiesen homozygot auch ein gefloxtes MR-Gen auf, besaßen aber keine Cre-Aktivität, da sie im Hinblick auf diese Wildtypen waren.

Für die Mauszucht kreuzten wir ein WT-Weibchen ($\text{MR}^{\text{flox/flox}}$) mit einem TG-Männchen ($\text{MR}^{\text{flox/flox}}//\text{AQP}_2\text{Cre}$), so dass die Nachkommen folglich WT oder TG waren (s. Abb. 4a).

Um die Versuchstiere zuordnen zu können, wurden alle Mäuse im Vorfeld mit Hilfe einer PCR genotypisiert.

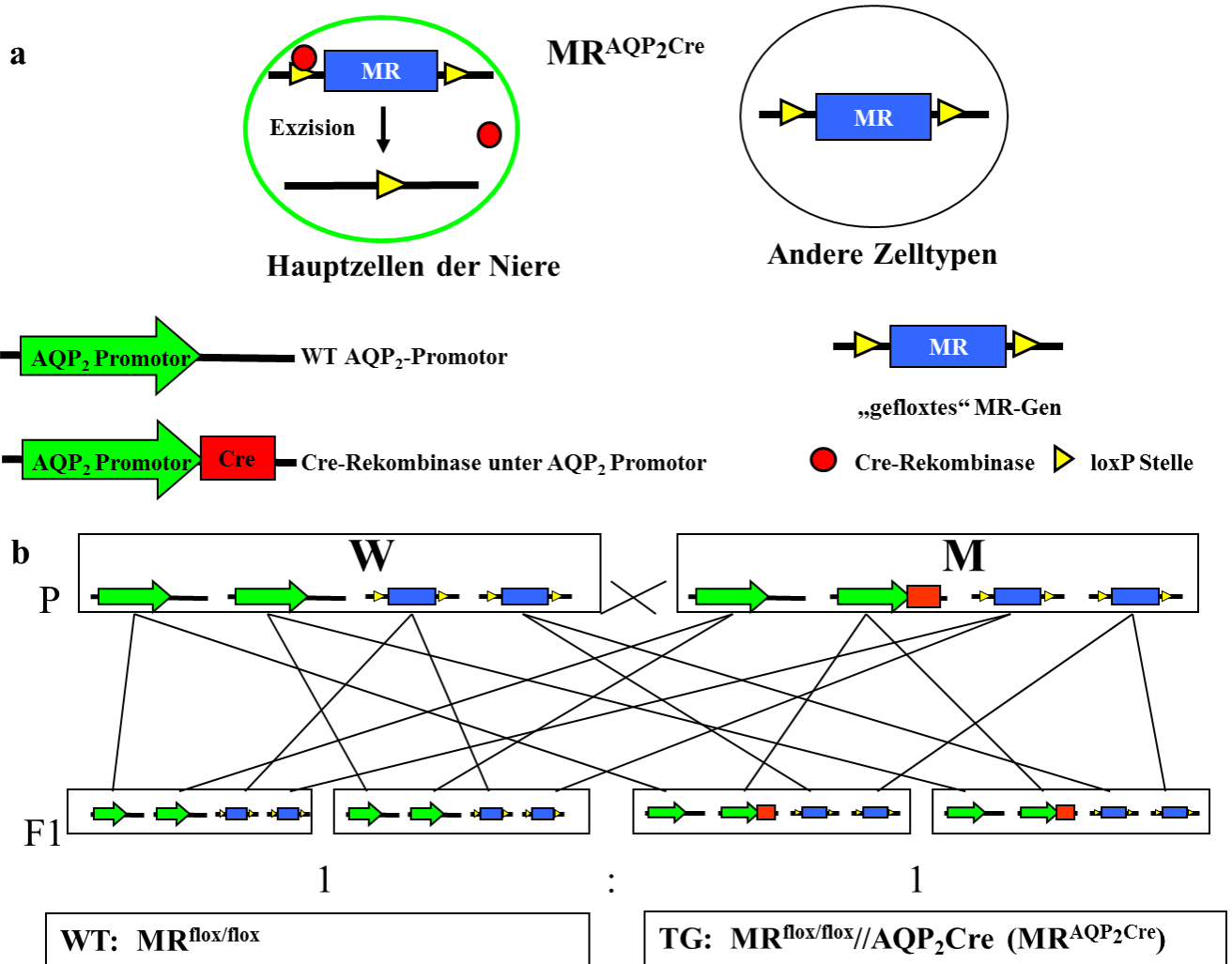


Abb. 4a: Schematische Zeichnung des AQP₂-abhängigen Knockouts des MR, der mit Hilfe des Cre-/loxP-Systems generiert wurde

Abb. 4b: Übersicht über die Verpaarungen: Es wurde jeweils ein WT-Genotyp mit einem TG-Genotypen verpaart. Potenzielle Nachkommen waren so entweder TG oder WT.

Der hohe Salzverlust, der infolge einer fehlenden Aktivität von ENaC in den TG entstand, konnte unter Standarddiät durch das frühe Verbindungsstück kompensiert werden, da der AQP₂-Promotor an dieser Stelle nicht aktiv war und der MR somit exprimiert wurde. Ein reaktiv erhöhter Aldosteron Gehalt des Plasmas führte hier zu einer massiv verstärkten Aktivierung von ENaC [48]. Abb. 5a & 5b veranschaulichen die AQP₂-Expression und die davon abhängige Verteilung von MR und ENaC in den verschiedenen Genotypen.

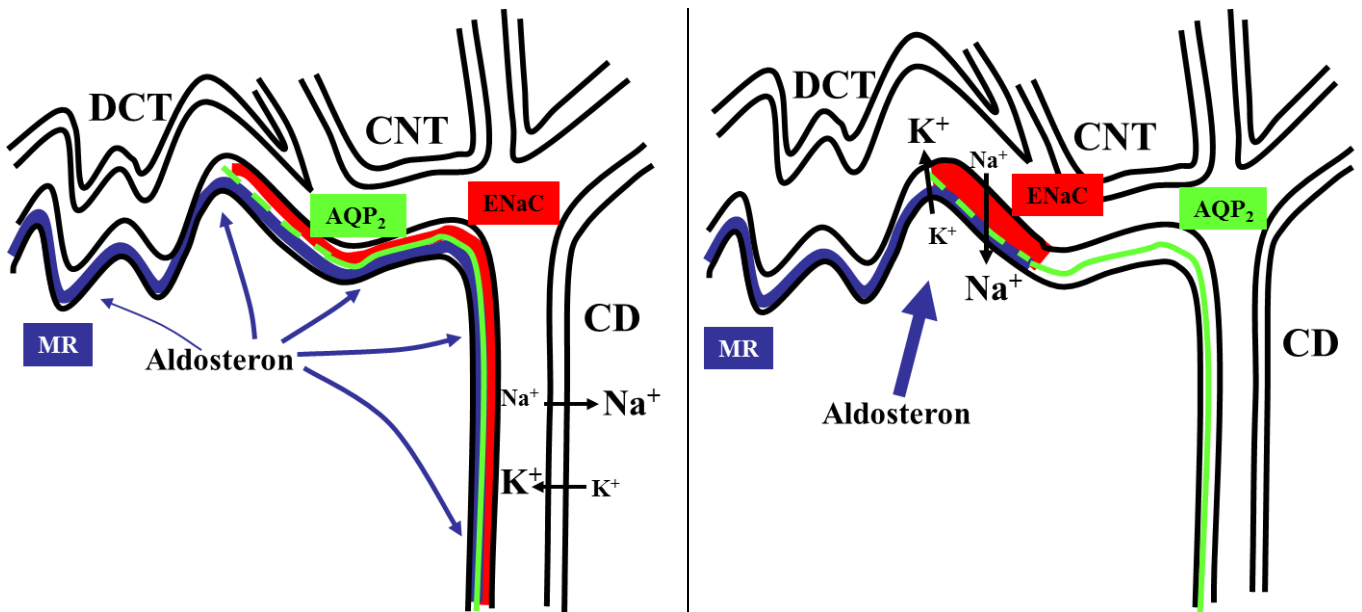


Abb. 5a: Schematische Zeichnung eines Nephronabschnitts in den WT mit DCT, CNT und CD. Die Farbkodierung zeigt die übliche Expression von MR (blau), AQP₂ (grün) und ENaC (rot).

Abb. 5b: Schematische Zeichnung des gleichen Nephronabschnitts in den TG mit identischer Farbkodierung. Aufgrund des AQP₂-abhängigen MR-Knockouts in den CD mit konsekutivem Fehlen von ENaC führte eine erhöhte Aldosteronkonzentration im Plasma zu einer deutlich verstärkten ENaC-Expression im Verbindungsstück, in dem AQP₂ physiologisch nicht exprimiert wird.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Dickdarm an der Kompensation des Natrium- und Wasserverlustes in den Sammelrohren von Mäusen mit einem AQP₂-Promotor abhängigen Knockout des Mineralokortikoidrezeptors beteiligt ist. Dazu wurden *in vivo* Versuche sowie *in vitro* Versuche am Kolon durchgeführt, um folgende Sachverhalte näher zu beleuchten:

In vivo:

1. Quantifizierung der renalen Wasser- und Elektrolytausscheidung unter Standard- (STD) und Niedrig-Natrium- (NND) Diät
2. Quantifizierung der intestinalen Wasser- und Elektrolytausscheidung unter STD und NND
3. Bilanzierung

In vitro:

1. Messung der elektrogenen Transportvorgänge im distalen Kolon und Coecum
2. Identifizierung beteiligter Transporter und Kanäle durch pharmakologische Inhibition

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle benutzten Chemikalien wurden von den Firmen Promega (Deutschland), Roth (Deutschland) und Sigma (Deutschland) vertrieben.

Proteinase K (Roth, Deutschland), Taq DNA Polymerase (aus: „PCR Mastermix“, Promega, Deutschland), Reverse Transkriptase (aus: „RNeasy Mini Kit“, Qiagen).

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Mausgenotypisierung

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus der Mausschwanzspitze

NID (*non ionic detergent*)-Puffer:

Substanz	Menge (ml)
1M KCl	25
1M Tris-HCl pH 8,3	5
1M MgCl ₂	1
100g/ml Gelatine	0,5
10% NP40	22,5
Tween 20	22,5
H ₂ O	ad 500

2.2.1.2 PCR

PCR–MasterMix (Promega)

Primer (MWG Biotech):

AQP2_1s: 5′-AAG TGC CCA CAG TCT AGC CTC T-3′

AQP2_2as: 5′-CCT GTT GTT CAG CTT GCA CCA G-3′

AQP2_3as: 5′-GGA GAA CGC TAT GGA CCG GAG T-3′

MR_1s: 5′-CTG GAG ATC TGA ACT CCA GGC T-3′

MR_2as: 5′-CCT AGA GTT CCT GAG CTG CTG A-3′

MR_3as: 5′-TAG AAA CAC TTC GTA AAG TAG AGC T-3′

2.2.1.3 Gelelektrophorese

SyberSafe (Invitrogen, Deutschland)

1,8% Agarosegel in TBE-Puffer (Roth, Deutschland)

PCR-Marker (Promega)

Blue/Orange 6*Loading Dye (Promega)

2.2.1.4 Real Time PCR

Taqman - Sonde	Bestellnummer:
HPRT1	Mm 446968_m1
GAPDH	Mm 99999915_g1
TRPM4	Mm 00613173_m1
KCNQ1	Mm 00434641_m1
KCNE3	Mm 00445119_m1
ENaC α	Mm 00803386_m1
ENaC β	Mm 00441219_m1
ENaC γ	Mm01163272_m1
SGLT1	Mm 00451203_m1

RNA – Isolierung: siehe „RNeasy Mini Kit“ (Quiagen)

cDNA: siehe Kit „Quantitect, Reverse Transkriptase“ (Quiagen)

2.2.2 Experimentallösungen

Kontrolllösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	145
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
Glukose	5
MgCl ₂	1
Ca-Glukonat	1,3

Der pH wurde mittels Zugabe der Base NaOH bzw. der Säure HCl auf 7,4 eingestellt.

Stammlösungen

Substanz	Lösungsmittel	Stamm-Konzentration (mM) bzw. Endkonzentrationen (μM)
Amilorid	DMSO	50
9-Phenanthrol	DMSO	100
293B	DMSO	100
Dichlorobenzamil	DMSO	50
TTX	H ₂ O	0,1 (bzw. 1 μM Endkonzentration)

Die Stammkonzentrationen wurden jeweils mit Kontrolllösung 1:1000 verdünnt. Ausnahme TTX: 1:100

2.2.3 Experimentalfutter

Die verwendete natriumarme Diät wurde von der Firma Ssniff (Deutschland) hergestellt. Der Na⁺-Gehalt betrug <0,03 %. Die NND wurde den Mäusen jeweils ab dem 10. bzw. 7. Tag vor den Experimenten verabreicht. Auch die STD wurde von Ssniff vertrieben und enthielt einen Na⁺-Anteil von 0,25 %.

2.3 Genotypisierung

Die Zucht der Versuchstiere erfolgte aus heterozygoten Verpaarungen (s. 1.4), so dass die Tiere vor den Experimenten mit Hilfe einer PCR genotypisiert werden mussten. Die Mäuse wurden durch Nummerierung der Käfige und durch Ohrlochmuster kodiert. Für die vergleichenden Experimente wurden Geschwistertiere verwendet.

2.3.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der benötigten DNA wurden etwa die letzten 3mm des Mausschwanzes (Mausalter: < 6 Wochen) abgeschnitten und für mindestens 12h in 20 μl NID-Pufferlösung und 2 μl Proteinase K (10mg/ml) bei 56°C und 300/min inkubiert. Das Verdauungsenzym wurde anschließend durch eine 10minütige Temperaturerhöhung auf 96°C inaktiviert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Bestimmung des Genotyps wurde die gewonnene DNA mit Hilfe der Taq-Polymerase (Promega, PCR-Mastermix) in einem Thermo Cycler (Eppendorf) vervielfältigt. Der Probenansatz betrug 25 μl und es wurden die in 2.2.1.2 beschriebenen AQP₂- und MR/flox-Primer benutzt. Das Temperaturprotokoll war für beide Ansätze wie folgt:

96°C	10min	}	35 Zyklen
95°C	30sec		
63°C	1min		
72°C	1min		
72°C	10min		

Anschließend: Kühlung und Aufbewahrung der Proben bei 4°C.

2.3.3 Gelelektrophorese

Durch eine Gelelektrophorese (120V, 1h) mit 1,8%igem Agarosegel wurden die PCR-Produkte gemäß ihrem Molekulargewicht und abhängig von der Ladung ihrer Basenpaare aufgetrennt. Das PCR-Produkt (25µl) wurde mit 6µl des Auftragspuffers „Blue/Orange 6*Loading Dye“ (Promega) vermischt und eine Probengröße von 7-10µl in die Auftrags-taschen des Gels gegeben. Der interkalierende Farbstoff „SyberSafe“ wurde bereits mit dem Gel angerührt und verfestigt. Durch ihn wurde das Bandenmuster unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Abb. 6 zeigt das Bandenmuster der beiden Vergleichsgruppen.

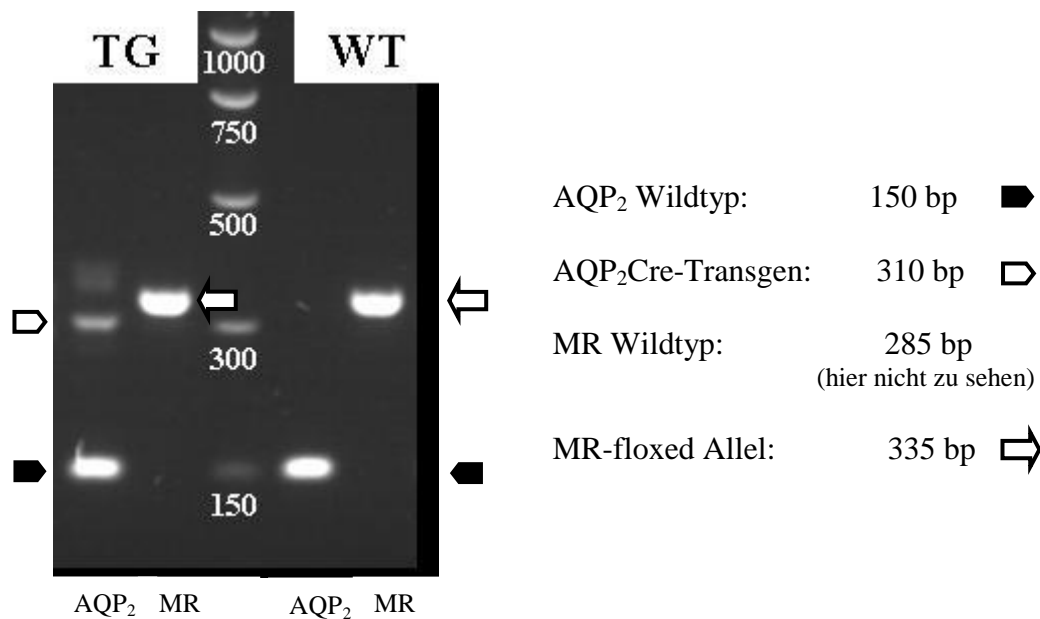


Abb. 6: Bandenverteilung in WT und TG

2.4 Der metabolische Käfig

Der metabolische Käfig ermöglicht eine genaue Bestimmung der Stoffwechselfparameter der Versuchstiere, da sowohl Trink- und Futtermenge als auch Urin- und Kotmenge sowie der jeweilige Elektrolytgehalt über einen bekannten Zeitraum erfasst werden können. Abb. 7 zeigt eine schematische Zeichnung des metabolischen Käfigs.

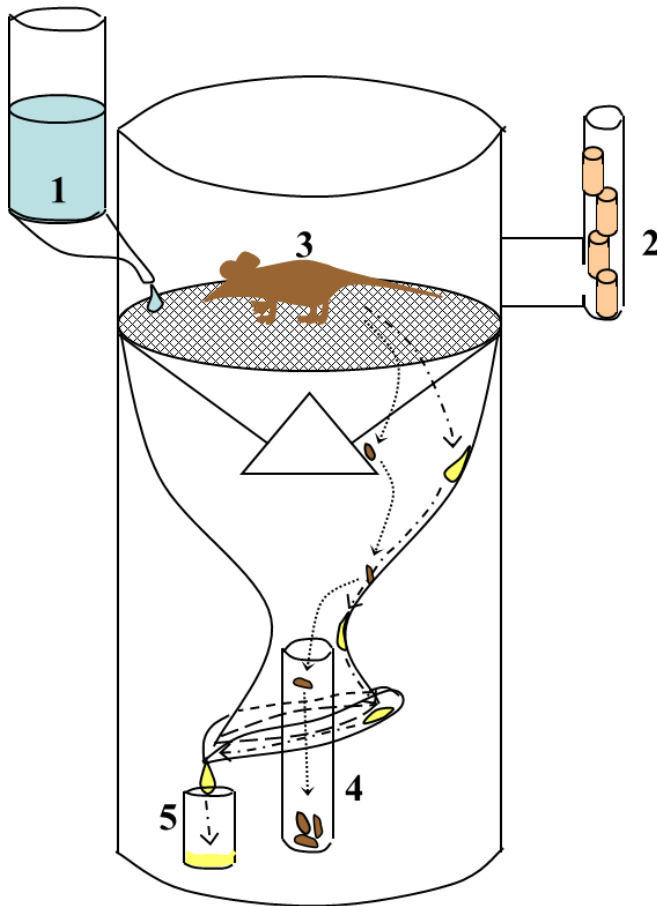


Abb. 7: Schematische Zeichnung einer Maus in einem metabolischen Käfig.

- 1) Wasserbehälter
- 2) Futterbehälter
- 3) Versuchstier
- 4) Kotsammelbehälter
- 5) Urinsammelbehälter

Futter- und Wasserverbrauch konnten aus der Gewichtsänderung der Behälter über den Versuchszeitraum ermittelt werden. Kot und Urin konnten getrennt aufgefangen und erfasst werden.

2.4.1 Versuchsdurchführung

Die Mäuse wurden für 24 Stunden einzeln in einem metabolischen Käfig gehalten und vor und nach dem Versuch gewogen. Die Vergleichsgruppen bestanden aus WT und TG gleichen Alters und Geschlechts. Sie wurden entweder mit STD oder mit NND gefüttert. Urin und Kot wurden gesammelt und außerdem Futter- und Trinkmengen der Tiere erfasst. Das Einsetzen der Tiere in die Käfige erfolgte an allen Versuchstagen zur gleichen Tageszeit.

2.4.2 Erfassen der Stoffwechselfparameter

Futter- und Wasserbehälter wurden vor und nach dem Versuch gewogen, Trink- und Fressmenge der Tiere konnten so aus der Gewichtsänderung errechnet werden.

Ebenso wurde der Urinsammelbehälter im leeren Zustand gewogen, sodass man die Menge des Urins nach dem gleichen Prinzip bestimmen konnte (hierbei galt 1g=1ml). Der Kot wurde ebenfalls gesammelt und in feuchtem und getrocknetem Zustand gewogen.

2.4.3 Uringewinnung, Blut- und Organentnahme

Die Maus wurde mit Hilfe einer Nasenmaske mit Isofluran 3,0Vol% narkotisiert (Isofluran, CuraMED Pharma GmbH, Deutschland). Die Entnahme des Urins erfolgte nach Eröffnung des Abdomens über einen Medianschnitt unmittelbar aus der gefüllten Blase mit einer 27Gauge Kanüle und einer 1ml Spritze.

Das Vollblut wurde aus der V. cava mit einer heparinisierten (Na-Heparinat, Ratiopharm, Deutschland) Einmalkanüle (22Gauge) gewonnen. Die Menge betrug ca. 400-600µl und wurde in eine Mikro-Hämatokrit Kapillare (BRAND GmbH, Deutschland, Cat. No. 749321) zur Hämatokritbestimmung und in eine heparinisierte Mikrokapillare (Radiometer, Dänemark, D 941-8-140) zur Blutgasanalyse gegeben. Die verbliebene Menge wurde in ein Reaktionsgefäß (1,5ml, Eppendorf, Deutschland) injiziert und für 2min bei 10.000xg zentrifugiert (HERAEUS Biofuge vito, Kendro Laboratory Products, Deutschland). Anschließend wurde der Plasmaüberstand abpipettiert und bei -21°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Im nächsten Schritt wurden die benötigten Organe entnommen, bei der narkotisierten und entbluteten Maus der Brustkorb eröffnet und ein Schnitt ins Herz gesetzt. Eine Niere, ein Teil der Leber und Proben von Coecum und distalem Kolon wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.4.4 Probenanalyse und Aufarbeitung

2.4.4.1 Blutgasanalyse

Mit Hilfe der Blutgasanalyse (BGA) können pH, pCO₂, pO₂, Bikarbonat und die Basenabweichung bestimmt werden.

Die BGA erfolgte sofort nach der Entnahme im venösen Blut aus einer Mikrokapillare (ESCHWEILER GmbH, Deutschland, EcoSys II, BGA-System).

2.4.4.2 Bestimmung des Hämatokrits

Der Hämatokritwert (Hkt) gibt den Volumenanteil von Erythrozyten im Vollblut wieder. Ein Teil des entnommenen Vollblutes wurde in eine Mikrokapillare überführt. Sie wurde verschlossen und für 2min bei 12000*g zentrifugiert (HETTICH Zentrifugen, Deutschland, EBA 21). Die festen und flüssigen Bestandteile des Blutes wurden so aufgetrennt und konnten mittels Ausmessen des gesamten Zentrifugats und der roten Zellen quantifiziert werden. Für die Berechnung des Hkts gilt:

$$Hkt = \frac{I_{S\ddot{a}ule}}{I_{Gesamts\ddot{a}ule}} * 100\%$$

Hkt [%], $I_{S\ddot{a}ule}$ = Zellbestandteile in der Kapillare [mm], $I_{Gesamts\ddot{a}ule}$ = Plasma und Blutzellen in der Kapillare [mm]

2.4.4.3 Messung der Plasma- und Urinparameter

Glucose, Phosphat, Kreatinin, Harnstoff und die Elektrolyte Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} aus Plasma und Urin wurden durch das Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie am UK-SH, Campus Kiel bestimmt.

2.4.4.4 Bestimmung der Aldosteronwerte im Plasma

Der Aldosterongehalt des Plasmas wurde freundlicherweise von der AG Leipziger (Aarhus, Dänemark) mit Hilfe eines Kits (Siemens, Deutschland, Coat-a-count kit, TALK100) bestimmt. Die Proben wurden im gefrorenen Zustand versandt.

2.4.4.5 Bestimmung der Osmolalitäten

Die Osmolalität einer Lösung kann mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung bestimmt werden, da diese in verdünnten Lösungen nahezu proportional zur Molalität der Teilchen des gelösten Stoffes ist. Die Urin- und Plasmaproben wurden durch ein Mikro-Osmometer gemessen (Fiske[®] Associates, Model 210, USA).

2.4.4.6 Berechnung von C_{krea} , C_{osmo} und C_{H_2O} (Clearance)

Die Clearance eines Stoffes beschreibt das Plasmavolumen, das in einer bestimmten Zeitspanne von diesem Stoff gereinigt wurde. Analog beschreibt die osmotische Clearance (C_{osmo}) den Volumenanteil des Plasmas, dem in einem definierten Zeitintervall alle osmotisch wirksamen Teilchen entzogen wurden. Die Kreatinin-Clearance nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da sie Auskunft über die GFR geben kann.

Die „Freiwasser-Clearance“ (C_{H_2O}) entspricht dem Anteil freien Wassers, das dem Harn zugefügt bzw. aus ihm entfernt werden muss, um eine plasmaisotone Konzentration zu erreichen. Die negative Freiwasser-Clearance beschreibt die Effizienz der tubulären Wasser-Reabsorptionskapazität (TC_{H_2O} , engl.: *tubular conservation of water*).

Um die unterschiedlichen Körpergewichte der Mäuse zu berücksichtigen, wurden die Clearancewerte auf das Körpergewicht (gKG) bezogen und in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gKG}$ angegeben. Die Kreatinin-Clearance (C_{krea}) wurde wie folgt berechnet:

$$C_{krea} = \frac{U_{krea} * V}{P_{krea} * t}$$

U_{krea} =Krea-Konzentration im Urin [mg/dl], P_{krea} =Krea-Konzentration im Plasma [mg/dl], V =Urinvolumen [μ l/gKG], t =Zeit [min]

Für die Clearance der Osmolyte gilt entsprechend:

$$C_{osmo} = \frac{U_{osmo} * V}{P_{osmo} * t}$$

U_{osmo} =Urin osmolalität [mosm/kg], P_{osmo} =Plasma osmolalität [mosm/kg], V =Urinvolumen [μ l/gKG], t =Zeit [min]

Die Freiwasser-Clearance ergibt sich aus dem Urinflussvolumen und C_{osmo} :

$$C_{H2O} = \left(\frac{V}{t} \right) - C_{osmo}$$

C_{osm} = Clearance der Osmolyte [μ l/min/gKG], V = Urinvolumen [μ l/gKG], t = Zeit [min]

2.4.4.7 Berechnung der fraktionellen Ausscheidung (FE)

Die FE eines Stoffes dient der Beurteilung der tubulären Funktion. Sie gibt den Anteil des Stoffes, der mit dem Urin ausgeschieden wird, in Bezug auf seine filtrierte Menge in Prozent an.

$$FE_{Elyt} = \frac{U_{Elyt} * P_{Krea}}{P_{Elyt} * U_{Krea}} * 100\%$$

$Elyt$ =Stoff, für den die FE bestimmt wird, U_{Elyt} =Urinkonzentration des Stoffes [mmol/l], P_{Elyt} =Plasmakonzentration des Stoffes [mmol/l], U_{Krea} bzw. P_{Krea} =Konzentration von Kreatinin in Urin bzw. Plasma [mmol/l]

2.4.4.8 Analyse der Kotproben

Nach dem Erfassen des Feuchtgewichtes wurden die Kotproben in einem Trockenschrank bei +60°C getrocknet. Durch anschließendes erneutes Wiegen der getrockneten Proben konnte der Wassergehalt des Kotes aus der Gewichts Differenz ermittelt werden.

Die getrockneten Proben wurden in destilliertem Wasser (15ml/g Probe) gelöst und homogenisiert (Janke und Kunkel KG, Deutschland Ultra-Turrax Typ TP18/2N). Die homogenisierte Menge wurde anschließend bei 3x12000*g zentrifugiert. Die Elektrolyte aus dem Überstand konnten im Flammenphotometer (EFOX 5053, Eppendorf, Deutschland) gemessen werden.

2.5 Ussing Kammer Versuche

Die Ussing Kammer ermöglicht die Erfassung transepithelialer Ströme und Potenziale, die durch den Ionentransport über die polaren Membranen generiert werden [35].

2.5.1 Konstruktion der Kammer

Die beiden Halbkammern bestanden aus Teflon, einem Material, das nicht leitet und sehr glatt poliert werden kann, damit sich an der Wand keine Salzbrücken ausbilden.

Sie wurden durch einen Gewebeträger, in welchen das zu untersuchende Gewebe eingespannt wurde, in eine luminale und eine basolaterale Kammer unterteilt. Silikon und Dichtungsringe sorgten für eine dichte Verbindung zwischen den Gewebeträgern und den Halbkammern, sowie zwischen den Halbkammern selbst. Das Gewebe dichtete wiederum die beiden Gewebeträgerseiten gegeneinander ab. Eine beheizte Bodenplatte sorgte für eine konstante Temperatur von 37°C in der Kammer. Auch die Zulaufschläuche für die Lösungen, mit denen die Kammern umspült wurden, liefen in einem erwärmten, großlumigen Plastikschlauch (ca. 40°C) und gewährleisteten so eine konstante Temperatur von ca. 37°C am Gewebe. Sowohl die luminale als auch die basolaterale Halbkammer verfügten jeweils über ein eigenes Zu- und Abflusssystem, so dass sie zeitgleich mit unterschiedlichen Substanzen perfundiert werden konnten. Jeweils vier Spritzen waren mit Dreiwegehähnen verbunden und ermöglichten einen schnellen Lösungswechsel (s. Abb. 8).

Ein Pulsgenerator (AD-Elektronik, Deutschland, Pulsgenerator 5.1) injizierte über chlorierte Silberdrahtelektroden in regelmäßigen Abständen Strompulse von 1,6µA, lumen negativ. Aus Pipettenspitzen geformte Agarbrücken (2,5% Agaragar in 1M KCL) dienten der elektrischen Verbindung zu den chlorierten Silberelektroden, durch die die transepitheliale Spannung (V_{te}) und die, durch die Stromimpulse generierte Spannungsänderung (ΔV_{te}) gemessen werden konnte. ΔV_{te} war dabei vom Widerstand des Systems (R_{gesamt}) abhängig. Der Gesamtwiderstand war in Serie geschaltet und setzte sich aus den Einzelwiderständen von Kammerlösung, Gewebeträger und dem Epithel zusammen.

Ein, an einen Verstärker angeschlossener analoger Schreiber (Kipp & Zonen, Deutschland, Flatbed Recorder) zeichnete sowohl V_{te} als auch ΔV_{te} über die gesamte Versuchsdauer auf. In Abb. 8 ist eine schematische Zeichnung des Aufbaus der Ussing Kammer abgebildet.

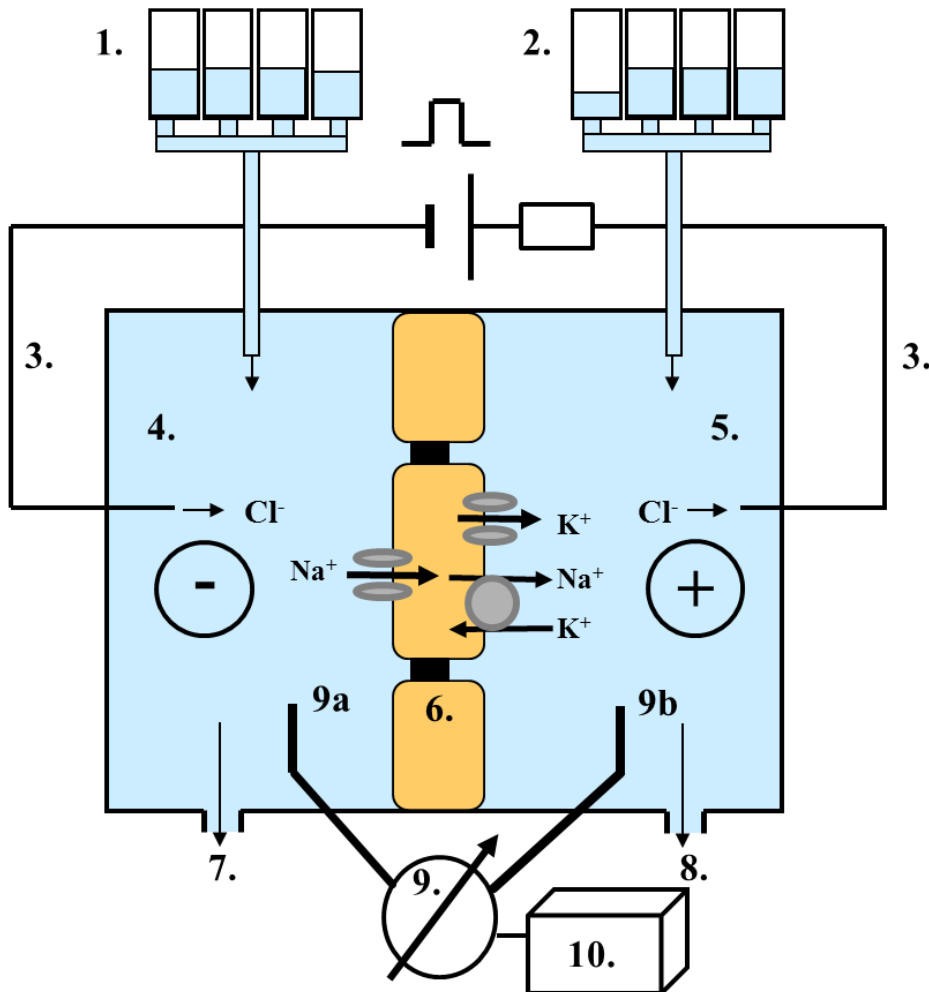


Abb.8: Schematische Zeichnung der Ussing Kammer

- | | |
|--|---|
| 1. <i>luminale Perfusion</i> | 7. <i>luminaler Abfluss</i> |
| 2. <i>basolaterale Perfusion</i> | 8. <i>basolateraler Abfluss</i> |
| 3. <i>Strominjektion (chlorierter Silberdraht)</i> | 9. <i>Voltmeter, a & b Agarbrücken mit chlorierten Silberelektroden</i> |
| 4. <i>luminale Kammerhälfte</i> | 10. <i>Schreiber</i> |
| 5. <i>basolaterale Kammerhälfte</i> | |
| 6. <i>Kolontgewebe mit Tight junction und polarer Ionenverteiler</i> | |

2.5.2 Grundlage der Messtechnik

Wie in 2.5.1 bereits erwähnt, entsteht durch elektrogene Ionentransporte über das Epithel ein transepitheliales Potenzial (V_{te}) zwischen den Kammern. Klemmt man dieses experimentell auf Null (klassischer Ussing Kammer Aufbau), erhält man einen Kurzschlussstrom (I_{sc}), welcher diesem elektrogenen Transport über die Membranen entspricht.

Um das Gewebe nicht durch Kurzschluss zu belasten, kann der I_{sc} gemäß dem Ohm'schen Gesetz aus dem Gewebswiderstand (R_{te}) und V_{te} errechnet werden. Alle I_{sc} -Angaben in dieser Arbeit beziehen sich auf diesen, eigentlich als „äquivalenten I_{sc} “ bezeichneten Strom.

Mit dem Ohm'schen Gesetz kann der Gesamtwiderstand des Systems aus der Spannungsänderung (ΔV_{te}) durch den Strompuls ($1,6\mu A$, s. o.) errechnet werden:

$$R = \frac{\Delta V}{I}$$

R = Widerstand [Ω], ΔV = Spannungsänderung [mV], I = Strompuls [μA]

Misst man den Widerstand der Kammer inklusive des leeren Gewebeträgers und zieht diesen von R ab erhält man den transepithelialen Widerstand (R_{te}). V_{te} und R_{te} werden dabei genauso wie der daraus errechnete I_{sc} auf die Gewebefläche bezogen (Gewebeträgerdurchmesser: 0,3cm und -fläche: $0,07cm^2$).

R_{te} setzt sich aus den Widerständen von *tight junction*, luminaler und basolateraler Membran zusammen. Dabei liegen luminaler und basolateraler Widerstand in Reihe und ihr Gesamtwiderstand parallel zum Widerstand der *tight junction*. Er wird deshalb durch Veränderung eines einzelnen Parameters, z.B. durch Inhibition eines luminalen Kanals, nur anteilig beeinflusst. Aus den so ermittelten Parametern V_{te} und R_{te} lässt sich der I_{sc} berechnen:

$$I_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}}$$

R_{te} = transepithelialer Widerstand [Ωcm^2], V_{te} = transepitheliale Spannung [mV], I_{sc} = Kurzschlussstrom [$\mu A/cm^2$]

Um pharmakologische Effekte auf bestimmte Transporter zu vergleichen, ist die jeweilige Änderung des transepithelialen Kurzschlussstroms (ΔI_{sc}) der aussagekräftigste Parameter.

Der Messaufbau legt die basolaterale Elektrode als Bezugs elektrode fest. Daraus folgt: Mit einer luminalen Depolarisation wird das Potenzial definitionsgemäß lumen negativer. Abb.9 zeigt eine Originalaufzeichnung.

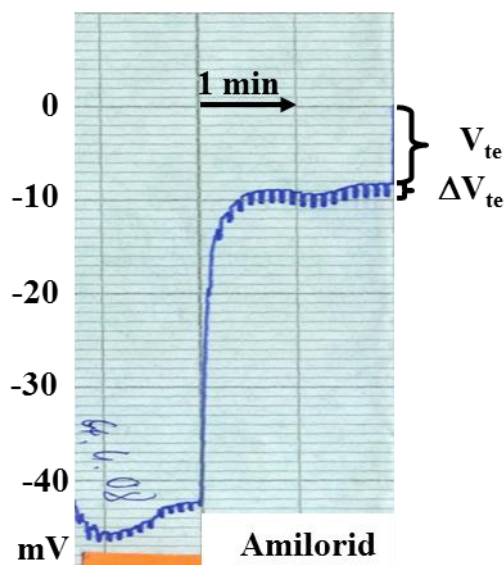


Abb. 9: Schreiberpapieraufzeichnung aus einem Ussing Kammer Versuch. Sie zeigt die schnelle Potenzialveränderung (V_{te}) nach Gabe des ENaC-Inhibitors Amilorid und die Zunahme des Widerstandes, sichtbar an der Vergrößerung der Spannungspulse (ΔV_{te}).

2.5.3 Vorbereitung und Präparation von distalem Kolon und Coecum

Die vorgesehenen Mäuse wurden 7 Tage (bzw. 10 bei den Versuchen im metabolischen Käfig) vor Durchführung der Experimente mit einer NND gefüttert und für die Generierung von Stoffwechselfparametern wie in 2.4.3 beschrieben behandelt.

In den Experimenten wurden zwei unterschiedliche Abschnitte des Dickdarms untersucht: Das distale Kolon und das Coecum. Die Lagerung der Organe erfolgte in gekühlter Kontrolllösung.

Das Kolon wurde durch eine Spritze von rektal mit gekühlter Kontrolllösung (ca. 1ml) gespült. Nach einer Durchtrennung zwischen distalem und proximalem Kolonabschnitt konnte der distale Anteil anterograd auf einen Glasstab mit einem Durchmesser von ca. 3mm aufgezogen und distal abgesetzt werden. Anschließend wurde die Tunica muscularis von dem aufgespannten Gewebe mit Hilfe der stumpfen Seite eines Skalpells und durch Scheerschub abpräpariert, ohne das Epithel zu schädigen.

Das Coecum der Maus ist sackförmig und deshalb nicht aufspannbar, so dass bei diesem Gewebe die Tunica muscularis nicht entfernt wurde. Es wurde proximal und distal mit einer Präparierschere abgesetzt. Beide Präparate wurden anschließend in Längsrichtung aufgeschnitten und durch vorsichtiges Bewegen in einem Bad mit gekühlter Kontrolllösung von Kotresten weitgehend gesäubert.

Danach wurde ein Epithelstück mit der Größe von ca. 0,6cm-0,8cm Kantenlänge herausgeschnitten und auf einen Gewebeträger gelegt, der mittig eine Aussparung mit einem Durchmesser von 0,07cm² aufwies.

2.5.4 Versuchsdurchführung

Das Kolon- bzw. Coecumgewebe wurde unmittelbar nach der Präparation auf den Gewebeträger gebracht und durch Aufeinanderlegen der beiden Trägerhälften fixiert. Die verwendeten Versuchssubstanzen wurden als Stammlösungen aufbewahrt und unmittelbar vor ihrer Gabe in Kontrolllösung pipettiert und vermischt (s. 2.2.2). Substanzen, die gleichzeitig mit Amilorid verabreicht wurden, wurden in eine Stammlösung aus Amilorid und Kontrolllösung gegeben. Die glucosefreie Lösung wurde entsprechend der Kontrolllösung hergestellt und die fehlende Glucose durch Mannitol ersetzt, welches kein Substrat des SGLT1 ist [44]. Amilorid wurde hier im Nachhinein hinzugegeben.

Die Kammerhälften wurden unmittelbar mit Einbringen des Gewebes von basolateral mit Kontrolllösung und von luminal mit 50µM Amiloridlösung perfundiert. Durch die Inhibition

des Na⁺-Kanals wurden Transportvorgänge über das Epithel vermindert, um eine Erholung nach der mechanischen Manipulation zu erreichen. Die Versuche starteten sobald sich das Gewebe in Potenzial und Widerstand stabilisiert hatte. Diese Anfangsphase dauerte ca. 5 bis 10min.

Um den Effekt des Inhibitors von ENaC (Amilorid) zu quantifizieren, wurde er für eine kurze Zeitspanne (ca. 3min) ausgewaschen und anschließend zu den meisten Testsubstanzen bis zum Ende des Versuches wieder hinzugegeben. Anschließend wurden die anderen Pharmaka für eine Dauer von 5-15min (in Abhängigkeit von der Kinetik der Testsubstanz) verabreicht und ausgewaschen. Die genauen Versuchsprotokolle sind im jeweiligen Ergebnisteil schematisch dargestellt.

Es wurde darauf geachtet, dass pro Gewebeseite maximal zwei Substanzen getestet wurden (und das nur, wenn der erste Effekt reversibel war), um Artefakte und Fehlinterpretationen zu vermeiden.

2.6 RNA-Isolierung und Real Time PCR

Um Herauszufinden, ob die Expressionsrate der untersuchten Transporter im Dickdarm der TG im Vergleich zu der in WT verändert war, wählten wir die semiquantitative Real Time PCR, mit deren Hilfe man auf die Transkriptionsrate eines Gens schließen kann. Die hierfür verwendeten Gewebeproben stammten aus Versuchstieren, die zuvor 7 Tage mit NND gefüttert worden waren.

2.6.1 RNA-Isolierung

Coecumgewebe wurde unmittelbar nach Tötung der Maus entnommen und bei -80°C konserviert. Die RNA-Isolierung wurde gemäß dem Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Tissues“ mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) durchgeführt. Die Konzentration der RNA in einer Probe wurde anschließend photometrisch gemessen („Nanodrop“, peqLab, Biotechnologie GmbH, Deutschland).

2.6.2 cDNA-Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgte entsprechend dem Kit „Quantitect, Reverse Transkriptase“ (Qiagen). Es wurden 2µg RNA eingesetzt.

2.6.3 Real Time PCR

Die Real Time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Neben einer Vervielfachung von Nukleinsäuren ermöglicht sie auch eine semiquantitative Erfassung der eingesetzten cDNA Menge, indem Fluoreszenz pro Verdopplungszyklus freigesetzt und gemessen wird.

Als Fluoreszenz-Donor wurden TaqMan-Sonden verwendet. Diese tragen an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (FAM). An ihrem 3'-Ende sind sie mit einem, die Fluoreszenz supprimierenden Quencher versehen. Im Laufe eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Im nächsten Schritt spaltet die Taq-Polymerase das 5'-Ende der Sonde und somit den Fluoreszenz-Donor während der einzelnen PCR-Zyklen ab. Die frei gewordene Fluoreszenz kann dann quantifiziert werden.

Es wurde der Thermocycler 7300 System SDS mit zugehöriger Software (Applied Biosystems) verwendet.

Temperaturprotokoll:

95°C	10 min	} 40 Zyklen
95°C	15 sec	
60°C	1 min	

Für jedes Gen wurde dann der Ct-Wert (engl.: *cycle treshold*) ermittelt, der den PCR-Zyklus angibt, bei dem die Steigerung der Fluoreszenzzunahme am steilsten und linear ist. Um die Transkriptionsrate der gesuchten Gene beurteilen zu können wurde sie mit den hoch konservierten und ubiquitär exprimierten „housekeeping-Genen“ HPRT1 und GAPDH verglichen. Dazu wurden die Ct-Werte des zu untersuchenden Gens zu denen der housekeeping-Gene ins Verhältnis gesetzt und das ΔCt ermittelt. Da die DNA-Menge pro Zyklus idealerweise verdoppelt wird, ist die relative Expressionsrate als $2^{\Delta Ct}$ angegeben.

2.7 Immunfluoreszenz

Die immunhistochemische Untersuchung ermöglicht das Anfärben von einzelnen Proteinen, indem man einen Antikörper nutzt, der eine hohe Affinität zu bestimmten antigenen Oberflächenstrukturen des gesuchten Proteins besitzt.

2.7.1 Organfixierung und Anfertigen der Schnittpräparate

Die Perfusionsfixierung wurde bei einem konstanten Druck von 200cmH₂O (ca. 150mmHg) mit 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS (engl.: *phosphat buffered saline*, PAA Laboratories GmbH) und PBS mit 1% Lidocain durchgeführt. Über einen Dreiwegehahn konnte luftblasenfrei zwischen der PFA-Lösung und der Spüllösung (1% Lidocain in PBS) gewechselt werden. Unter tiefer Narkose (5% Isofluran) wurde der Brustkorb der Maus eröffnet und eine Kanüle über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt. Das rechte Atrium wurde als Ablauf eröffnet. Nach Infusion von 5ml Spüllösung wurde das Gefäßsystem der Maus mit 20ml PFA-Lösung durchflutet. Nach der Organentnahme wurden die Gewebe zur weiteren Fixierung für 24h in 4%iger PFA-Lösung eingelegt. Zum Frostschutz wurden sie anschließend über Nacht in 20%ige Saccharose in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in kleine Förmchen aus Alufolie gegeben und diese samt Inhalt mit einem speziellen Frostmedium (Roth) gefüllt. Diese kleinen Pakete wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor Anfertigung der Schnittpräparate wurden die Gewebe zum Temperatúrausgleich für einige Minuten im -20°C kalten Cryostaten gelagert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe des Cryostats (Leica CM 3050) bei -20°C in 5µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger (OT) aufgebracht.

2.7.2 Färbung

Wir nutzten die Methode der indirekten Immunofluoreszenz, bei der zunächst ein Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein eingesetzt wird, der anschließend von einem, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper erkannt wird.

Die auf dem OT haftenden Präparate wurden nach dem Trocknen bei -20°C in einem Methanol/Aceton Gemisch (7/3) für 10min nachfixiert. Anschließend wurden die OT kurz unter fließendem Reinstwasser gespült und in einen Puffer mit 10mM Citronensäuremonophosphat (pH 6) überführt und in diesem für 5min sprudelnd gekocht (micromaxx, MM41580, Medion AG, Deutschland). Hierdurch wurden die Antigene durch Denaturierung der Proteine demaskiert. Anschließend wurden sie dreimal für 5-10min in PBS-T (0,3% (w/v) Triton in PBS) gewaschen. Danach wurden die beladenen OT mit den polyklonalen Primärantikörpern (s. Tab. 1) gegen das gesuchte Transporterprotein über Nacht in PBS-T mit 1% BSA (Bovines Serumalbumin, Merck) bei 4° C inkubiert.

Tab. 1: Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Wirtstier	Verdünnung	Markierung	Herkunft
Maus γ ENaC	Kaninchen	1:1500		AG Loffing, Zürich ¹
Maus TRPM4	Kaninchen	1:50		AG Flockerzi, Homburg ²
Kaninchen IgG	Ziege	1:400	Alexa 488	Invitrogen

¹ Der Antikörper wurde uns freundlicher Weise von der AG Loffing (Institut für Anatomie, Zürich) zur Verfügung gestellt.

² Der Antikörper wurde uns freundlicher Weise von der AG Flockerzi (Institut für Pharmakologie, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt. Zur Referenz siehe [66].

Nach Abwaschen der nicht gebundenen Primärantikörper mit PBS-T (3x, 5-10min) wurden die OT mit einem Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (s. Tab. 1) in PBS-T für 60min inkubiert. Erneutes Abwaschen der ungebundenen AK mit PBS-T (3x, 5-10min).

Die OT wurden anschließend mit je 2 Tropfen eines für die Fluoreszenzimmunhistochemie optimierten Eindeckmediums (Mowiol-Dapko-DAPI, Chemikalien & Anleitung von Roth, Deutschland) und 60x24mm Deckgläsern eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200M (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die AG Saftig, Institut für Biochemie, CAU Kiel) mit Hilfe des AxioVision Programms.

2.8 Statistik

Um die verschiedenen Effekte statistisch zu erfassen, wurde der Mittelwert \pm seines Standardfehlers zur Darstellung der Daten gewählt.

Mit Hilfe des Software-Programms Excel wurden die Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz hin geprüft. Dies erfolgte durch den zweiseitig gepaarten T-Test. Ein Ergebnis galt als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag. Signifikante Unterschiede bzgl. der Vergleichsgruppen wurden in den Abbildungen mit einem Stern (*) betont, eine signifikante Diät-differenz mit einem Paragraphen (§).

In den Ussing Kammer Versuchen galt der Widerstand in der stabilen Phase als Gütekriterium, da er sehr stark von der Unversehrtheit eines Gewebes abhängt. Betrag der $R_{te} < 20 \Omega \text{cm}^2$, war davon auszugehen, dass das Epithel bei der Präparation größeren Schaden genommen hatte und eine Messung nicht mehr aussagekräftig war. Gewebe mit einem initialen transepithelialen Widerstand von $< 20 \Omega \text{cm}^2$ wurden deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt.

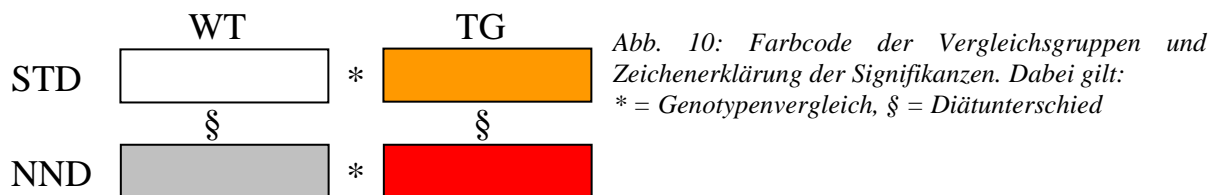
3 Ergebnisse

3.1 In vivo Versuche

Die Versuche dienten der quantitativen Erfassung wichtiger Stoffwechselfparameter, wie Wasser- und Nahrungsaufnahme und Ausscheidung von Urin und Kot. Außerdem wurden Elektrolytgehalt und Osmolalitäten bestimmt.

Für jeweils 24h wurden 8 WT (4 W, 4 M) und 12 TG (8 W, 4 M) in einzelnen metabolischen Käfigen gehalten. Die Versuchsgruppe unter NND wurde am letzten von 10 Diättagen eingesetzt. Hierbei handelte es sich um 7 WT (3 W, 4 M) und 11 TG (4 W, 7 M).

Abb. 10 verdeutlicht die Farbzuordnung der Vergleichsgruppen und die Zeichen für signifikante Unterschiede.



3.1.1 Nahrungsaufnahme und Ausscheidung

NND induzierte in den TG eine Steigerung von Flüssigkeitsaufnahme und Diurese

Hinsichtlich des Trinkverhaltens und des Urinzeitvolumens zeigten die WT keine signifikanten diätabhängigen Veränderungen (Tab. 2 zeigt Trinkmenge und Urinzeitvolumen). Im Gegensatz dazu führte eine NND bei den TG sowohl zu einer Erhöhung der Trinkmenge um 33% als auch zu einer Zunahme des Urinzeitvolumens um weitere 61% (s. Tab. 2).

Tab. 2: Trinkmenge und Urinzeitvolumen beider Genotypen in 24h: Die TG steigerten unter NND beide Parameter.

	STD			NND		
	Trinkmenge [µl/24h/gKG]	n	Urinzeitvolumen [µl/24h/gKG]	Trinkmenge [µl/24h/gKG]	n	Urinzeitvolumen [µl/24h/gKG]
WT	282±52	8	62±8	213±23	7	62±5
TG	253±27	12	73±7	337±40 §*	11	118±12 §*

Futtermenge und Kotmasse

Nach 24h im metabolischen Käfig zeigten die TG unter STD gegenüber den WT eine um 8mg/24h/gKG signifikant erhöhte Kotmasse (Feuchtgewicht), trotz ähnlichem Fressverhalten. Unter NND war das Stuhlgewicht zwischen den Genotypen nicht verschieden.

Bezüglich der Nahrungsaufnahme fiel auf, dass die TG ihre Fressmenge unter NND gegenüber der unter STD um 26% reduzierten. Obwohl beide Genotypen eine Reduktion der Fressmenge aufwiesen, war dieses Phänomen in den WT deutlich geringer ausgeprägt und nicht signifikant.

Die höhere Kotmasse der TG unter STD konnte also, wenn man den Diätenvergleich betrachtet, nur zum Teil auf das Fressverhalten zurückgeführt werden. Der Vergleich mit den WT wies also auf eine zusätzliche Ursache hin, die sich durch einen veränderten fäkalen Wassergehalt erklärte und in 3.1.4.1 näher erläutert wird. In Tab. 3 sind die Daten zu den beschriebenen Parametern aufgelistet.

Tab. 3: Futtermenge und Kotmasse von WT und TG in 24h unter beiden Diäten: Erhöhte Kotmasse der TG unter NND. Signifikante Reduktion von Futtermenge und Kotmasse der TG unter NND.

	STD				NND			
	Futtermenge		Kotmasse		Futtermenge		Kotmasse	
	[mg/24h/gKG]	n	[mg/24h/gKG]	n	[mg/24h/gKG]	n	[mg/24h/gKG]	n
WT	163±24	8	20±3	8	121±7	6	18±2	6
TG	206±20	12	28±2 *	12	149±13 §	9	20±2 §	9

3.1.2 Kreatinin-Clearance

Die glomeruläre Filtrationsrate war unabhängig von Diät und Genotyp

Die Clearance für das Stoffwechselprodukt Kreatinin (C_{Krea}) entspricht in etwa der GFR, da es in der Niere frei filtriert, aber nicht aktiv sezerniert, rückresorbiert oder verstoffwechselt wird. In allen vier Vergleichsgruppen war die C_{Krea} nicht signifikant voneinander verschieden. Ähnliches galt auch für die Plasmakonzentration des Stoffes Kreatinin. So konnte man darauf schließen, dass die TG keine glomeruläre Funktionseinschränkung aufwiesen (s. Tab. 4).

Tab. 4: Clearance und Plasmakonzentration des Stoffes Kreatinin: Keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

	STD				NND			
	Kreatinin _{Plasma}		C_{Krea}		Kreatinin _{Plasma}		C_{Krea}	
	[$\mu\text{mol/l}$]	n	[$\mu\text{l/min/gKG}$]	n	[$\mu\text{mol/l}$]	n	[$\mu\text{l/min/gKG}$]	n
WT	9,1±0,5	8	11,2±1,6	8	8,1±1,1	7	14,9±1,5	7
TG	8,1±0,4	11	13,2±1,2	12	10,1±1,3	9	13,8±2,0	9

3.1.3 Tubuläre Nierenparameter

3.1.3.1 Wasserbilanz

Das Harnkonzentrierungsvermögen der TG war nicht eingeschränkt

Die Freiwasser-Clearance (C_{H_2O}) ist das Wasservolumen, das die Niere einem sonst isotonen Harn entzogen hat (negativer Wert) oder zugefügt hat (positiver Wert). Beide Genotypen entwickelten negative Werte für die C_{H_2O} und somit einen hypertonen Harn. Zusätzlich wurde die C_{H_2O} in den TG durch eine NND sowohl im Diäten- als auch im Genotypenvergleich nahezu halbiert (s. Abb. 11a).

Passend dazu ließ sich ebenfalls eine verminderte Osmolyt-Clearance in den TG unter NND detektieren. Tab. 5 zeigt die Werte für C_{Osmo} .

Tab. 5: C_{Osmo} der Vergleichsgruppen: Signifikante Reduktion der Osmolyt-Clearance der TG unter NND.

	STD		NND	
	C_{Osmo} [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{gKG}$]	n	C_{Osmo} [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{gKG}$]	n
WT	285 \pm 36	7	389 \pm 76	7
TG	375 \pm 44	7	215 \pm 50 §*	7

Um eine Aussage über das Harnkonzentrierungsvermögen der Vergleichsgruppen machen zu können, wurde die C_{H_2O} (s. Abb.11a) als TC_{H_2O} (engl.: *tubular conservation of water*) mit der osmotischen Clearance in Bezug gesetzt [6].

Es zeigte sich eine ähnliche, lineare Beziehung dieser Werte in allen Gruppen (vgl. Abb.11b).

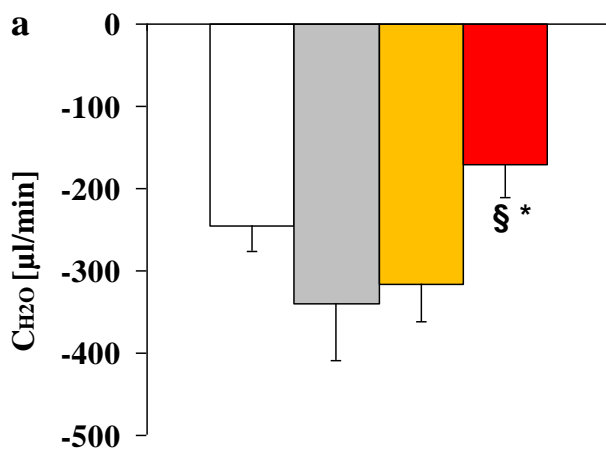


Abb. 11a: Freiwasser-Clearance: Eine NND reduzierte den Betrag der Freiwasser-Clearance in den TG.

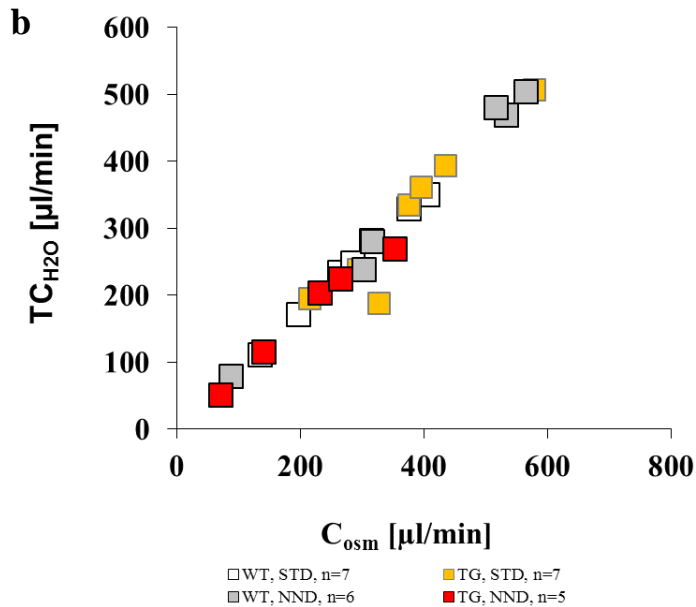


Abb. 11b: TC_{H₂O}: Alle vier Vergleichsgruppen zeigten ein ähnliches Harnkonzentrationsvermögen.

TG entwickelten eine erhöhte Harnstoffkonzentration im Plasma unter NND

Harnstoff als Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels wird über die Nieren ausgeschieden, dient aber auch der Harnkonzentrierung. Dazu wird er entlang der Henle Schleife kontrolliert rückresorbiert (s. 1.2.2.5), aber auch im Tubulus angereichert. Zusätzlich kann die Harnstoffproduktion abhängig vom Säure-/Basen-Status reguliert werden.

Die Plasmakonzentration von Harnstoff (Urea_{Plasma}) war in den TG unter NND um +4,7mmol/l signifikant gegenüber der STD und um +6mmol/l gegenüber den WT unter NND erhöht. Passend dazu sank die fraktionelle Ausscheidung (FE_{Urea}) unter NND in beiden Genotypen um 26% (WT) bzw. 20% (TG). Aufgrund der hohen Streuung war dieser Effekt aber nur in den TG signifikant (s. Tab. 6).

Tab. 6: Plasmakonzentration und fraktionelle Ausscheidung von Harnstoff: Die Plasmakonzentration war in den TG höher als in den WT, während beide Genotypen eine reduzierte FE_{Urea} aufwiesen.

	STD				NND			
	Urea _{Plasma} [mmol/l]	n	FE _{Urea} %	n	Urea _{Plasma} [mmol/l]	n	FE _{Urea} %	n
WT	11,8±1	8	59,4±9,7	8	10,6±0,9	6	33,6±6,8	6
TG	11,9±0,6	11	56,5±3,9	12	16,6±1,9 §*	8	36,1±3,7 §	9

TG zeigten einen Hkt-Anstieg

Bei diesen Daten handelt es sich um Kumulativdaten aus *in vivo* und *in vitro* Versuchen.

Der Hkt der TG war um ca. +2% bereits unter STD signifikant gegenüber dem der WT erhöht. Eine NND verstärkte dieses Phänomen noch deutlicher (s. Tab. 7).

Tab. 7: Hämatokrit: Erhöhung des Hkt in den TG unter beiden Diäten.

	STD		NND	
	Hkt [%]	n	Hkt [%]	n
WT	44,5±0,7	16	44,1±0,4	31
TG	46,2±0,6 *	18	47,7±0,4 §*	39

3.1.3.2 Plasma- und Urinosmolalität

Beide Vergleichsgruppen zeigten einen Anstieg der Plasmaosmolalität unter NND

Bei diesen Daten handelt es sich um Kumulativdaten aus *in vivo* und *in vitro* Versuchen.

Die Bestimmung der Plasmaosmolalitäten ergab, bei recht hoher Streuung, nur in den TG einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Diäten. Wie in Tab. 8 veranschaulicht, stieg die Plasmaosmolalität unter NND in beiden Vergleichsgruppen jedoch gleichermaßen um 10 bzw. 11mosm/kg an. Bezüglich der Harnosmolalität, als ein Maß für seine Konzentration, zeigten beide Genotypen keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 8: Osmolalitäten von Plasma und Urin: In beiden Genotypen kam es zu einer Erhöhung von P_{Osmo} , die nur in den TG signifikant war. U_{Osmo} zeigte keine signifikanten Unterschiede in beiden Genotypen.

	STD				NND			
	P_{Osmo} [mosm/l]	n	U_{Osmo} [mosm/l]	n	P_{Osmo} [mosm/l]	n	U_{Osmo} [mosm/l]	n
WT	308±3	14	2202±305	14	318±4	26	2506±274	21
TG	309±2	14	2737±444	12	320±4 §	27	2213±176	20

3.1.3.3 Na^+/Cl^- Homöostase

TG konnten eine orale Natrium-Restriktion renal nicht adäquat kompensieren

Aufgrund der forcierten oralen Wasseraufnahme unter NND (s. 3.1.1) konnten die TG die Na^+ -Aufnahme über das Trinken um 32% steigern, den verminderten Gehalt der Nahrung aber trotzdem nicht kompensieren. In den WT blieben die Trinkmenge und die dadurch bedingte Na^+ -Aufnahme unter NND unverändert (s. Tab. 9).

Tab. 9: Na^+ -Aufnahme über das Trinkwasser: TG steigerten Trinkmenge und die damit verbundene Na^+ -Aufnahme.

	STD		NND	
	[μ mol/24h/gKG]	n	[μ mol/24h/gKG]	n
WT	0,52±0,01	8	0,39±0,04	6
TG	0,47±0,05	12	0,62±0,07 §*	10

Unter NND war die Na^+ -Ausscheidung mit dem Urin entsprechend der verminderten Zufuhr in beiden Genotypen reduziert (vgl. Abb. 12a). Diese Reduktion war unter beiden Diäten in den TG schwächer ausgeprägt als in den WT. Der Unterschied von ca. $2\text{mmol}/24\text{h}/\text{gKG}$, der unter NND in den TG mehr ausgeschieden wurde, konnte durch die vermehrte Trinkmenge zu weniger als 10% kompensiert werden.

Der Cl^- -Metabolismus verhielt sich in beiden Genotypen ähnlich dem von Na^+ . So schieden die TG unter beiden Diäten deutlich mehr Cl^- aus als ihre Vergleichsgruppe (s. Abb. 12b).

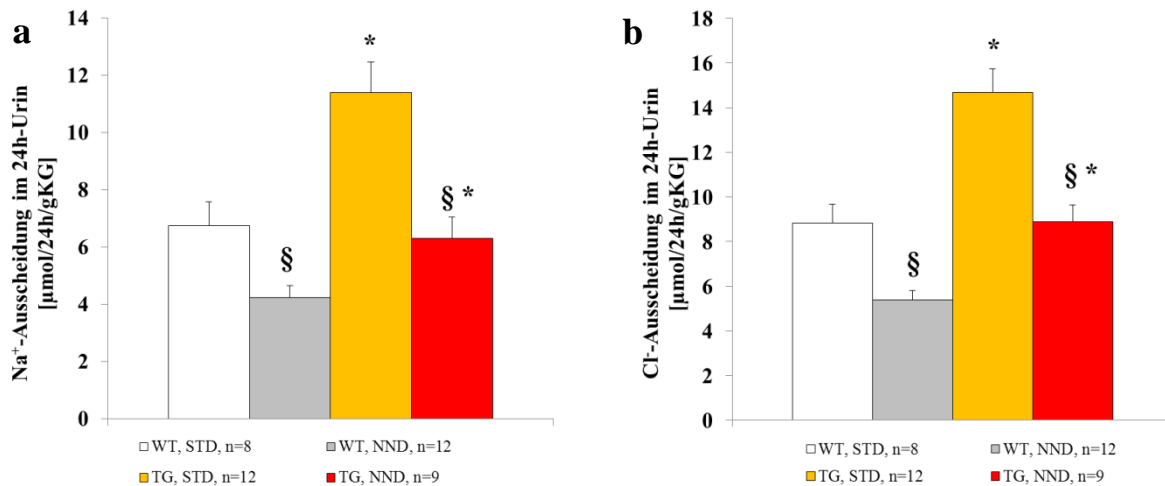


Abb.12a & b: Na^+ - und Cl^- -Ausscheidung in den Vergleichsgruppen: Unter beiden Diäten zeigten die TG einen gegenüber den WT signifikant erhöhten renalen Na^+/Cl^- -Verlust.

Die fraktionelle Na^+/Cl^- -Ausscheidung war unter NND in den WT kompensatorisch um ca. 60% gedrosselt. Die TG zeigten eine geringere tubuläre Na^+ -Rückgewinnung und konnten die orale Na^+ -Depletion nicht durch eine adäquate FE-Reduktion kompensieren (Abb. 13a & b).

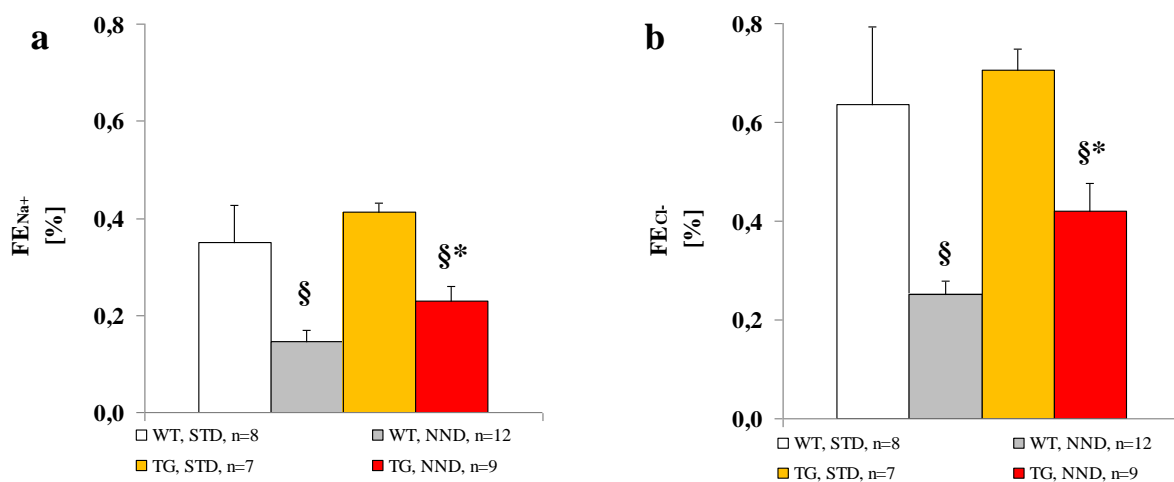


Abb. 13a & b: FE_{Na^+} und FE_{Cl^-} : In den WT kam es unter NND zu einer deutlichen Abnahme von FE_{Na^+} und FE_{Cl^-} . Diese Werte reduzierten sich auch in den TG, allerdings signifikant geringer als in den WT.

Unter Na^+ -Restriktion zeigten die TG erniedrigte Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen im Plasma

Die Plasmaelektrolytwerte waren zwischen den Genotypen unter STD nicht verschiedenen.

Unter NND zeigten sich die Nieren der TG jedoch nicht mehr in der Lage die Elektrolytverluste zu kompensieren und es entwickelte sich eine, im Vergleich zu den WT, signifikante Hyponatriämie sowie eine Hypochlorämie (s. Abb. 14a & b).

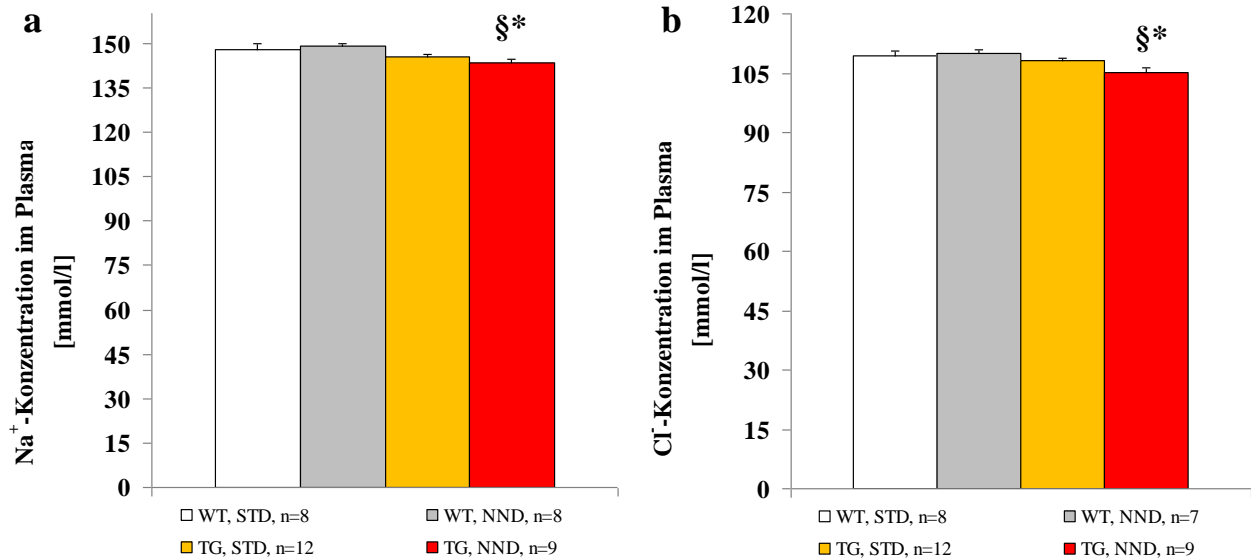


Abb. 14a & b: Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Na^+ und Cl^- : Die TG zeigten unter NND eine signifikant reduzierte Konzentration von Natrium und Chlorid im Plasma.

3.1.3.4 K^+ -Homöostase

Unter Na^+ -Restriktion stieg die K^+ -Konzentration im Plasma der TG

Der K^+ -Gehalt im Plasma unterschied sich unter STD zwischen den Vergleichsgruppen nicht.

Unter NND zeigten die TG jedoch eine relative Hyperkaliämie von +15%, die auch im Vergleich zu den WT signifikant erhöht war (s. Abb. 15a).

Die fraktionelle Kalium-Ausscheidung (FE_{K^+}) beider Genotypen reduzierte sich unter NND um ca. 10% gleichermaßen. Der Effekt war aber nur in den TG signifikant (s. Abb. 15b).

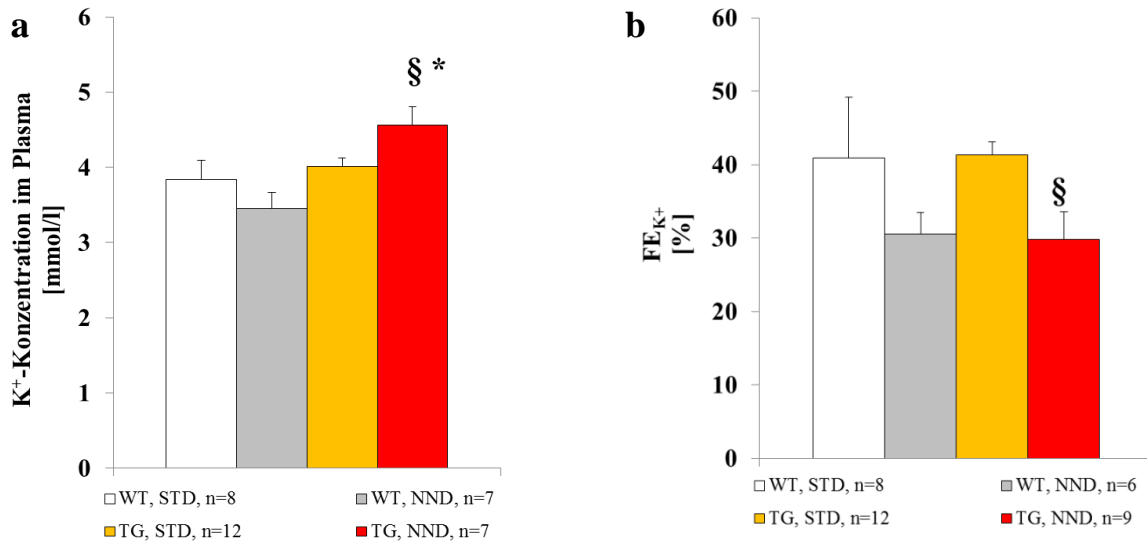


Abb. 15a: K⁺-Konzentration im Plasma: Unter NND entwickelten die TG eine relative Hyperkaliämie.
Abb. 15 b: Die FE_{K⁺} war in den TG unter NND signifikant erniedrigt.

3.1.3.5 Säure/Basen-Haushalt

Eine natriumarme Diät induzierte in beiden Genotypen eine Azidose

Unter STD zeigten beide Vergleichsgruppen einen ähnlichen pH-Wert des Blutes aus der V. cava. Nach NND sank der pH-Wert im venösen Vollblut beider Genotypen um etwa den gleichen Betrag von 0,07 (WT) bzw. 0,06 (TG) gegenüber der STD (s. Tab. 10).

Tab. 10: pH-Wert des Vollblutes: Unter NND entwickelten beide Genotypen eine Azidose.

	STD		NND	
	pH	n	pH	n
WT	7,35±0,02	8	7,28±0,02 §	6
TG	7,31±0,02	11	7,25±0,02 §	9

Die TG wiesen nach NND einen erniedrigten BE und eine höhere HCO₃⁻-Ausscheidung auf

Unter STD zeigten sich ähnliche Konzentrationen von HCO₃⁻ im Blut beider Genotypen. Eine NND induzierte im Vollblut der TG eine Verminderung des HCO₃⁻-Gehalts um 2,5mmol/l. In den WT konnte man keinen solchen Effekt beobachten (s. Abb. 16a).

Die renale Ausscheidung von HCO₃⁻ konnte aus dem, nach Henderson und Hasselbach errechneten, HCO₃⁻-Gehalt des Urins und dem Urinzeitvolumen bestimmt werden. Während die WT unter NND den renalen Verlust der Pufferbase um 34,6% reduzieren konnten, zeigten die TG keinen Unterschied zwischen den Diäten (s. Abb. 16b).

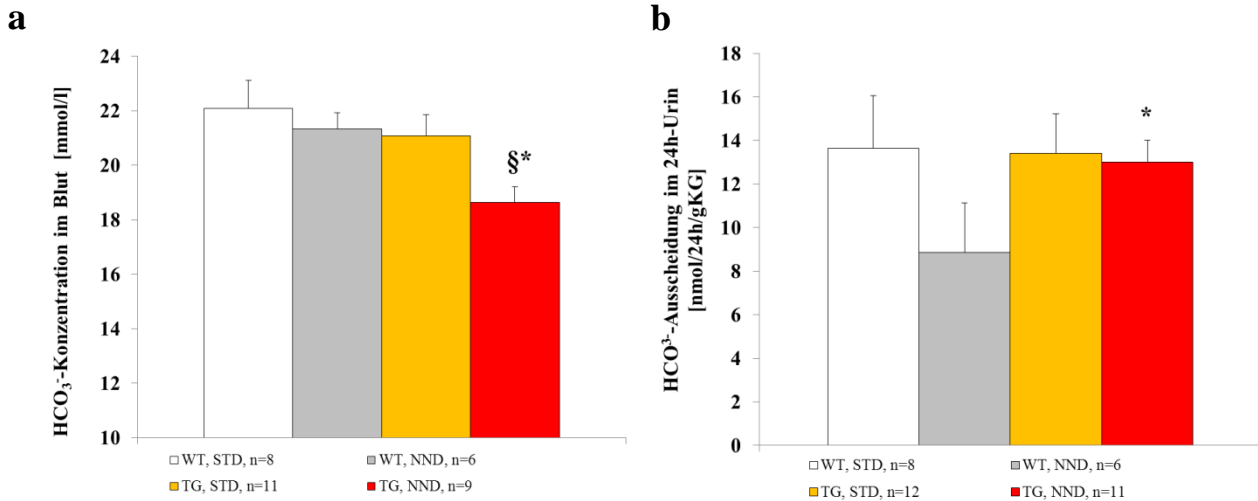


Abb. 16a & b: Bikarbonatkonzentration im Blut und seine renale Ausscheidung: Unter NND reduzierte sich der HCO_3^- -Gehalt im Blut der TG drastisch. Passend dazu zeigten sie einen erhöhten renalen HCO_3^- -Verlust.

Die TG entwickelten also unter NND aufgrund des HCO_3^- -Verlustes eine metabolische Azidose. Diese Tatsache wurde auch durch den Basenexzess (BE) belegt, der in den TG im Vergleich zur STD um $-4,3\text{mmol/l}$ abgefallen war. Die WT wiesen keine signifikanten Abweichungen diesbezüglich auf (s. Tab. 11).

Tab. 11: Basenexzess: Unter NND kam es in den TG zu einer deutlichen negativen Basenabweichung, während sich bei den WT keine signifikanten Veränderungen zeigten.

	STD		NND	
	[mmol/l]	n	[mmol/l]	n
WT	$-3,1 \pm 1,4$	8	$-6,1 \pm 0,8$	6
TG	$-5,3 \pm 1,1$	11	$-9,6 \pm 1,1$ §*	9

3.1.4 Gastrointestinale Stoffwechselfparameter

3.1.4.1 Wasser-Homöostase

Eine NND induzierte eine Reduktion der gastrointestinalen Flüssigkeitsausscheidung der TG. Wie in 3.1.1 beschrieben war die Kotmasse der TG unter STD gegenüber der der WT und der unter NND erhöht. Zum Teil ließ sich dieses Phänomen auf die unter NND reduzierte Fressmenge zurückführen. Da diese Tendenz in den WT schwächer ausgeprägt und der Kot der TG unter NND deutlich trockener war, wurde der Wassergehalt ermittelt. Interessanterweise war der Gewichtsunterschied des Kots nach dem Trocknen halbiert (s. Abb. 17a).

Das erhöhte Kotgewicht der TG unter STD war also auch durch einen erhöhten Wassergehalt bedingt. Unter NND war dieser Effekt nicht vorhanden. Während die Diäten also keinen Einfluss auf die Stuhlmasse der WT hatten, zeigten die TG unter STD eine, sowohl im Diäten-, als auch im Genotypenvergleich, signifikante Erhöhung. Außerdem fiel eine signifikante Reduktion des Wassergehaltes des Kots der TG unter NND verglichen mit der STD auf.

So kann die im Verhältnis erniedrigte Kotmasse der TG unter NND neben der Nahrungsaufnahme auf eine forcierte Rückresorption von Wasser im Gastrointestinaltrakt zurückgeführt werden (s. Abb. 17b).

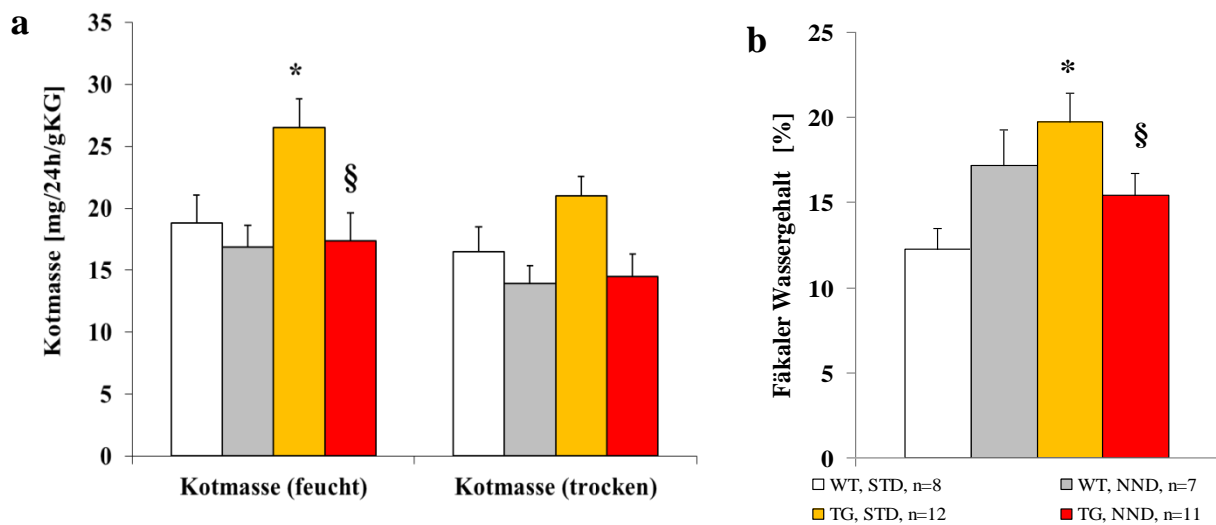


Abb. 17a: Kotgewicht vor und nach Trocknung: Die TG zeigten unter STD eine deutlich erhöhte Kotmasse.
Abb. 17b: Der fäkale Wassergehalt war in den TG unter NND reduziert.

3.1.4.2 Intestinale Homöostase der Elektrolyte Na⁺ und K⁺

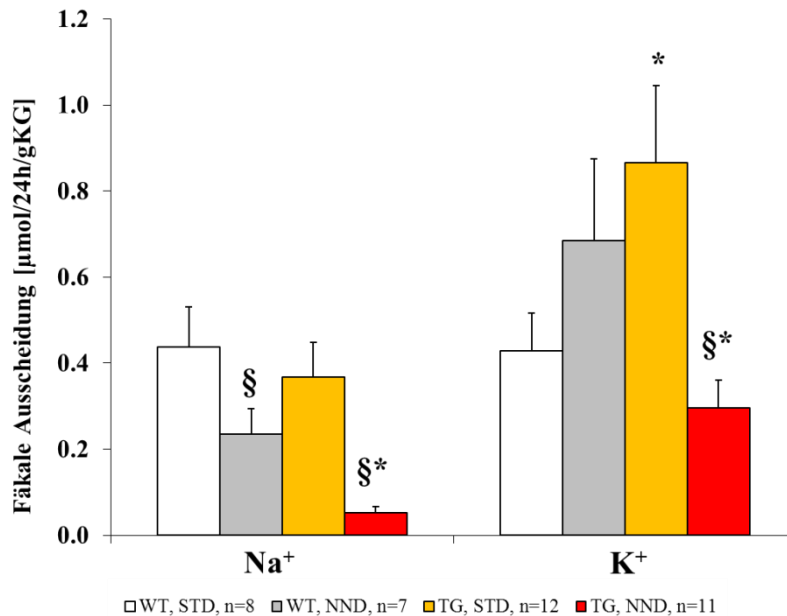
TG reduzierten die fäkale Na⁺-Ausscheidung unter NND drastisch

Die Versuche im metabolischen Käfig verdeutlichten, dass die TG unter NND ihre fäkale Na⁺-Ausscheidung im Diät- und Kontrolltierversgleich drastisch reduzierten. Abb. 18 zeigt den Anteil wichtiger Elektrolyte im Kot der Mäuse. Dieser diente als Maß für die jeweilige fäkale Ausscheidung (FA).

Die FA_{Na⁺} war in den WT unter STD gegenüber der der TG nur marginal um 0,07 μmol/24h höher. Eine Verabreichung der NND führte in beiden Genotypen zu einer Reduktion. Diese war allerdings in den TG 4fach stärker ausgeprägt als in den WT (s. Abb. 18 links).

Unter NND kam es in TG zu einer verstärkten gastrointestinalen Resorption von Kalium

Der fäkale K^+ -Verlust der TG war unter STD gegenüber dem der WT unter gleichen Bedingungen verdoppelt (s. Abb. 18 rechts). Interessanterweise war der fäkale K^+ -Anteil der TG unter NND als Zeichen einer gesteigerten Resorption gegenüber dem Vorwert um 66% gefallen und somit nun niedriger als der K^+ -Anteil im Kot der WT unter NND. Die WT wiesen diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen auf.



*Abb. 18:
Unter NND reduzierten die TG die fäkale Na^+ -Ausscheidung um den Faktor 7,4 und die WT um den Faktor 1,8.*

Die K^+ -Ausscheidung der TG war unter STD erhöht und sank unter NND um ein ähnliches Ausmaß wie der Na^+ -Wert.

3.1.5 Bilanz der Elektrolyte Na^+ und K^+

Die Bilanz eines Elektrolyts errechnete sich aus seiner gesamten oralen Aufnahme (über Wasser und Futter) und seine Ausscheidung mit dem Kot und dem Urin über 24h.

Beide Genotypen entwickelten eine negative Natrium-Bilanz unter NND

Die Na^+ -Bilanz zeigte keine Unterschiede zwischen den Genvarianten. Beide antworteten auf die NND mit einer negativen Na^+ -Bilanz, da die Ausscheidung deutlich über der (geringen) Aufnahme lag (s. Abb. 19). Wie diese Abbildung weiter zeigt, brachte die erhöhte Trinkmenge der TG unter NND nur einen geringen Na^+ -Zugewinn (graue Säule).

Die gesamte Na^+ -Ausscheidung war in beiden Genotypen unter NND entsprechend der geringen Aufnahme reduziert (s. Abb. 19).

Zusätzlich zeigt die Abbildung, dass die Rückgewinnung in den WT hauptsächlich renal erfolgte, während die TG eine deutliche Reduktion des fäkalen Na^+ -Verlustes aufwiesen. Dies

machte im Verhältnis zum gesamten Haushalt nur einen geringen Anteil aus, war aber gegenüber den WT deutlich signifikant verändert (s. Abb. 19, schwarzweiße Säulen).

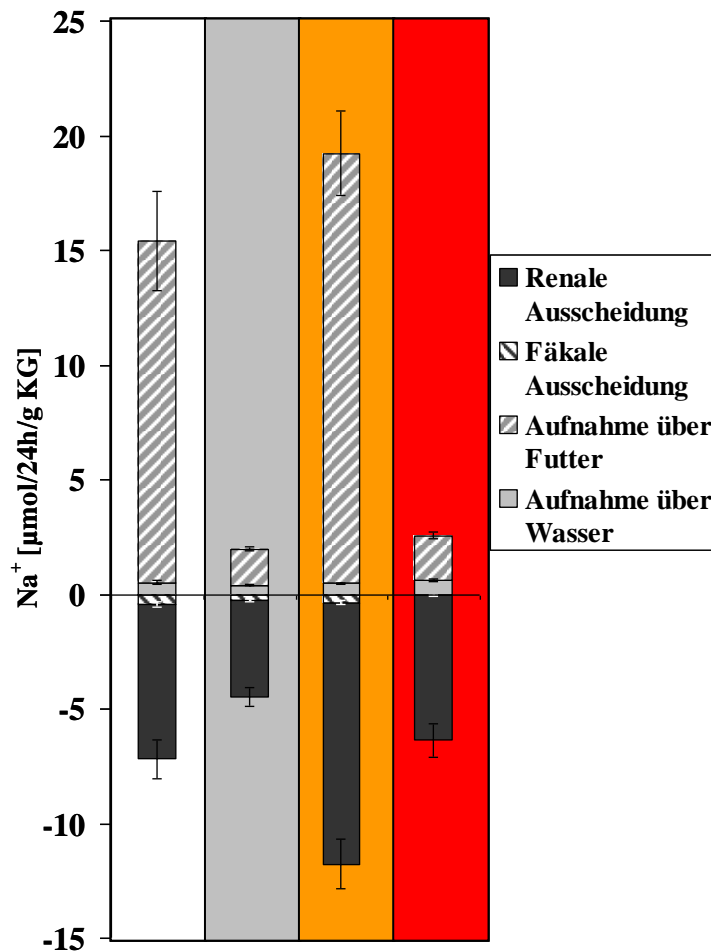


Abb. 19: Die gesamte Na⁺-Aufnahme und seine Ausscheidung: Die Säulen im positiven Bereich zeigen die Aufnahme, die in Futter- (grauweiße Säulen) und Wasseraufnahme (graue Säulen) unterteilt ist.

Die Säulen im negativen Bereich veranschaulichen die Ausscheidung, aufgeteilt in renalen (schwarze Säulen) und fäkalen (schwarzweiße Säulen) Anteil.

Die Na⁺-Bilanz wurde unter NND in beiden Genotypen negativ. Die WT kompensierten den Verlust eher renal bei nur leicht verminderter fäkaler Na⁺-Ausscheidung. Die TG hingegen zeigten geringere renale Na⁺-Rückgewinnungsmechanismen, reduzierten aber den fäkalen Verlust sichtlich.

In den TG kam es unter NND zu einer K⁺-Retention

Beide Genotypen entwickelten unter NND eine Verminderung der, aber weiterhin positiven, K⁺-Bilanz. Dieser Unterschied war in den TG signifikant. Wie Abb. 20 zeigt, war er vor allem auf eine erniedrigte K⁺-Aufnahme - passend zu der generell reduzierten Fressmenge - bei fast gleich bleibender Ausscheidung zurückzuführen.

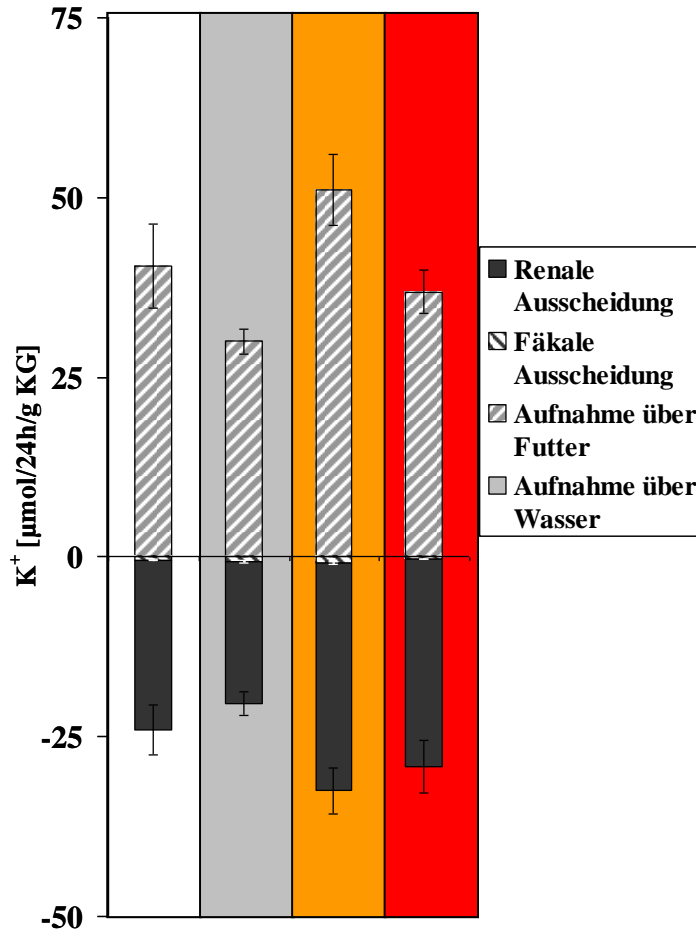


Abb.20: Die gesamte K^+ -Aufnahme und seine Ausscheidung: Die Säulen im positiven Bereich zeigen die Aufnahme, die in Futter- (grauweiße Säulen) und Wasseraufnahme (graue Säulen) unterteilt ist.

Die Säulen im negativen Bereich veranschaulichen die Ausscheidung, aufgeteilt in renalen (schwarze Säulen) und fäkalen (schwarzweiße Säulen) Anteil.

Trotz der verminderten Aufnahme blieb die K^+ -Bilanz in beiden Genotypen positiv.

3.2 In vitro Versuche

Mit Hilfe der Ussing Kammer Messtechnik wurden verschiedene Transportprozesse über zwei verschiedene Dickdarmabschnitte untersucht. Mittels pharmakologischer Inhibitionsversuche unter STD und NND in beiden Genotypen sollte herausgefunden werden, welche Mechanismen an der starken Reduktion der fäkalen Na^+ -Ausscheidung der TG unter NND beteiligt waren. Die Fütterung mit NND erfolgte für diese Versuche über 7 Tage.

3.2.1 Inhibitionsversuche mit Amilorid

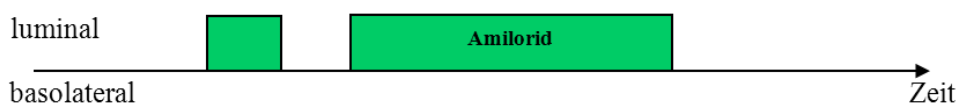


Abb. 21: Schematische Abbildung des zeitlichen Versuchdesigns zum Amilorid abhängigen Kurzschlussstrom

In Abb. 21 ist der zeitliche Verlauf eines Versuches zur Erfassung des Amilorid-abhängigen Kurzschlussstroms (ΔI_{scAmil}) im Kolon schematisch dargestellt: Nach einer kurzen

Erholungsphase unmittelbar nach dem Einspannen des Gewebes wurde Amilorid ($50\mu\text{M}$) luminal eingewaschen und nach ca. 2-3min wieder mit Kontrolllösung ausgewaschen. Für anschließende Versuche mit anderen Testsubstanzen wurde es dann wieder appliziert.

In Abb. 22 sind Schreiberaufzeichnungen dargestellt: In Teilabbildung a) für das distale Kolon und in Teilabbildung b) für das Coecum. Das Gewebe der WT (li.) ist grau hinterlegt und das der TG (re.) rot.

Deutlich ist die unmittelbare Amilorid-Wirkung durch die sofortige Abnahme des Betrags des lumennegativen V_{te} zu sehen. Auffällig ist, dass sowohl das Amilorid-abhängige als auch das Amilorid-unabhängige V_{te} in beiden Geweben der TG negativer als in den WT war.

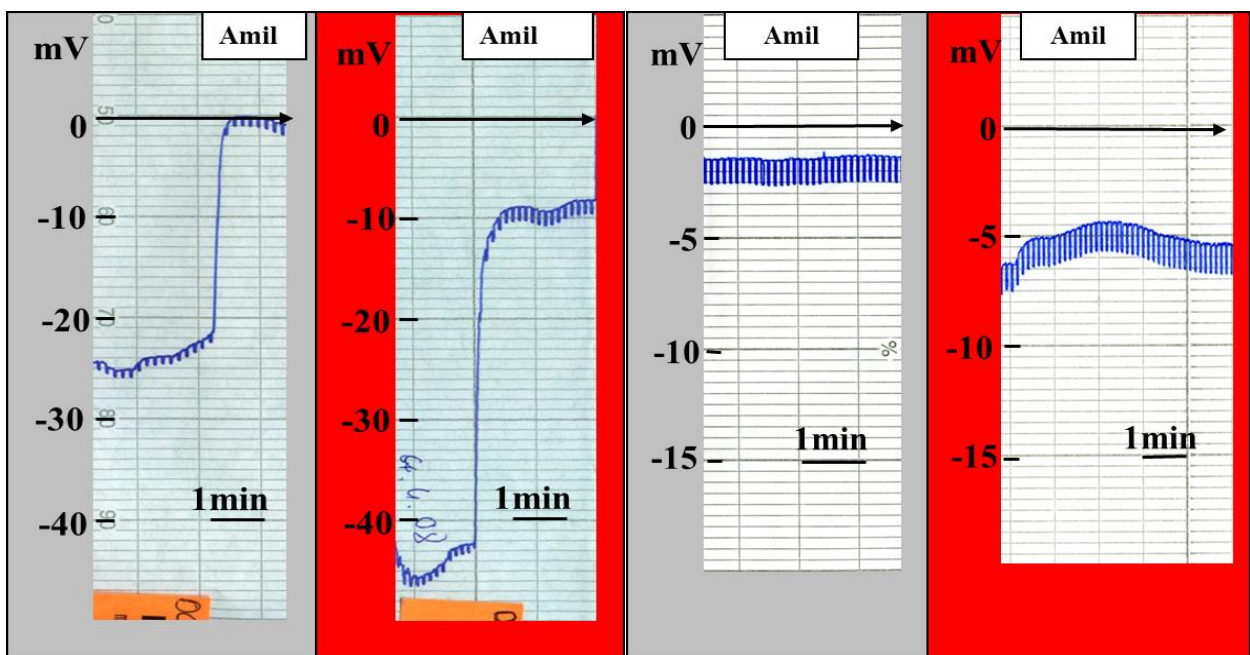


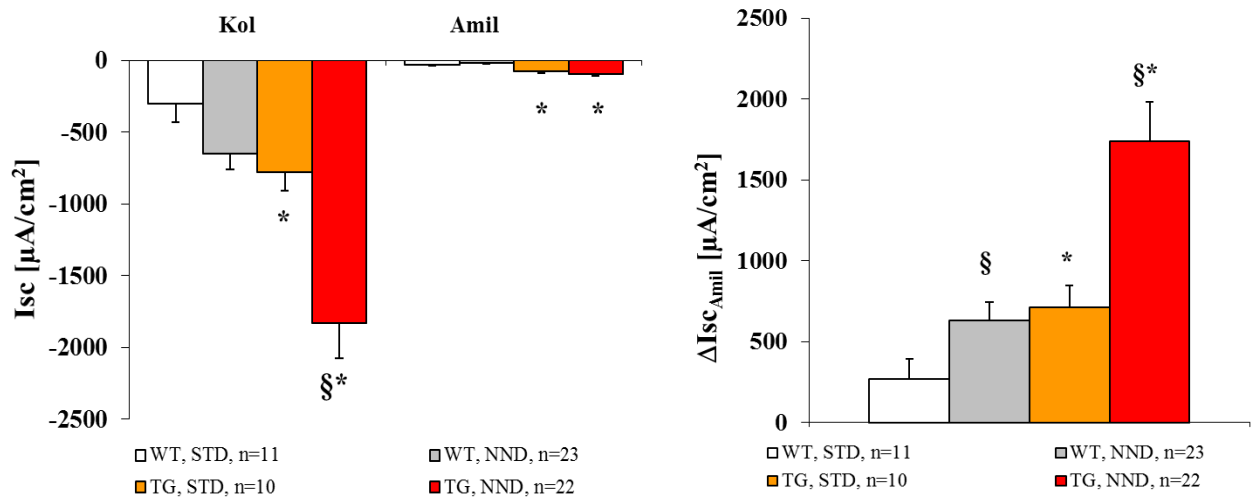
Abb. 22a: Dist. Kolon: Im Gegensatz zu den WT (li.) blieb nach Amilorid-Gabe ein lumennegatives Restpotenzial im Kolon der TG (re.) bestehen. Abb. 22b: Coecum: Auch hier fließt im Gewebe der TG (re) ein lumennegativer „Reststrom“ nach Hemmung von ENaC.

Zur besseren Veranschaulichung von I_{sc} -Entwicklung und ΔI_{sc} sind diese Parameter für das distale Kolon in einem Säulendiagramm (Abb. 23) dargestellt. Für die folgenden Versuchsreihen wird ΔI_{sc} zusammen mit ΔV_{te} und ΔR_{te} zur kompakteren Übersicht in Tabellenform dargestellt.

Abb. 23a zeigt die Amilorid-abhängige I_{sc} -Entwicklung im distalen Kolon. Der Amilorid-abhängige I_{sc} im distalen Kolon war in den TG unter STD etwa 2,5-fach gegenüber dem der WT erhöht. Eine NND verstärkte diesen Effekt um nochmal den gleichen Faktor.

Interessanter Weise war der I_{sc} zusätzlich auch nach Hemmung von ENaC in den TG 6mal höher als in den WT, in denen es sogar zu einer Reduktion des Amilorid-unabhängigen I_{sc} gekommen war (s. Abb. 23a). Im distalen Kolon der TG verursachte eine NND eine Steigerung dieses „Reststroms“ um weitere 26%.

In Abb. 23b ist die, aus dem I_{sc} nach luminaler Gabe von Kontrolllösung (I_{scKol}) und dem nach Amilorid-Gabe (I_{scAmil}) errechnete Kurzschlussstromdifferenz dargestellt (ΔI_{scAmil}). ΔI_{sc} veranschaulicht, dass sich der Amilorid-abhängige Strom im distalen Kolon der WT durch eine NND ebenfalls leicht erhöhen ließ, allerdings weitaus geringer als in den TG, in denen es zu einer Steigerung des ΔI_{scAmil} um 245% gegenüber der STD kam (s. Abb. 23b).



23a: I_{sc} im distalen Kolon: Die TG zeigten einen deutlich stärkeren Effekt als die WT unter beiden Diäten. Auch der Amilorid-unabhängige Betrag von I_{sc} war in den TG deutlich erhöht.

23b: ΔI_{scAmil} im distalen Kolon: Unter beiden Diäten wiesen die TG deutlich höhere Werte auf.

Wie bereits in Abb. 22 b veranschaulicht, ließ sich im Coecum der TG ebenfalls eine ENaC-Aktivität nachweisen. Bereits unter STD war in den TG ein kleiner Amilorid-hemmbarer Strom in diesem Kolonabschnitt nachweisbar, der ca. 20mal kleiner war als im distalen Kolon. Tab. 12 zeigt, dass dieser Strom in den TG doppelt so hoch war wie in den WT. Dieses Phänomen konnte durch eine NND noch leicht gesteigert werden. Die TG wiesen zudem eine Veränderung von ΔV_{te} und ΔR_{te} auf. Im Gegensatz dazu war, bei einer hohen Streuung, keine Veränderung dieser Parameter in den WT vorhanden (s. Tab. 12).

Tab. 12: Wirkung von Amilorid auf V_{te} , R_{te} und I_{sc} im Coecum: TG zeigten einen signifikanten Amilorid-abhängigen Effekt. WT zeigten diesbezüglich keine Reaktion.

	STD				NND			
	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n
WT	0,72±0,15	-0,56±0,5	13,0±3,9	35	0,7±0,2	1,1±0,45	15,4±5,3	38
TG	1,38±0,19*	1,81±0,45*	30,1±3,8*	37	1,32±0,15*	2,41±0,53	37,9±4,5*	41

Weiter fand sich auch im Coecum der TG ein signifikant negativer I_{sc} unter der Hemmung von ENaC. In Abb. 22b weist das noch deutlich negative V_{te} unter Amilorid darauf hin.

Wie Tab. 13 zeigt, war dieser Amilorid-unabhängige I_{sc} unter NND im Coecum der TG knapp $18\mu\text{A}/\text{cm}^2$ höher als im Coecum der WT unter gleichen Bedingungen. Die Diät bewirkte eine stärkere Negativierung des I_{sc} um weitere 26% in den WT und um weitere 42% in den TG.

Tab. 13 V_{te} , R_{te} und I_{sc} im Coecum unter Hemmung von ENaC.

	STD				NND			
	V_{te} [mV]	R_{te} [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	I_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n	V_{te} [mV]	R_{te} [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	I_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	$-3,37\pm 0,29$	$53,8\pm 2,3$	$-61,8\pm 4,2$	35	$-3,4\pm 0,3$	$43,8\pm 5,8\text{\$}$	$-78,1\pm 6,8\text{\$}$	38
TG	$-4,27\pm 0,3^*$	$53,9\pm 2,3$	$-79,7\pm 4,7^*$	37	$-4,8\pm 0,3^*$	$44,7\pm 2,0\text{\$}$	$-113\pm 7\text{\*	41

Im Coecum und im distalen Kolon lagen offensichtlich weitere elektrogene Transportmechanismen vor, die durch die NND aktiviert werden konnten.

3.2.2 Inhibition der neuromuskulären Aktivität mit TTX

Um den Mechanismus hinter dem Amilorid-unabhängigen Strom weiter zu charakterisieren, wurden zusätzliche pharmakologische Inhibitionsversuche in der Ussing Kammer durchgeführt. Als Referenzgewebe wurde das Coecum verwendet, da der Diäteneffekt hier deutlicher ausgeprägt war. Die Tunica muscularis wurde aus präparationstechnischen Gründen am Coecum belassen.

Um herauszufinden, ob die beobachteten Effekte ihren Ursprung in transepithelialen Transportprozessen hatten, oder ob sie Artefakte von muskulärer Aktivität darstellten, wurde eine Versuchsreihe unter Inhibition neuronaler Na^+ -Kanäle mittels TTX (Tetrodotoxin) durchgeführt. In diesen Versuchen wurde zunächst Kontrolllösung (luminal mit Amilorid, $50\mu\text{M}$) appliziert und nach ca. 7min TTX ($1\mu\text{M}$) basolateral hinzugefügt. Die Applikation dieser Testsubstanz zeigte in beiden Genotypen keine signifikanten Effekte auf die gemessenen Parameter. TTX hatte auch keinen Einfluss auf die Effekte des ENaC-Inhibitors Amilorid. Tab. 14 zeigt die TTX-abhängigen Differenzen von ΔV_{te} , ΔR_{te} und ΔI_{sc} unter gleichzeitiger ENaC-Inhibition.

Tab. 14: Differenz der transepithelialen Parameter nach TTX-Applikation (unter luminaler Amilorid Gabe) unter NND

	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	$0,34\pm 0,09$	$-0,7\pm 0,6$	$8,23\pm 4,23$	6
TG	$0,1\pm 0,1$	$0,47\pm 0,47$	$9,57\pm 6,8$	6

Um die Mechanismen, die den ENaC-unabhängigen Strom im Coecum der TG verursachten, näher zu charakterisieren, untersuchten wir verschiedene elektrogene luminale Na^+ -Resorptionswege der Epithelzellen im Coecum.

3.2.3 Inhibition von NCX

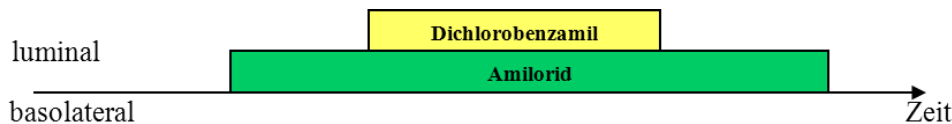


Abb. 24: Schematische Abbildung des Versuchsdesigns zur Erfassung des NCX- abhängigen Kurzschlussstroms.

In Abb. 24 ist der zeitliche Verlauf des Versuches zur Erfassung des Dichlorobenzamil-abhängigen Kurzschlussstroms im Coecum schematisch dargestellt: Die basolaterale Kammerhälfte wurde mit Kontrolllösung und die luminale Seite mit $50\mu\text{M}$ Amilorid perfundiert. Sobald Potenzial und Widerstand des Gewebes unter luminaler Amilorid-Gabe ein konstantes Level erreicht hatten (nach ca. 5min), wurde die luminale Kammerhälfte für 5-7min mit Dichlorobenzamil ($50\mu\text{M}$) in Kontrolllösung mit Amilorid perfundiert.

Dichlorobenzamil ist ein Inhibitor des elektrogenen $3\text{Na}^+/2\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger (NCX), welcher als potenzieller Kandidat für den Amilorid-unabhängigen Strom galt. Durch die luminale Inhibition ergaben sich jedoch in beiden Genotypen keine Veränderungen von ΔV_{te} , ΔR_{te} oder ΔI_{sc} , wie Tab. 15 zeigt.

Tab. 15: Δ Dichlorobenzamil unter NND: Kein signifikanter Effekt messbar.

	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	$0,38 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,45$	$9,18 \pm 1,39$	7
TG	$0,31 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,39$	$8,47 \pm 0,94$	6

3.2.4 Induktion des Na^+ -gekoppelten Fettsäuretransports

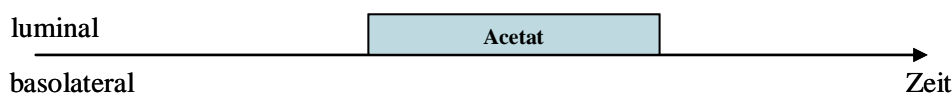


Abb. 25: Schema des Versuchsdesigns zur Erfassung des slc5a8- abhängigen Kurzschlussstroms.

Analog den vorher beschriebenen Versuchen ist der zeitliche Versuchsablauf zur Untersuchung des Acetat-abhängigen I_{sc} in Abb. 25 dargestellt. Die Untersuchung des Na^+ -/Fettsäuren-Cotransporters (in der Literatur im Dickdarm als slc5a8 benannt) erfolgte, nach

einer kurzen Erholungsphase für das Gewebe nach dem Einspannen, mittels Induktion durch die luminale Gabe der Fettsäure Acetat (50mM).

Wie in Abb. 26 gezeigt, löste Acetat einen 2-gipfligen Effekt aus, der in beiden Genotypen ähnlich war und den erhöhten I_{sc} im Coecum der TG (re.) nicht unterdrückte.

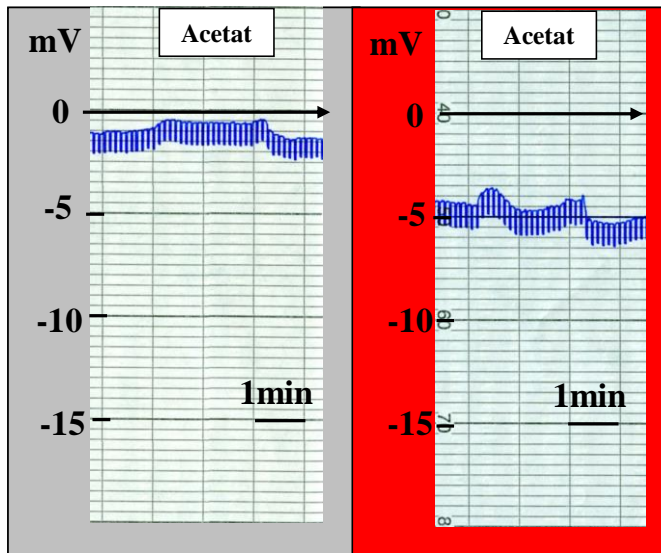


Abb. 26: Auszug aus einem Schreiberpapier: Die luminale Gabe von 50mM Acetat zeigt einen 2-gipfligen Effekt, der in beiden Genotypen ähnlich war und keinen Einfluss auf das erhöhte lumennegative Potenzial der TG hatte.

Bei hoher Streuung kam es durch die luminale Acetat-Gabe in beiden Genotypen zu einem ähnlichen Effekt, der die gemessenen Parameter ΔV_{te} , ΔR_{te} und ΔI_{sc} in vergleichbarer Weise beeinflusste (s. Tab.16).

Tab. 16: Δ Acetat unter NND: Ähnliche Effekte in beiden Genotypen

	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	$3,88 \pm 0,58$	$-28,7 \pm 4,5$	138 ± 19	4
TG	$5,43 \pm 1,14$	$-16,7 \pm 10,2$	100 ± 68	4

3.2.5 Inhibition von TRPM4

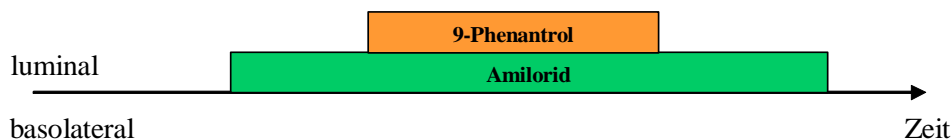


Abb. 27: Schema des Versuchsdesigns zur Erfassung des TRPM4-abhängigen Kurzschlussstroms.

Abb. 27 zeigt den zeitlichen Versuchsverlauf: Nachdem sich das Gewebe unter ENaC-Inhibition durch luminale Gabe von Amilorid hinsichtlich I_{sc} , V_{te} und R_{te} stabilisiert hatte, wurde die luminale Kammerhälfte mit 9-Phenantrol (100 μM) in 50 μM Amilorid für ca. 2-3min perfundiert. Es wurden distales Kolon und Coecum untersucht.

Abb. 28 zeigt Schreiberaufzeichnungen von Coecumgewebe. Die Abnahme im Betrag von V_{te} im Coecum der TG (re.) durch die Gabe von 9-Phenanol wies auf eine Beteiligung von TRPM4 an dem lumennegativen, Amilorid-unabhängigen Potenzial hin, da sie signifikant höher gegenüber den WT war.

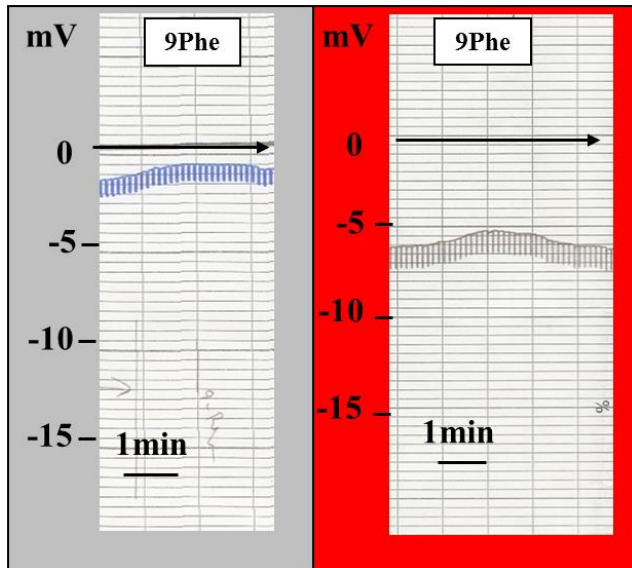


Abb. 28: Auszug aus einem Schreiberpapier: Die lumenale Gabe von 9-Phenanol bewirkte eine Abnahme von V_{te} im Coecum der TG (re.). Der hier zu sehende minimale Effekt in den WT war signifikant geringer als in den TG.

Im distalen Abschnitt des Kolons beider Genotypen bewirkte die Inhibition von TRPM4 durch 9-Phenanol unter STD keine deutliche Veränderung von I_{sc} , R_{te} und V_{te} . Unter NND hingegen zeigte sich in den WT im Vergleich zur STD eine leichte, aber signifikante Erhöhung des ΔI_{sc} (ΔI_{sc} : $+7,2 \mu A/cm^2$ §). In den TG war diese Steigerung noch deutlicher ausgeprägt (ΔI_{sc} : $+11,8 \mu A/cm^2$ §*) und gegenüber den WT signifikant erhöht (s. Tab. 17).

Tab. 17: Änderung von V_{te} , R_{te} und I_{sc} im distalen Kolon durch Inhibition von TRPM4.

	STD				NND			
	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n
WT	$-0,02 \pm 0,25$	$4,1 \pm 4,2$	$2,1 \pm 2,3$	11	$0,4 \pm 0,1$	$-0,1 \pm 0,87$	$9,81 \pm 3,2$ §	11
TG	$0,7 \pm 0,3^*$	$4,4 \pm 4,6$	$8,5 \pm 4,9$	10	$1 \pm 0,25^*$	$2,3 \pm 0,8^*$	$20,3 \pm 4,6$ §*	11

Die Untersuchung des Coecumgewebes (Abb. 28) zeigte in den Vergleichsgruppen qualitativ ähnliche Ergebnisse, wie im distalen Kolon. Allerdings war ΔI_{sc} hier in den TG sowohl unter STD als auch unter NND signifikant gegenüber den WT erhöht. Eine weitere, signifikante Steigerung dieses Effektes konnte in beiden Genotypen durch eine NND induziert (ΔI_{sc} im Ditävergleich: NND: TG: $+5,5 \mu A/cm^2$; WT: $+5,3 \mu A/cm^2$) werden (s. Tab. 18). TRPM4 war also auch im Coecum an der Ausbildung des lumennegativen Stroms beteiligt.

Tab. 18: ΔV_{te} , ΔR_{te} und ΔI_{sc} im Coecum durch Inhibition von TRPM4: Die TG zeigten unter beiden Diäten eine höhere Kurzschlussstromdifferenz.

	STD				NND			
	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	0,1±0,1	0,06±0,4	3,1±2	14	0,3±0,06	0,4±0,45	8,4±1,6§	14
TG	0,5±0,1	-0,04±0,5	9,8±2,4*	15	0,6±0,06*	0,8±0,4	15,3±1,9§*	17

3.2.6 Inhibition des Na^+ -abhängigen Glukosetransports

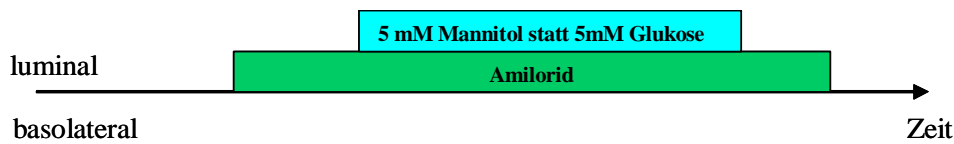


Abb. 29: Schema des Versuchsdesigns zur Erfassung des SGLT1-abhängigen Kurzschlussstroms.

Der Na^+ -abhängige Glukosetransport wurde im Epithel vom Coecum beider Genotypen untersucht, indem die Glukose in der Kontrolllösung durch die gleiche Konzentration (5mM) Mannitol ersetzt wurde. Der Versuchsaufbau war analog den vorher beschriebenen Versuchen gestaltet (s. Abb. 29). Auch in dieser Messung wurde der Effekt in Anwesenheit von Amilorid gemessen.

In Abb. 30 ist ein Schreiberauszug abgebildet. Der luminale Ersatz von Glukose durch Mannitol zeigte im Coecum der TG (re.) eine Reduktion im Betrag von V_{te} , die reversibel war. Im Coecum der WT (li.) war ein solcher Effekt nicht erkennbar.

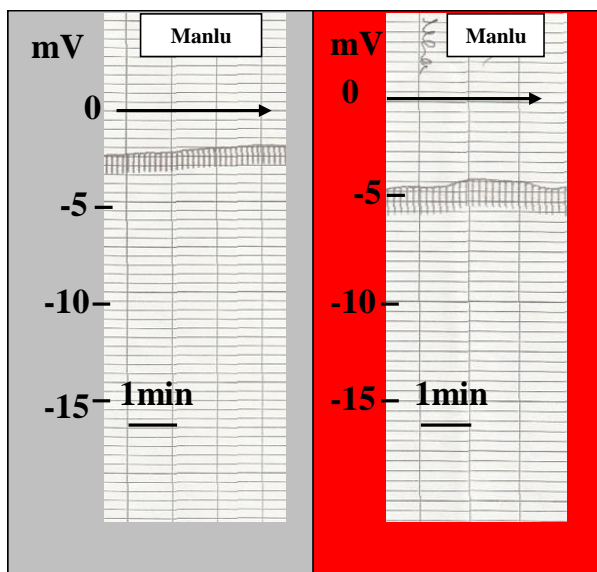


Abb. 30: Inhibition des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes: Der luminale Ersatz durch Mannitol führte im Coecum der TG (re.) zu einer Reduktion von V_{te} . In den WT (li.) konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden.

Wie Tab. 19 verdeutlicht zeigten beide Genotypen unter STD eine nur minimale Veränderung von ΔI_{sc} durch Hemmung des SGLT1. NND hingegen verursachte eine 3-fache Steigerung

von I_{sc} im Coecum der TG, während die WT keinen solchen Effekt aufwiesen (s. Tab. 19). Der Na^+ -abhängige Glukosetransport war also unter NND im Coecum der TG hochreguliert.

Tab. 19: ΔV_{te} , ΔR_{te} und ΔI_{sc} im Coecum durch Inhibition von SGLT1: Unter NND kam es zu einer deutlichen Aktivierung von SGLT1 in den TG.

	STD				NND			
	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot cm^2$]	ΔI_{sc} [$\mu A/cm^2$]	n
WT	0,4±0,09	0,5±0,6	6,8±2,3	10	0,2±0,07	-0,9±0,6	1,7±1,9§	12
TG	0,31±0,09	1,52±1*	5,6±2,2	11	0,7±0,2*	1,1±0,5*	16,6±4,9§*	12

3.2.7 Inhibition von KCNQ1/E3

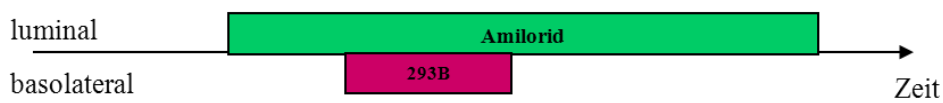


Abb. 31: Schema zum Versuchsprotokoll der Inhibition von KCNQ1/E3

Um den Anteil der „basolateralen Triebkraft“ am vermehrten negativen I_{sc} zu überprüfen, untersuchten wir auch die Eigenschaften der basolateralen Membran und nutzten das Chromanol 293B, um den Kalium-Kanal KCNQ1/E3 zu inhibieren [14].

Abb. 31 stellt den zeitlichen Versuchsverlauf dar: Nach Stabilisierung des Coecumgewebes und in Anwesenheit von Amilorid luminal wurde 293B von basolateral eingewaschen.

Abb. 32 zeigt eine Schreiberaufzeichnung. Die durch 293B verursachte Reduktion von V_{te} war im Coecum der TG (re.) deutlich stärker ausgeprägt als in den WT (li.).

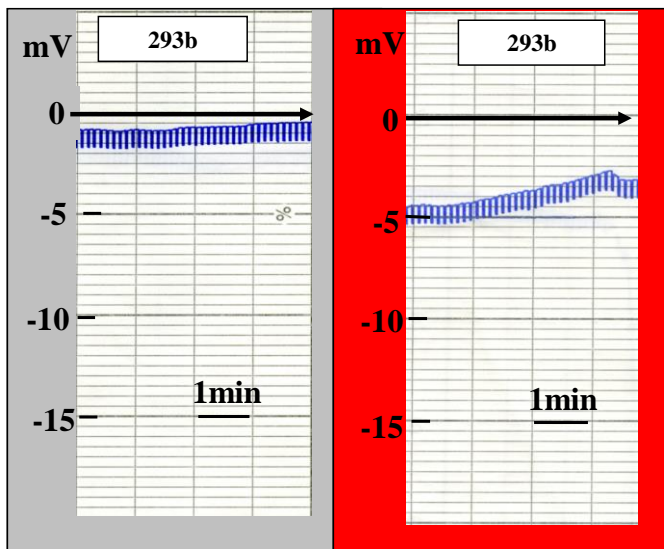


Abb. 32: Inhibition von KCNQ1/E3 im Coecum von WT (li.) und TG (re.). Die deutlich stärkere Reduktion von V_{te} in den TG ist gut zu erkennen.

ΔI_{sc} war im Coecum der TG unter STD mit $15 \mu A/cm^2$ im Vergleich zu den WT ($8,6 \mu A/cm^2$) leicht erhöht. Dieses Phänomen wurde durch eine NND weiter verstärkt. So zeigten die TG

nach NND eine Verdopplung von ΔI_{sc} , verglichen mit der STD. Im Coecum der WT bewirkte eine NND keinen Anstieg von ΔI_{sc} (s. Tab. 20). KCNQ1/E3 war also an der Ausbildung des lumen-negativen I_{sc} beteiligt.

Tab. 20: ΔV_{te} , ΔR_{te} und ΔI_{sc} im Coecum durch Inhibition KCNQ1/E3: Die Aktivität von KCNQ1/E3 war in den TG unter NND hochreguliert.

	STD				NND			
	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n	ΔV_{te} [mV]	ΔR_{te} [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	ΔI_{sc} [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
WT	0,6 \pm 0,2	0,3 \pm 0,6	8,6 \pm 2,5	11	0,5 \pm 0,2	-0,5 \pm 0,9	9,23 \pm 4,53	12
TG	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	15 \pm 3,9	11	1,2 \pm 0,2 *	1,3 \pm 0,5	33,8 \pm 4,9 §*	11

3.2.8 Plasma- und Urinparameter

Ähnlich den *in vivo* Versuchen (10 Tage NND) wurden auch in den *in vitro* Versuchen (7 Tage NND) die Elektrolytkonzentrationen aus den Plasma- und Urinproben bestimmt.

Neben der Dauer der Diätgabe bestand ein Unterschied in dem zusätzlichen Stress, dem die Tiere durch den metabolischen Käfig ausgesetzt waren.

3.2.8.1 Na^+/Cl^- -Homöostase

Auch in dieser Versuchsreihe konnten die WT die verminderte Na^+ -Zufuhr unter NND durch eine Reduktion der $\text{FE}_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-}$ besser kompensieren als die TG (s. Tab. 21).

Tab. 21: FE_{Na^+} und FE_{Cl^-} : Die WT zeigten eine stärkere Reduktion der beiden Parameter als die TG.

	STD				NND			
	FE_{Na^+} [%]	n	FE_{Cl^-} [%]	n	FE_{Na^+} [%]	n	FE_{Cl^-} [%]	n
WT	0,42 \pm 0,02	9	0,59 \pm 0,13	9	0,11 \pm 0,03 §	6	0,23 \pm 0,03 §	15
TG	0,46 \pm 0,05	4	0,58 \pm 0,08	4	0,18 \pm 0,03 §	9	0,34 \pm 0,05 §*	14

Anders als nach 10-tägiger NND zeigte sich nach 7-tägiger Diät kein Abfall der Na^+/Cl^- -Konzentration im Plasma der TG (s. Tab. 22).

Tab. 22: Plasmakonzentrationen von Na^+ und Cl^- : Keine Unterschiede im Genotypen und Diätvergleich.

	STD				NND			
	Na^+ [mmol/l]	n	Cl^- [mmol/l]	n	Na^+ [mmol/l]	n	Cl^- [mmol/l]	n
WT	153 \pm 0,6	14	115 \pm 0,5	14	154 \pm 0,5	27	115 \pm 0,6	27
TG	153 \pm 1,7	9	115 \pm 1,7	9	153 \pm 0,8	25	114 \pm 0,9	25

3.2.8.2 K⁺-Homöostase

Im *in vitro* Datensatz zeigten sich keine Unterschiede im Diäten- und Genotypenvergleich bezüglich der FE_{K⁺}. Auch die K⁺-Konzentration im Plasma differierte unter STD zwischen den Vergleichsgruppen nicht. Allerdings entwickelten die TG, wie auch in den *in vivo* Daten, mit +0,5mmol/l gegenüber WT eine signifikante Erhöhung der K⁺-Konzentration im Plasma unter NND (s. Tab. 23).

Tab. 23: K⁺-Konzentration im Plasma und seine fraktionelle Ausscheidung

	STD				NND			
	K ⁺ [mmol/l]	n	FE _{K⁺} [%]	n	K ⁺ [mmol/l]	n	FE _{K⁺} [%]	n
WT	4±0,2	14	27,6±5	9	3,8±0,1	27	20±2,1	15
TG	4,1±0,1	9	21,4±2,7	4	4,5±0,1 *	25	23,6±3,3	15

3.2.8.3 Säure-/Basen-Haushalt

Anders als nach 10-tägiger NND war der Plasma pH-Wert in beiden Genotypen im *in vitro* Ansatz unverändert.

Auch die Bikarbonat-Werte im Vollblut waren hier unter STD in beiden Genotypen identisch. Durch eine NND kam es aber nun ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des HCO₃⁻ im Blut der Vergleichsgruppen. Dieses Phänomen war in den TG deutlich stärker ausgeprägt (-9,8%) als in den WT (-2,7%).

Auch der BE wich unter NND in den TG stärker ab (-1,9mmol/l), als in den WT (-0,2mmol/l). Unter STD gab es diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 24).

Tab. 24: Verminderung der Bikarbonatkonzentration im Plasma und negative BE-Abweichung der TG unter NND.

	STD				NND			
	pH	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	BE [mmol/l]	n	pH	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	BE [mmol/l]	n
WT	7,34±0,01	22,4±0,3	-3,5±0,5	11	7,35±0,01	21,8±0,7	-3,7±0,6	27
TG	7,35±0,02	22,4±1	-3,1±1,4	10	7,34±0,01	20,2±0,5 §*	-5±0,5 *	30

3.2.8.4 Die transgenen Mäuse als „Hoch-Aldosteron-Modell“

Wie in 1.4 bereits erwähnt führte der gewebespezifische Knockout des MRs in anderen Versuchsreihen zu einer stark vermehrten Ausschüttung des Steroidhormons Aldosteron in den betroffenen Tieren.

Auch in unseren Messungen zeigten die TG unter STD eine deutlich erhöhte Konzentration von Aldosteron im Plasma gegenüber den WT. Ergänzend konnten wir feststellen, dass sich die Hormonausschüttung in den TG durch eine NND noch weiter steigern ließ, während die

Diät in der Vergleichsgruppe überraschender Weise keinen Einfluss auf die Aldosteronkonzentration im Blutplasma hatte (Werte s. Tab. 25).

Tab. 25: Aldosteron Gehalt im Plasma: Unter beiden Diäten zeigten die TG deutlich erhöhte Konzentrationen, während die WT keine diätabhängigen Veränderungen aufwiesen.

	STD	n	NND	n
WT	507±159pg/ml	6	358±127pg/ml	6
TG	1926±343pg/ml *	6	4500±453pg/ml §*	6

3.3 Expressionsanalyse

3.3.1 Daten aus den Real Time PCR Versuchen

Die Real Time PCR ermöglicht die semiquantitative Erfassung der Genexpression. Um die Expressionsrate der gesuchten Gene herauszufinden, bezogen wir ihren Verdopplungswert auf den der „housekeeping-Gene“ HPRT1 und GAPDH. Die RNA stammte aus dem Coecum von WT und TG, die vorher 7 Tage mit NND gefüttert worden waren.

Wie Abb. 33 verdeutlicht, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bezüglich der Expression der Gene, die für TRPM4, KCNQ1 (mit seiner Untereinheit KCNE3) und SGLT1 kodieren. Auch die Expression der α -Untereinheit von ENaC war in den verschiedenen Genotypen ähnlich. Die β -Untereinheit war in den TG gegenüber den WT unter NND 6-fach erhöht und auch die γ -Untereinheit von ENaC zeigte sich in den TG 9,5-fach stärker exprimiert als in den WT.

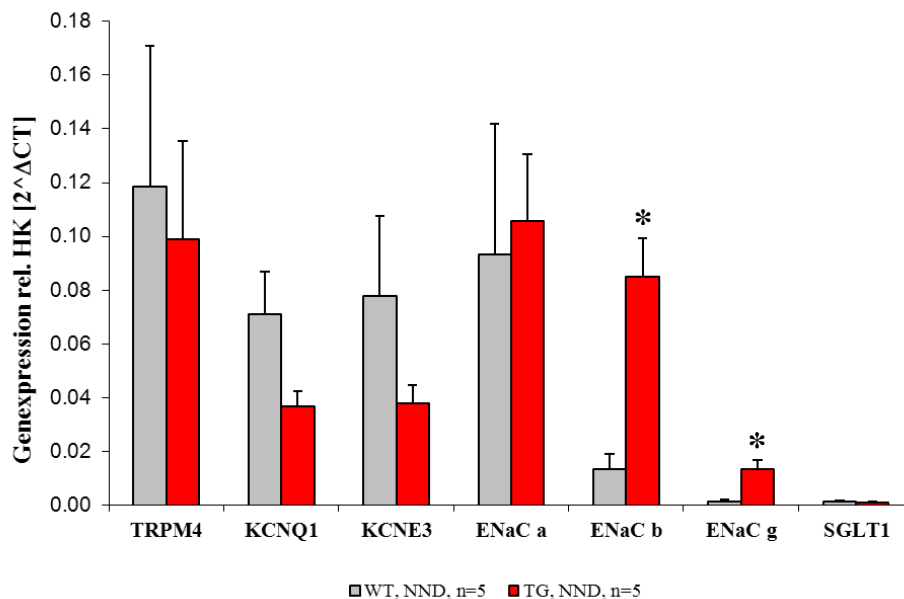


Abb. 33: Die Genexpression ist relativ zu den „housekeeping“ Genen aufgetragen [2^{-ΔCT}].

Unter NND waren ENaC- β und ENaC- γ im Coecum der TG vermehrt exprimiert.

3.3.2 Immunhistochemie

Das verwendete Gewebe stammte aus Mäusen (WT, n=2, TG, n=2), die vor der Organentnahme für 7 Tage mit NND gefüttert wurden.

3.3.2.1 ENaC- γ wurde in beiden Genotypen nachgewiesen

In den ersten gefärbten Präparaten des distalen Kolons konnten sowohl die β - (Daten nicht gezeigt) als auch die γ -Untereinheit von ENaC in beiden Genotypen nachgewiesen werden. Besonders deutlich erschien das Signal in den TG. Abb. 34a zeigt die gefärbten Präparate beider Genotypen. Die luminaire Membran der Na^+ -resorbierenden Zellen des Oberflächenepithels ist mit unterschiedlicher Intensität gefärbt.

Auch im Coecum fand sich ein Signal des γ -ENaC-AK in beiden Genotypen, wenn auch deutlich schwächer (s. Abb. 34b).

3.3.2.2 TRPM4 war im Coecum beider Genotypen exprimiert

Das Signal der TRPM4-Antikörper konnte im Kolongewebe beider Genotypen detektiert werden (s. Abb. 34c). Hierbei war das Signal in den TG etwas stärker. Der AK färbte, direkt unterhalb des Bürstensaumes, entweder die luminaire Membran oder unmittelbar submembranöse Strukturen (z.B. Vesikel).

Auch im Coecum ließ sich der unselektive Kationenkanal besonders deutlich in den Enterozyten der Kryptenbasis unterhalb des Bürstensaums nachweisen. Dieses Phänomen war in den Kriptenquerschnitten der TG besonders deutlich ausgeprägt (s. Abb. 34d).

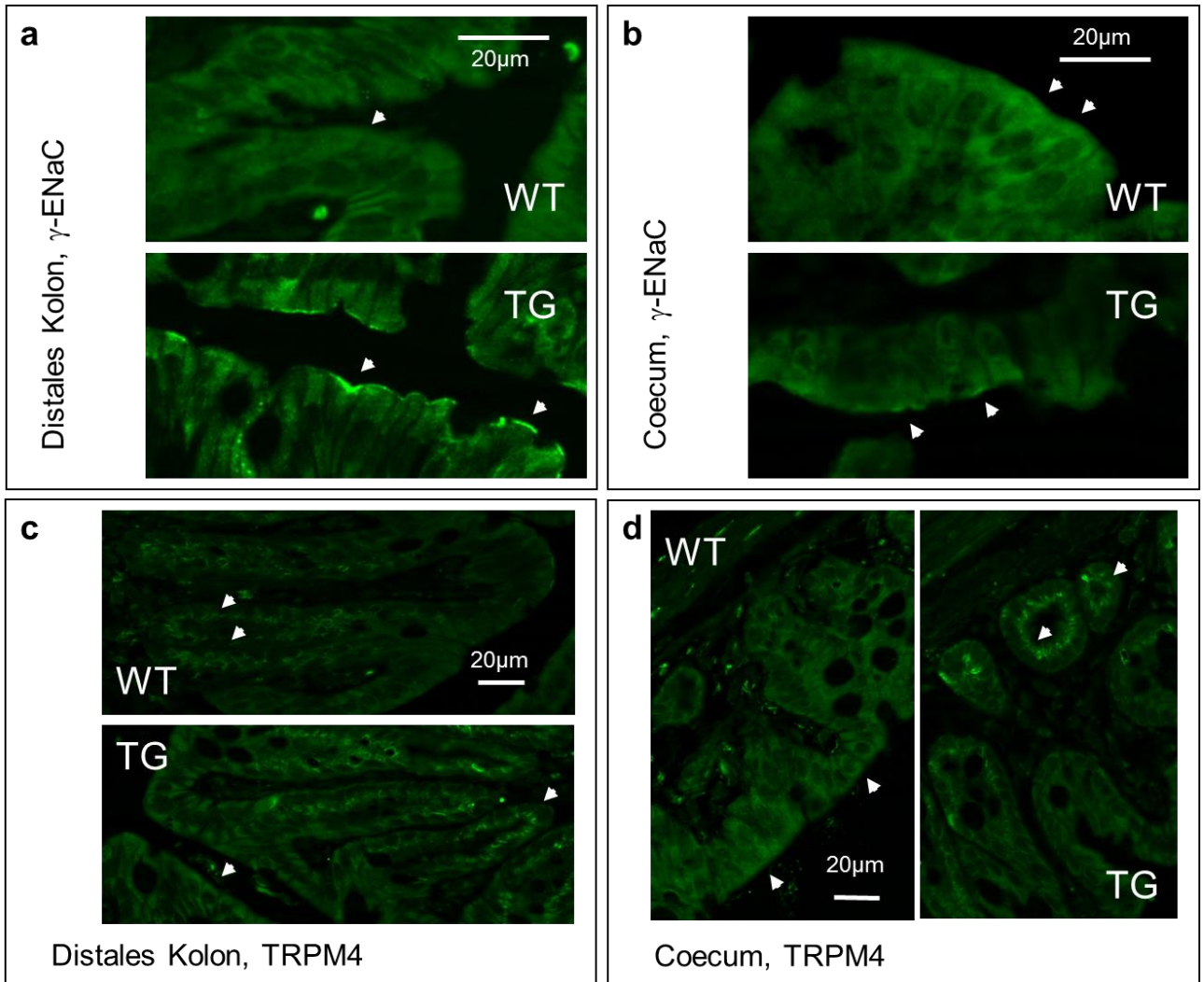


Abb. 34: Immunhistochemische Färbung von γ -ENaC (a, b) TRPM4 (c, d), im distalen Kolon (a, c) und im Coecum (b, d) beider Genotypen.

34a: Deutliches Signal von γ -ENaC an der luminalen Membran von Epithelzellen im distalen Kolon der TG (Pfeilspitze)

34b: Leichte Anfärbung von γ -ENaC an der luminalen Membran von Epithelzellen des Coecums der TG (Pfeilspitze).

34c: TRPM4 ließ sich im distalen Kolon beider Genotypen anfärben (Pfeilspitze).

34d: Im Coecum der TG war das Signal von TRPM4 in den luminalen Kryptenzellen besonders deutlich erkennbar (Pfeilspitze).

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 In vivo Versuche im metabolischen Käfig

Die Versuchstiere wurden nach vorheriger 10-tägiger Fütterung mit STD oder NND für 24h einzeln in einem metabolischen Käfig gehalten. Das Futter in dem Käfig entsprach dabei der zugeteilten Diät.

Die Vorteile dieser Methode bestehen in der Möglichkeit Trink- und Fressmenge einer Maus, sowie ihre Ausscheidungen quantitativ und qualitativ (z.B. bzgl. Elektrolytgehalt und Osmolalität) zu erfassen. Auf diesem Wege können integrative Stoffwechselfunktionen, wie Nierenleistung, die Homöostase von Wasser und einzelnen Elektrolyten eines lebendigen Tieres genau untersucht und zwischen verschiedenen Genotypen verglichen werden.

Die nachteiligen Einflüsse der Methode bestanden vor allem in einer erhöhten Stressbelastung der Tiere, die durch die Isolierung des Einzeltieres in einer ungewohnten Umgebung ohne Möglichkeit zum Nestbau hervorgerufen wird. Auch die Konstanthaltung der Körpertemperatur stellt in dieser Umgebung höhere Ansprüche an den Stoffwechsel einer Maus. Neben diesen Faktoren, die sicherlich Einfluss auf den Mausorganismus und seinen Hormonhaushalt nahmen, ist zu bedenken, dass die äußeren Parameter, wie z.B. die Temperatur oder die Zeit auch die Stoffwechselprodukte, z.B. durch Verdunstung von Wasser aus dem Urin, verändern.

Um die Vergleichbarkeit zwischen den Genotypen durch die genannten Einflüsse nicht zu gefährden, wurde auf eine absolute Gleichbehandlung der Tiere geachtet. So geschah das Einsetzen der Tiere immer zur gleichen Tageszeit in baugleiche Käfige innerhalb eines Raumes mit konstanter Temperatur.

In den *in vitro* Versuchen wurden die Tiere nicht zusätzlich dem Stress des metabolischen Käfigs ausgesetzt, was zusammen mit der unterschiedlichen Diätdauer (s. 4.1.3) zu den etwas unterschiedlichen Stoffwechselfparametern geführt haben könnte.

4.1.2 *In vitro* Versuche mit der Ussing Kammer

4.1.2.1 Präparation von Kolongewebe

Eine gewebeschonende Präparation ist essenziell für eine Messung in der Ussing Kammer, da Lücken im Zellverband zu einem drastischen Widerstandsverlust führen. Daneben ist zu beachten, dass bei der Untersuchung des Gewebes nicht nur die Epithelschicht gemessen, sondern auch submuköses Bindegewebe mit eingespannt wird. Auch können eventuelle luminale Verunreinigungen, wie Kotreste und Schleim, Einfluss auf den gemessenen äquivalenten Kurzschlussstrom nehmen bzw. die Zugänglichkeit der luminalen Membran für Pharmaka vermindern. Um diese Störfaktoren zu minimieren, entfernten wir, wie in 2.5.3 beschrieben, am distalen Kolon die äußeren Wandschichten einschließlich der Tunica muscularis. Da uns dies innerhalb einer angemessenen Zeit aus präparationstechnischen Gründen für das sackförmige Coecum nicht möglich war, unternahmen wir für dieses Gewebe Inhibitionsversuche mit der Substanz TTX, welche spannungsabhängige neuronale Na⁺-Kanäle inhibiert [7]. So konnten wir einen möglichen Einfluss des enterischen Nervensystems auf unsere Messung weitgehend ausschließen (s. 3.2.2).

Die Lagerung des Gewebes erfolgte zur besseren Konservierung in gekühlter Kontrolllösung.

4.1.2.2 Messtechnik

Die Messtechnik der Ussing Kammer ist hinsichtlich ihrer Messgenauigkeit vor allem störanfällig für Widerstände, die nicht von dem zu untersuchenden Epithel verursacht werden. Durch Messungen mit leerem Gewebeträger konnten wir die Widerstände des Systems (z.B. der Kammer und der Elektroden) erfassen und vom Messergebnis abziehen. Weiterhin war es wichtig zu kontrollieren, dass sich in den KCl-gefüllten Agarbrücken keine Luftblasen bildeten, die eine deutliche Widerstandserhöhung im Messstromkreis verursacht hätten. Daneben galt es die Ausbildung von kurzschließenden Salzbrücken zwischen den Halbkammern zu vermeiden.

Unmittelbar nach Einbringen des gekühlten Gewebes in die 37°C warmen Kammern kommt es durch den Temperaturwechsel und die vorherige mechanische Manipulation zu einer veränderten Gewebsspannung [12]. Diese stabilisierte sich nach einer 5-10minütigen Perfusionsphase mit Kontrolllösung. Die eigentlichen Versuche starteten erst, wenn V_{te} und R_{te} auf einem Niveau konstant blieben.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Spezifität der Inhibitoren für die einzelnen Kanäle. So könnte der doppelgipflige Effekt, der durch die Gabe der Fettsäure Acetat hervorgerufen

wurde (s. 3.2.4), durch eine pH-Veränderung verursacht worden sein und den eigentlichen epithelialen Na^+ -Transport überlagert haben.

4.1.3 Diätfutter

Es wurde darauf geachtet, dass alle Versuchstiere in jeder Versuchsreihe sowohl STD als auch NND von derselben Firma in Pelletform erhielten. Die Dauer der NND betrug aus logistischen Gründen für die *in vivo* Versuche 10 Tage und für die *in vitro* Versuche 7 Tage, da die Unterschiede in der Ussing Kammer nach dieser Zeit bereits deutlich messbar waren. Diese unterschiedliche Dauer der Diätgabe könnte zusammen mit dem bereits unter 4.1.1 diskutierten Stressfaktor „Metabolischer Käfig“ ebenfalls mit in die Unterschiede hinsichtlich der Blutkonzentrationen für Na^+/Cl^- (s. 3.2.8.1) und den zwischen diesen Versuchsreihen unterschiedlichen pH-Effekt (s. 3.2.8.3) hineinspielen.

4.1.4 Expressionsanalyse

Die auf mRNA-Ebene durchgeführten TaqMan-Untersuchungen deckten Unterschiede auf Expressionsebene auf. Funktionelle, posttranslationale Modifikationen konnten hierdurch nicht erfasst werden.

Aufgrund der niedrigen Versuchstierzahl innerhalb der Immunfluoreszenz-Versuche konnten keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Erste qualitative Ergebnisse ließen jedoch die Vermutung zu, dass sowohl ENaC als auch TRPM4 im Coecum sowie im distalen Kolon der Maus in der luminalen Membran vorhanden sind.

Quantitative Aussagen sind mit den bisherigen Ergebnissen nicht möglich. In der Immunfluoreszenz könnte die Sublokalisierung der Proteine (Plasmamembran/submuköses Bindegewebe) mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie in höherer Fallzahl untersucht werden. Dies ließe eventuelle Schlüsse auf eine funktionelle Hochregulation zu. Zur Quantifizierung der Proteinmenge müssten Western Blot-Analysen durchgeführt werden.

4.2 Auswirkungen des MR-Knockouts

Das hier benutzte Mausmodell wurde bereits ausführlich beschrieben [48]. Der Sammelrohrspezifische Knockout des MR wird unter Normalbedingungen vollständig durch den späten distalen Tubulus und das frühe Verbindungsstück renal kompensiert. In dieser Arbeit wurden die Tiere zusätzlich durch NND in ihrer Na^+ -Homöostase belastet und das besondere

Augenmerk galt der Rolle des Gastrointestinaltraktes bei der Kompensation eines erhöhten renalen Verlustes.

4.2.1 Metabolische Befunde und renale Kompensation

Im folgenden Abschnitt sollen die Auswirkungen der NND mit (WT) und ohne (TG) Aldosteron-sensitivem Sammelrohr diskutiert und physiologisch eingeordnet werden. Die intestinalen Befunde werden hierbei ausführlich im nächsten Abschnitt (4.3) behandelt.

4.2.1.1 WT

WT-Mäuse reagierten auf die NND und konnten die reduzierte Na^+/Cl^- -Zufuhr komplett kompensieren. In Abb. 35 ist vereinfacht und stichpunktartig die Physiologie einer reduzierten Na^+/Cl^- -Aufnahme dargestellt. Der resultierende Salz- und Volumenmangel aktiviert über den Blutdruck oder die Osmosensor-/Hypophysenachse die Erhöhung der Hormone ADH, Renin, Angiotensin II und Aldosteron. Diese Hormone tragen dann, wie in der Einleitung (1.3) beschrieben zur Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes bei und führen so zu einer adäquaten Reduktion der renalen Na^+/Cl^- -Ausscheidung. Dies war in beiden Versuchsreihen durch eine Senkung von FE_{Na^+} und FE_{Cl^-} sichtbar.

In den *in vivo* Versuchen (NND über 10 Tage) stiegen die Plasmaaldosteronwerte deutlich an (vgl. a. [48]). In den *in vitro* Versuchen hatten die Tiere bereits unter STD relativ hohe Werte, die auch unter NND nicht weiter anstiegen. Da die NND eine adäquate Verminderung der FE_{Na^+} hervorrief, ist die Interpretation der Aldosteronmessungen in diesem Fall nicht möglich. Eine Wiederholung wäre sinnvoll.

Weder in den *in vivo* Versuchen, noch in den *in vitro* Versuchen konnten wir einen parallelen Anstieg in der FE_{K^+} beobachten. Dies beruht vermutlich nicht zuletzt darauf, dass durch Aldosteron-abhängige Aktivierung des luminalen K^+ -Kanals RomK eine gesteigerte Kaliumausscheidung im CNT stattfindet.

Neben der Aktivierung des RAAS ist auch (z.B. durch Osmolalitätssteigerung im Plasma oder als AT II-Effekt) davon auszugehen, dass die ADH- Freisetzung effektiv stimuliert wurde. Da die, durch die Blutentnahme gewonnene Plasmamenge einer Maus hierfür nicht ausreichend war, war eine quantitative Bestimmung des Peptidhormons im Plasma nicht möglich. Des Weiteren entschieden wir uns gegen eine Kumulation mehrerer Tiere da das Hormon starken Konzentrationsschwankungen unterliegt und eine sehr kurze Halbwertszeit hat. Deshalb sind die Richtungspfeile für ADH und AT II genauso, wie die nicht gemessene Blutdruckwerte in Abb. 35 und auch Abb.36 (Pathophysiologie in den TG) in Klammern gesetzt.

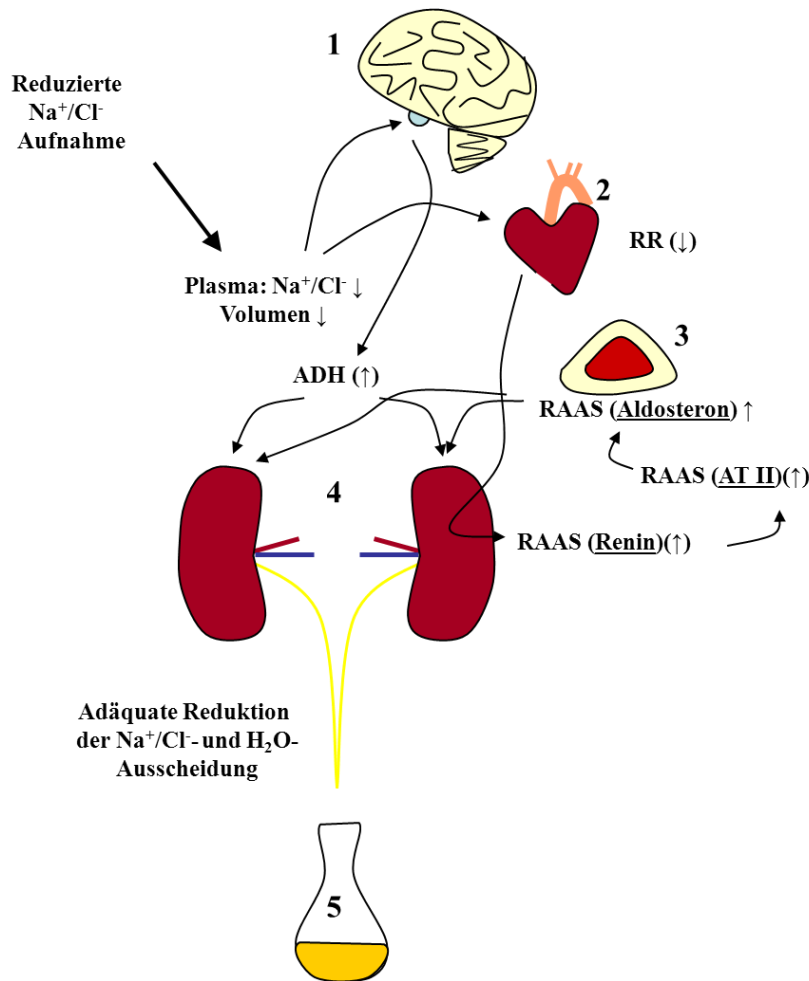


Abb. 35: Schematische Darstellung der physiologischen Reaktion eines Organismus auf eine orale Natrium-Depletion, wie sie sich in beiden Versuchsreihen in den WT zeigte:

Aufgrund der niedrigen Na⁺/Cl⁻-Konzentration im Plasma und einer, durch u. a. die Hypovolämie ausgelösten, erhöhten Sympathikusaktivierung in den TG kam es über eine Freisetzung von Renin zu einer Aktivierung des RAAS: Renin spaltet das Protein Angiotensinogen zu AT I, welches durch das ACE zu AT II gespalten wird. AT II wirkt vasokonstriktorisch und stimuliert die Freisetzung von ADH und Aldosteron. ADH sorgt für eine vermehrte H₂O-Resorption und in hoher Konzentration auch für eine ENaC-Aktivierung. Aldosteron aktiviert ENaC.

1) Cerebrum, 2) Cor, 3) Glandula suprarenalis, 4) Ren, 5) Urin

4.2.1.2 TG

Unter STD waren fast alle untersuchten Parameter zwischen den beiden Vergleichsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich ein leicht erhöhter Hkt, eine vermehrte 24h-Na⁺-Ausscheidung und der erhöhte Aldosterongehalt des Plasmas ließen sich - passend zu einer fast kompletten Kompensation - feststellen. Den wichtigsten renalen Kompensationsmechanismus stellte hierbei die deutlich erhöhte ENaC-Aktivität im Verbindungstubulus dar, die durch Aldosteron induziert wurde [48].

Die Veränderungen unter der zusätzlichen Belastung mit NND sind in Abb. 36 dargestellt.

Aufgrund der verminderten Aufnahmekapazität für Na⁺/Cl⁻ im Sammelrohr (inadäquate Reduktion FE_{Na+} und FE_{Cl-}) zeigte sich in den TG unter diesen Bedingungen ein ausgeprägter

Na^+/Cl^- Mangel (reduzierte Plasma Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen (s. 3.1.3.3)). Parallel litten die TG unter einem Volumenmangel, wie der Hkt-Wert verdeutlichte (s. 3.1.3.1). Da der Wasserhaushalt eng mit dem des Elektrolyts Na^+ verbunden ist, induzierte die Hyponatriämie einen intravasalen Flüssigkeitsmangel, der von den TG im Gegensatz zu den WT nicht kompensiert werden konnte. Dieser fand Ausdruck in einer, trotz erniedrigten Na^+/Cl^- -Plasmakonzentrationen, deutlich erhöhten Plasmaosmolalität. Als Osmolyt könnte hier Harnstoff mit seiner erhöhten Plasmakonzentration an Stelle des Na^+ getreten sein (s. 3.1.3.1). Die fehlende Aldosteronsensibilität der Sammelrohre war unter NND also voll relevant.

Ebenso war die Hyperkaliämie zusammen mit einer verminderten FE_{K^+} (s. 3.1.3.4) unter NND ein Zeichen der insuffizienten Reaktion auf das in den TG im Vergleich zur STD noch weiter erhöhte Aldosteron.

Weiterhin lässt sich das erhöhte Trinkverhalten der TG unter NND (s. 3.1.1) ebenfalls über eine Aktivierung des RAAS erklären, da AT II über eine zentrale Wirkung auf das Subfornikalorgan durststeigernd wirkt [36].

Bei unauffälliger glomerulärer Leistung (s. 3.1.2) entwickelten die TG eine gesteigerte Harnstoffkonzentration im Plasma. Diese Erhöhung könnte in den TG unter NND kompensatorisch entstanden sein, da sie eine fast maximale Harnkonzentrierung trotz stark vermindertem Elektrolytgehalt im Plasma und erhöhtem Urinzeitvolumen erreichten (s. 3.1.3.1). Statt Na^+ war nun eine vermehrte Harnstoffresorption an der Ausbildung der interstitiellen Osmolaritätssteigerung im Bereich der Henle Schleife beteiligt. Dazu passt auch, dass die FE_{Urea} in beiden Genotypen unter NND reduziert war (s. 3.1.3.1). Dieser Mechanismus könnte auf eine erhöhte Konzentration von ADH im Plasma zurückzuführen sein [30].

Eine vermehrte HCO_3^- -verbrauchende, Harnstoffbildung könnte außerdem Grund für die Azidose beider Genotypen unter NND (s. 3.1.3.5) gewesen sein, wobei dieser Mechanismus unter NND so noch nicht beschrieben wurde und deshalb an dieser Stelle reine Spekulation darstellt. In den TG war die Azidose wahrscheinlich zusätzlich durch eine vermehrte HCO_3^- -Ausscheidung (s. Abb. 16b) bedingt. Diese wiederum könnte auf einen Mechanismus im Sammelrohr, der nachfolgend beschrieben wird, zurückzuführen sein:

So können die vielfältigen Auswirkungen des Angiotensins neben der, mit der Aldosteronfreisetzung verbundenen renalen Na^+ -Retention, auch in einer vermehrten Cl^- -Absorption in den kortikalen Sammelrohren bestehen. Pech et al. beschrieben einen dazu passenden Weg, der über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher Pendrin vermittelt ist [46]. Es folgt ein erhöhter renaler Bikarbonatverlust, da eine vermehrte Cl^- -Retention in den TG unter NND über diesen Weg

mit einer parallelen HCO_3^- -Ausscheidung einhergeht. Dementsprechend beschrieben Leviel et al. einen Thiazid-abhängigen Na^+ -Absorptionsmechanismus in den kortikalen Sammelrohren, der über Pendrin und NDCBE (Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) elektroneutral abläuft und durch eine orale Natrium-Depletion aktivierbar war [34].

Das distale Nephron ist also in vielfältiger Weise an der Kompensation des Na^+ -Verlustes beteiligt und das von uns genutzte Mausmodell kann in weiteren Studien helfen, Aldosteron-abhängige von Aldosteron-unabhängigen Mechanismen zu differenzieren.

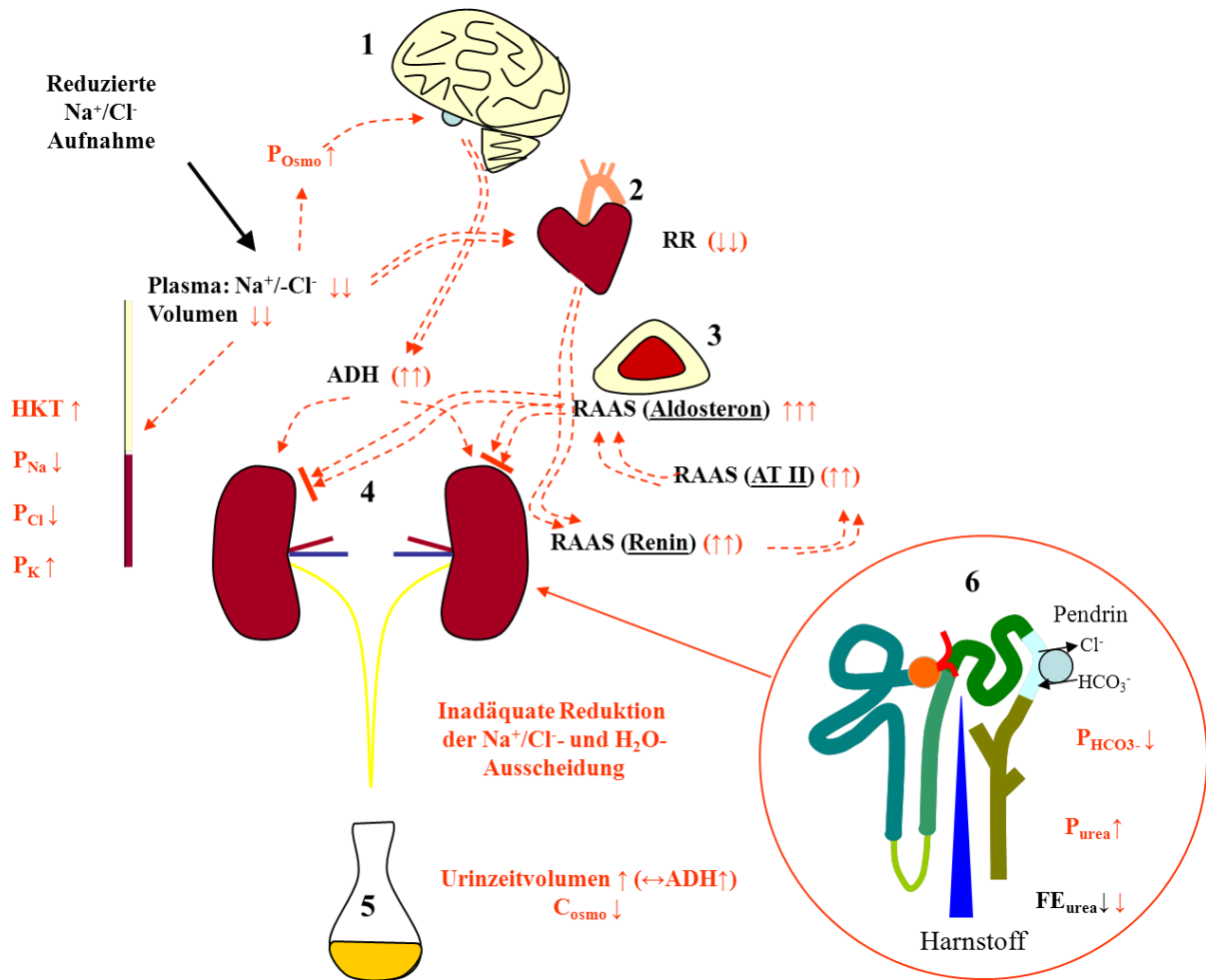


Abb. 36: Schematische Darstellung der Reaktion eines Organismus ohne Aldosteron-sensibles Sammelrohr auf eine NND, wie sie sich in beiden Versuchsreihen in den TG zeigte:

Es kommt aufgrund des Na^+/Cl^- - und Volumen-Mangels (mit gesteigertem Hkt und P_{Osmo}), sowie der relativen Hyperkaliämie zu einer forcierten Aktivierung des RAAS mit massiv erhöhter Konzentration von Aldosteron im Plasma. Daneben wird die ADH-Ausschüttung durch die erhöhte Plasmaosmolalität aktiviert. Osmosensoren führen zu einem Durstgefühl mit gesteigerter Trinkmenge. Um eine Urinkonzentrierung und Wasser- und Salzrückresorption zu erreichen kommt es zu einer vermehrten Rückresorption von Harnstoff und Bikarbonat wird im Austausch mit Chlorid ausgeschieden.

Trotz der gezeigten Kompensationsversuche schafft es der TG-Organismus nicht das Aldosteron-unsensible Sammelrohr vollständig zu ersetzen: Bei erhöhter Trinkmenge und Urinkonzentrierung besteht ein erhöhtes Urinzeitvolumen trotz intravasalem Flüssigkeitsmangel. Auch die Na^+/Cl^- -Rückresorption bleibt unzulänglich, zusätzlich zeigt sich sogar eine metabolische Azidose, resultierend aus den oben beschriebenen Vorgängen.

1) Cerebrum, 2) Cor, 3) Glandula suprarenalis, 4) Ren, 5) Urin, 6) Schema eines Nephrons mit aktiviertem Pendrin sowie erhöhter Harnstoffrückresorption

4.3 Intestinale Kompensationsmechanismen

4.3.1 Erhöhte Na⁺-Resorption in den TG

Um eine mögliche Kompensation über den Gastrointestinaltrakt beurteilen zu können, untersuchten wir zunächst die fäkale Na⁺-Ausscheidung in beiden Genotypen unter STD und NND. In den WT machte sie unter STD nur 5% der Gesamtausscheidung aus. Unter NND sank die Na⁺-Ausscheidung dann um die Hälfte, was aber auch der verminderten oralen Zufuhr geschuldet sein kann. Während jedoch die fäkale Na⁺-Ausscheidung in den TG unter STD vergleichbar zu der, der WT war, war sie unter NND drastisch um 80% gesenkt (s. 3.1.4.2).

Aus diesen Befunden leiteten wir ab, dass die TG unter diesem lebensbedrohlichen Na⁺/Cl⁻-Verlust weitere intestinale Na⁺-Transportmechanismen rekrutierten, um das Na⁺-Angebot aus Trinkwasser und Nahrung voll auszuschöpfen.

Dazu führten wir Ussing Kammer Untersuchungen durch, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden:

4.3.1.1 ENaC-Aktivierung im distalen Kolon und Rekrutierung ins Coecum

Es ist bereits publiziert, dass der epitheliale Na⁺-Kanal sowohl auf Expressionsebene [11] als auch funktionell im distalen Kolon der Maus durch hohe Aldosteronkonzentrationen im Plasma aktiviert wird [55]. In der vorliegenden Studie konnten auch wir diese These bestätigen, da sich in den TG ein stärkerer ENaC-abhängiger I_{sc} im distalen Kolon nachweisen ließ. Dies wurde durch NND, unter der die Aldosteronkonzentration im Plasma der TG noch weiter gesteigert war, noch augenfälliger.

In unseren Versuchen zeigte sich außerdem im Coecum der TG eine signifikante Steigerung des Amilorid-abhängigen I_{sc}. Diese Beobachtung ließ sich durch eine NND noch leicht verstärken (s. 3.2.1). In den WT war dieses Phänomen nicht zu messen.

Da die WT deutlich geringere Aldosteronwerte im Plasma aufwiesen, lassen unsere Daten die Interpretation zu, dass dieses Hormon, neben der bekannten ENaC-Stimulierung im distalen Kolon, in hoher Konzentration auch eine Rekrutierung von ENaC bis in das Coecum induzieren kann.

Gegen die Hypothese, dass Aldosteron hier das ausschlaggebende Hormon ist, spricht die Tatsache, dass sich die Aldosteronkonzentration zwischen STD und NND nicht mehr sehr viel ändert, bzw. die Aldosteronkonzentration für die Effekte auf den intestinalen ENaC bereits

unter STD in den TG supramaximal erhöht ist. Außerdem konnten Agre et. al. zeigen, dass auch das distale Kolon AQP₂ exprimiert und somit auch in diesem Gewebe die Expression des MR in Anwesenheit des AQP₂-Promotors herunterreguliert sein sollte [1]. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADH in der Regulation der ENaC- und AQP₂-Expression in diesem Kolonabschnitt die Schlüsselrolle zuzukommen scheint.

Außerdem zeigen neuere Studien, dass im Kolon zusätzlich der Glukokortikoidrezeptor als Kooperationspartner des MR eine Rolle spielt [9].

4.3.1.2 Existenz eines ENaC-unabhängigen Stroms in den TG

Während sich der Kurzschlussstrom in den untersuchten Geweben der WT durch Amilorid nahezu vollständig inhibieren ließ, verblieb in den TG ein „lumennegativer Reststrom“ von durchschnittlich ca. $-90\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Coecum) und $-110\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (distales Kolon) (vgl. 3.2.1). Dieser Reststrom war auch durch eine weitere Konzentrationserhöhung des ENaC-Blockers Amilorid auf $100\mu\text{M}$ nicht reduzierbar (nicht gezeigte Daten). Um unspezifische Amilorideffekte zu vermeiden blieben wir weiterhin bei der supramaximalen Amiloridkonzentration von $50\mu\text{M}$ [29].

Dieser ENaC-unabhängige lumennegative Kurzschlussstrom passte zu einem luminalen Depolarisationsprozess, der einen weiteren (evtl. Aldosteron-vermittelten) Na⁺-Resorptionsmechanismus darstellen könnte. Um den Transporter, der für diese zusätzliche Resorption verantwortlich war, zu identifizieren, untersuchten wir mit Hilfe der Ussing Kammer verschiedene elektrogene Kanäle und Carrier.

Da der Diätunterschied im Coecum größer war, konzentrierten sich die Versuche auf dieses Gewebe. In Abb. 37 sind die untersuchten Transporter in einem vereinfachten Zellmodell dargestellt.

4.3.1.3 Keine Beteiligung von NCX und slc5a8

Mit der luminalen Gabe des NCX-Inhibitors Dichlorobenzamil konnten in beiden Genotypen keine Effekte detektiert werden. Dieser Transporter hatte somit keinen Einfluss auf das von uns beobachtete Phänomen (s. a. 3.2.3).

Obwohl NCX bereits im distalen Kolon beschrieben wurde [56] und in diesem Epithel in der Ratte auch luminal detektiert werden konnte [54], konnten wir ihn unter den beschriebenen Bedingungen experimentell nicht nachweisen. Dies könnte darin begründet sein, dass der Carrier im Coecum der Maus entweder nicht vorkommt oder dort ausschließlich basolateral vorhanden [28] und deshalb an einer luminalen Depolarisation nicht beteiligt ist. Weiter

wurde bereits eine inhibierende Wirkung von Gluko- und im geringeren Maße auch von Mineralokortikoiden auf den NCX in glatten Muskeln von Gefäßen beschrieben [58]. Da vor allem in den TG eine sehr hohe Mineralokortikoidkonzentration (s. 3.2.8.4) gemessen wurde, könnte auch dieser Ansatz eine Erklärung für das fehlende Ansprechen von NCX sein.

Zur Untersuchung des Na^+ -/Fettsäuretransporters *slc5a8* nutzten wir sein Substrat Acetat zur luminalen Induktion. Hierbei zeigte sich ein unspezifischer 2-gipfliger Effekt, der in beiden Genotypen ähnlich war und keinen Einfluss auf den erhöhten I_{sc} der TG unter NND hatte (s. a. Abb. 26).

4.3.1.4 TRPM4 vermittelt einen Teil des Reststroms

Die luminalen Gabe von 9-Phenanthrol, als selektivem Inhibitor des unspezifischen Kationenkansals TRPM4, bewirkte unter NND eine deutliche Verminderung des Betrags von I_{sc} in den beiden untersuchten Kolonabschnitten der TG.

Mit einem ΔI_{sc} von ca. $20\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (d. Kolon) bzw. $15\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Coecum) machte TRPM4 einen Anteil von 15-20% an dem beschriebenen lumennegativen Strom in den TG unter NND aus (vgl. 3.2.5). Obwohl die Expression von TRPM4 im Kolon der Maus bereits beschrieben wurde [38], ist die hier beschriebene Beteiligung von TRPM4 am Ionentransport über die luminalen Enterozytenmembran neu.

Es bleibt zu untersuchen, ob die Hochregulation dieses Kanals ebenfalls hormonabhängig durch z.B. Aldosteron geschieht, oder ob andere Mechanismen, wie z.B. eine luminalen Depolarisation oder eine evtl. veränderte Ca^{2+} -Konzentration dafür verantwortlich sind.

4.3.1.5 SGLT1 ist an der Ausbildung des lumennegativen Potenzials beteiligt

Der Effekt eines Glukose-Entzugs zeigte unter NND einen signifikanten Einfluss auf den Na^+ /Glukose-Cotransporter-abhängigen I_{sc} im Coecum der TG gegenüber den WT, in denen sich kein Effekt messen ließ. ΔI_{sc} betrug ca. $17\mu\text{A}/\text{cm}^2$ im Coecum der TG (s. 3.2.6). SGLT1 war damit zu ungefähr 19% an der Ausbildung des Reststroms beteiligt.

Diese Daten stehen teilweise kontrovers zu der, in der Literatur diskutierten Wirkung von Aldosteron auf den SGLT1 im Intestinaltrakt. So beschrieben Vazquez et al. eine Steigerung der Na^+ -gekoppelten Glukose-Aufnahme im Jejunum von spontan hypertensiven Ratten [64], während Mate et al. eine Reduktion der SGLT1-Aktivität im Dünndarm von spontan hypertensiven Ratten mit einem erhöhten Aldosteron-Spiegel feststellten [37]. Barfull et al. entdeckten eine Aldosteron-abhängige sowohl funktionelle als auch numerische Herabregulation des SGLT1 im Rektum und Ileum von Hühnern [5].

Die Unterschiede zu unseren Daten können zum einen auf der Untersuchung einer anderen Spezies und zum anderen auf den unterschiedlich gewählten Darmabschnitten beruhen. Zudem wiesen die Versuchstiere in den zitierten Versuchen, mit maximal etwa 270pg/ml gegenüber den TG unter NND (4500pg/ml) deutlich geringere Aldosteronkonzentrationen im Plasma auf. Neben einer konzentrationsabhängigen Wirkung könnte die von uns beobachtete Aktivitätssteigerung aber auch durch einen Aldosteron-unabhängigen Mechanismus verursacht worden sein.

Interessanterweise ist außerdem in der Literatur eine ATII-bedingte Hochregulation des SGLT2 in der Niere beschrieben [8].

4.3.1.6 KCNQ1/E3 als basolaterale Triebkraft

Um eine potenzielle basolaterale Triebkraft für den vermehrten luminalen Einstrom positiv geladener Ionen zu erforschen, inhibierten wir den basolateralen K^+ -Kanal KCNQ1/E3, der in dieser Funktion bereits beschrieben wurde [32].

Unter NND zeigte sich hier ein deutlicher Effekt in den TG, der sich in den WT nicht detektieren ließ (s. 3.2.7). Mit einem ΔI_{sc} von ca. $34\mu A/cm^2$ zeigte sich der basolaterale K^+ -Kanal in den TG unter NND deutlich hochreguliert und kann somit die Triebkraft für den beschriebenen Depolarisationsprozess liefern. Neben einer Aktivierung über den Botenstoff cAMP, wurde bereits ein stimulierender Einfluss der SGK auf KCNQ-Kanäle von Strutz-Seebohm et al. beschrieben. Dabei wurde aber festgestellt, dass die Untereinheit KCNE1 zu einer Stimulierung der SGK-Sensitivität von KCNQ1 führte, während die Untereinheit KCNE3, welche im Darm vorkommt, diese herabregulierte [60]. Ein möglicher Aldosteron-effekt wäre demnach nicht SGK vermittelt.

Da die basolaterale Inhibition mit 293B den zusätzlichen Na^+ -Strom nicht komplett zum Erliegen brachte, spielen auch andere basolaterale Mechanismen eine Rolle, die einen positiven Einfluss auf den transepithelialen Na^+ -Fluss haben könnten. Ein möglicher Kandidat wäre z.B. eine (evtl. Aldosteron-abhängige) Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase [39].

Im Zusammenhang mit dem basolateralen K^+ -Kanal KCNQ1 sei hier auch kurz auf die intestinale K^+ -Sekretion eingegangen. Über luminale BK Kanäle ist eine K^+ Sekretion möglich und dieser Kanal ist auch Aldosteron-abhängig reguliert [51]. In den WT Mäusen spiegelt sich dies durch eine erhöhte fäkale K^+ -Sekretion unter NND wider. Dahingegen ist die fäkale K^+ -Sekretion unter STD in den TG zwar deutlich höher (wiederum passend zu den hohen Aldosteronspiegeln), unter NND nimmt die fäkale K^+ -Sekretion überraschenderweise jedoch stark ab. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht Teil dieser Doktorarbeit und

soll hier deshalb nicht weiter diskutiert werden. Jedoch ist zu bedenken, dass eine luminale K^+ -Sekretion, wenn sie elektrogen über BK Kanäle stattfindet, als luminal hyperpolarisierender Effekt zu lumenpositiven Potenzialen führt. WT Mäuse unter NND zeigen daher nach luminaler Amiloridapplikation z. T. deutlich lumenpositive V_{te} -Werte. Lumenegative Transportvorgänge (depolarisierende Prozesse an der luminalen Membran) können also durch gleichzeitig gesteigerte luminale K^+ -Sekretion maskiert sein. Somit kann also der Wegfall dieser Prozesse in den TG substantiell ebenfalls eine Rolle bei der Ausbildung des lumennegativen Reststromes spielen.

Wieso die TG trotz einer erhöhten K^+ -Plasmakonzentration und stark erhöhten Aldosteronwerten die fäkale K^+ -Sekretion unter NND reduzieren ist unklar.

4.3.1.7 Der luminale Reststrom als eine „Gemeinschaftsleistung“

Wie die oben diskutierten Ergebnisse zeigen, war nicht nur ein einzelner Transporter an dem von uns entdeckten Phänomen beteiligt. So machten TRPM4 und SGLT1 gemeinsam ca. 40% des stärker lumennegativen, Amilorid-unabhängigen Potenzials aus, welches von uns als Zeichen der vermehrten „intestinalen Na^+ -Rettung“ der unter Na^+ -Depletion leidenden TG interpretiert wurde. Die weiteren 60% bleiben zunächst unklar und müssen durch weitere Inhibitionsversuche anderer, noch infrage kommender Transporter geklärt werden.

Weiter ist zu beachten, dass mit der Ussing Kammer-Messtechnik nur elektrogene Transporter gemessen werden können. Eine mögliche Beteiligung nicht elektrogener Transportvorgänge an der erhöhten intestinalen Na^+ -Ausschöpfung ist also nicht auszuschließen. Ein möglicher Mechanismus wäre hier z.B. der Cl^-/HCO_3^- -Antiporter *slc26a3* gekoppelt z.B. mit einem Na^+/H^+ Antiporter [2].

Außerdem ist zu erwähnen, dass ein lumennegatives Potenzial natürlich auch durch vermehrte Cl^- -Sekretion im Kolon entstehen kann [53]. Da wir aber in Vorversuchen mit dem Pharmakon Forskolin, welches über eine Stimulation der Adenylatcyclase vor allem eine erhöhte Cl^- -Sekretion bewirkt und dem NKCC1-Inhibitor Bumetanid keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachweisen konnten (Daten nicht gezeigt), beschränkten wir uns auf die Untersuchung von potenziellen Na^+ -Resorptionsprozessen.

In Abb. 37 sind die untersuchten Na^+ -gekoppelten Transporter und Kanäle in einem Zellmodell dargestellt.

Man kann nicht mit abschließender Sicherheit behaupten, dass die beobachteten Effekte vollständig auf eine Aldosteronwirkung zurückzuführen sind, da die TG schon unter STD einen enorm hohen Wert dieses Hormons im Plasma aufwiesen. Er wurde unter NND zwar

noch gesteigert, doch wirkte diese Steigerung gegenüber der enormen Aktivierung der Na^+ -Rückgewinnung über den Darm (s. 3.1.5) eher moderat. Weitere Mechanismen z.B. über andere Hormone, wie ADH sind daher wahrscheinlich.

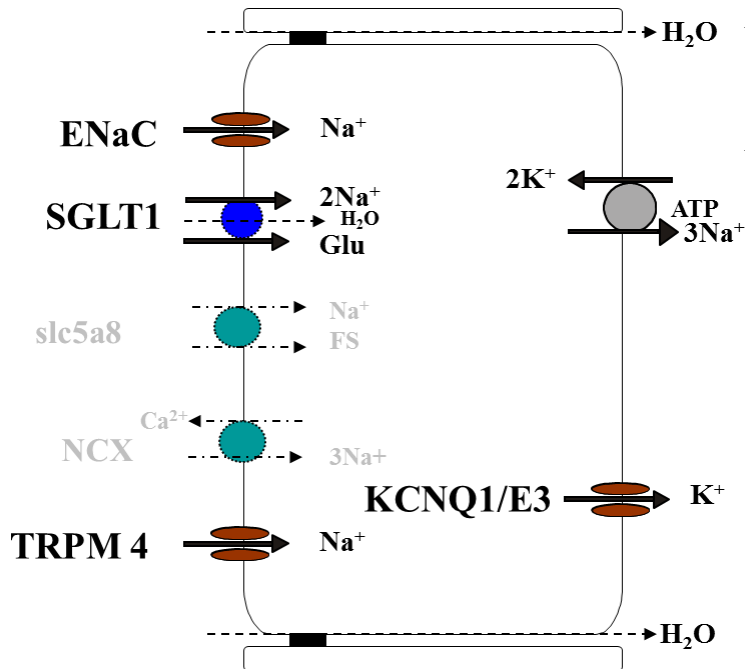


Abb. 37: Schematische Zeichnung eines Zellmodells mit den von uns untersuchten Transportern. Diejenigen, die an der Ausbildung des Amilorid-unabhängigen Stroms beteiligt waren, sind hervorgehoben.

4.3.2 Erhöhte Wasserresorption in den TG unter oraler Na^+ -Depletion

Unter NND zeigten die TG einen massiv erniedrigten Wassergehalt des Kots. Dieses Ergebnis suggerierte eine erhöhte Wasserresorption durch die Epithelzellen des Darms. ADH führt in diesem Zusammenhang auch im distalen Kolon zu einer vermehrten Expression von Aquaporinen. Speziell konnte das im Rattenmodell für den luminalen Einbau von AQP_2 unter der Kontrolle von ADH gezeigt werden [18]. Andere intestinal exprimierte Aquaporine wie AQP_4 und AQP_8 scheinen hingegen nur eine geringe Rolle in der Regulation des fäkalen Wassergehaltes zu spielen [67,72].

Außerdem könnte die erhöhte Na^+ -Absorption die osmotische Triebkraft für die trans- und parazelluläre Wasserresorption erhöhen. Auch die gesteigerte SGLT1-Aktivität kann diesen Mechanismus unterstützen, da der Transporter auch Wassermoleküle simultan transportieren kann [21]. Im distalen Kolon könnte zusätzlich die von Cristia et al. beschriebene perikryptale Myofibroblastenschicht eine Rolle in der Regulation der Kryptenpermeabilität des Kolons spielen, da sie eine Na^+ -Akkumulation um die Krypten herum ermöglicht und so für einen höheren osmotischen Gradienten sorgt. Dieser Prozess ist ebenfalls Aldosteron-abhängig und könnte in unserem Tiermodell zusätzlich eine höhere intestinale Wasserrückgewinnung in den TG ermöglichen [19].

5 Zusammenfassung

Für diese Arbeit wurde ein Mausmodell mit einem AQP₂-abhängigen Knockout des Mineralokortikoidrezeptors (MR) genutzt. Unter Standardbedingungen waren die transgenen Mäuse (TG) lebensfähig und konnten den Na⁺ Verlust über das Sammelrohr unter anderem durch vermehrte Expression des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im Verbindungstubulus kompensieren, da ENaC hier ohne den AQP₂ Promotor noch unter Kontrolle des MR stand.

Kontrolltiere (WT) und TG wurden unter Standarddiät (STD) und natriumarmer Diät (NND) in metabolischen Käfigen untersucht (*in vivo*). Zusätzlich wurden unter beiden Bedingungen *ex vivo* Versuche an isoliertem Kolonpräparaten mit Hilfe der Ussing Kammer Technik durchgeführt.

Durch Gabe von NND (10 Tage) wurde die Na⁺-Homöostase insuffizient und die TG zeigten im Vergleich mit WT eine erhöhte renale Na⁺-Ausscheidung, sowie eine Hyponatriämie und eine Hyperkaliämie. Der Gastrointestinaltrakt war dabei in den TG an der Kompensation des Na⁺-Verlustes beteiligt, da die TG ihre fäkale Ausscheidung fast 8-fach im Vergleich zur STD reduzierten.

Mit Hilfe der Ussing Kammer Technik konnten wir herausfinden, dass die ENaC Expression im distalen Kolon der TG hochreguliert und auf das Coecum ausgedehnt war. Daneben induzierte die NND ein Amilorid-unabhängiges lumen negatives Potenzial in den TG. Dieses Phänomen deutete auf zusätzliche, ENaC unabhängige Na⁺-Aufnahmemechanismen hin. Um herauszufinden welche Transporter an diesem Phänomen beteiligt waren, führten wir Inhibitionsversuche von verschiedenen Kanälen und Transportern durch, die in die Na⁺-Homöostase des Dickdarms integriert sein könnten. Sowohl eine luminale Inhibition des Kationenkanals TRPM4 als auch des natriumabhängigen Glukosetransporters SGLT1 reduzierten den Amilorid-unabhängigen I_{sc} im Coecum der TG um ca. 20%. Daneben fanden wir eine starke Aktivierung des Kaliumkanals KCNQ1/E3 in der basolateralen Membran des Coecums der TG. Diese zusätzliche Hyperpolarisation der basolateralen Membran erlaubte eine höhere Triebkraft für die Na⁺-resorbierenden luminalen Transportvorgänge.

Tiere mit einem sammelrohrspezifischen Knockout des MR zeigen unter NND die typischen Symptome eines dekompensierten Na⁺-Verlust mit fehlender Aldosteron-vermittelter Regulation des Ionentransports im Sammelrohr. Sie sind in der Lage über zusätzliche intestinale Na⁺-Resorptionsmechanismen (Ausdehnung der ENaC Funktion, TRPM4, SGLT1, Erhöhung der Triebkraft) den fäkalen Natriumverlust signifikant zu reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S (2002) Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J.Physiol* 542:3-16
2. Alper SL, Stewart AK, Vandorpe DH, Clark JS, Horack RZ, Simpson JE, Walker NM, Clarke LL (2011) Native and recombinant Slc26a3 (downregulated in adenoma, Dra) do not exhibit properties of 2Cl⁻/1. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 300:C276-C286
3. Asher C, Eren R, Kahn L, Yeger O, Garty H (1992) Expression of the amiloride-blockable Na⁺ channel by RNA from control versus aldosterone-stimulated tissue. *J.Biol.Chem.* 267:16061-65
4. Bankir L, Bichet DG, Bouby N (2010) Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *Am.J.Physiol Renal Physiol* 299:F917-F928
5. Barfull A, Garriga C, Tauler A, Planas JM (2002) Regulation of SGLT1 expression in response to Na(+) intake. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 282:R738-R743
6. Barraclough MA, Guignard JP, Jones NF (1971) Urine concentration during solute diuresis in potassium-depleted rabbits. Evidence for a defect in tubular sodium transport. *J.Physiol* 212:763-75

7. Bartoo AC, Sprunger LK, Schneider DA (2005) Expression and distribution of TTX-sensitive sodium channel alpha subunits in the enteric nervous system. *J.Comp Neurol.* 486:117-31
8. Bautista R, Manning R, Martinez F, vila-Casado MC, Soto V, Medina A, Escalante B (2004) Angiotensin II-dependent increased expression of Na⁺-glucose cotransporter in hypertension. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 286:F127-F133
9. Bergann T, Fromm A, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD (2011) Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na⁺ channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line. *Eur.J.Cell Biol.* 90:432-39
10. Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schutz G (1998) Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:9424-29
11. Bertog M, Cuffe JE, Pradervand S, Hummler E, Hartner A, Porst M, Hilgers KF, Rossier BC, Korbmacher C (2008) Aldosterone responsiveness of the epithelial sodium channel (ENaC) in colon is increased in a mouse model for Liddle's syndrome. *J.Physiol* 586:459-75
12. Beubler E, Juan H (1978) PGE-release, blood flow and transmucosal water movement after mechanical stimulation of the rat jejunal mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 305:91-95

13. Binder HJ, McGlone F, Sandle GI (1989) Effects of corticosteroid hormones on the electrophysiology of rat distal colon: implications for Na⁺ and K⁺ transport. *J.Physiol* 410:425-41
14. Bleich M, Briel M, Busch AE, Lang HJ, Gerlach U, Gogelein H, Greger R, Kunzelmann K (1997) KVLQT channels are inhibited by the K⁺ channel blocker 293B. *Pflugers Arch.* 434:499-501
15. Bleich M, Warth R (2000) The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function. *Pflugers Arch.* 440:202-6
16. Butterworth MB, Edinger RS, Frizzell RA, Johnson JP (2009) Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 296:F10-F24
17. Connell JM, Davies E (2005) The new biology of aldosterone. *J.Endocrinol.* 186:1-20
18. Cristia E, Amat C, Naftalin RJ, Moreto M (2007) Role of vasopressin in rat distal colon function. *J.Physiol* 578:413-24
19. Cristia E, Moreto M, Naftalin RJ (2007) Key role of aldosterone and pericryptal myofibroblast growth in colonic permeability. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 45 Suppl 2:S127-S130
20. Demarex N, Orlowski J, Brisseau G, Woodside M, Grinstein S (1995) The mammalian Na⁺/H⁺ antiporters NHE-1, NHE-2, and NHE-3 are electroneutral and voltage independent, but can couple to an H⁺ conductance. *J.Gen.Physiol* 106:85-111

21. Duquette PP, Bissonnette P, Lapointe JY (2001) Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:3796-801
22. Funder JW (1995) Apparent mineralocorticoid excess, 11beta hydroxysteroid dehydrogenase and aldosterone action Closing one loop, opening another. *Trends Endocrinol.Metab* 6:248-51
23. Garty H, Palmer LG (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 77:359-96
24. Geibel JP (2005) Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu.Rev.Physiol* 67:471-90
25. Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V (2004) Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J.Biol.Chem.* 279:44522-32
26. Grand T, Demion M, Norez C, Mettey Y, Launay P, Becq F, Bois P, Guinamard R (2008) 9-phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br.J.Pharmacol.* 153:1697-705
27. Greger R, Bleich M, Riedemann N, van DW, Ecke D, Warth R (1997) The role of K+ channels in colonic Cl- secretion. *Comp Biochem.Physiol A Physiol* 118:271-75
28. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 85:373-422

29. Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR (2005) On the interaction between amiloride and its putative alpha-subunit epithelial Na⁺ channel binding site. *J.Biol.Chem.* 280:26206-15
30. Klein JD, Frohlich O, Blount MA, Martin CF, Smith TD, Sands JM (2006) Vasopressin increases plasma membrane accumulation of urea transporter UT-A1 in rat inner medullary collecting ducts. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17:2680-2686
31. Kockerling A, Fromm M (1993) Origin of cAMP-dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am.J.Physiol* 264:C1294-C1301
32. Kunzelmann K, Mall M (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev.* 82:245-89
33. Lerche C, Bruhova I, Lerche H, Steinmeyer K, Wei AD, Strutz-Seebohm N, Lang F, Busch AE, Zhorov BS, Seebohm G (2007) Chromanol 293B binding in KCNQ1 (Kv7.1) channels involves electrostatic interactions with a potassium ion in the selectivity filter. *Mol.Pharmacol.* 71:1503-11
34. Leviel F, Hubner CA, Houillier P, Morla L, El MS, Brideau G, Hassan H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Riemondy KA, Miller RL, Hummler E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D (2010) The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J.Clin.Invest* 120:1627-35
35. Li H, Sheppard DN, Hug MJ (2004) Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J.Cyst.Fibros.* 3 Suppl 2:123-26

36. Luft FC (2007) The renin-angiotensin and "drinking" behavior. *J.Mol.Med.(Berl)* 85:1043-45
37. Mate A, Barfull A, Hermosa AM, Gomez-Amores L, Vazquez CM, Planas JM (2006) Regulation of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in the intestine of hypertensive rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 291:R760-R767
38. Murakami M, Xu F, Miyoshi I, Sato E, Ono K, Iijima T (2003) Identification and characterization of the murine TRPM4 channel. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 307:522-28
39. Musch MW, Lucioni A, Chang EB (2008) Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na⁺ pump activity. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 295:G909-G919
40. Naftalin RJ (2008) Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. *Biophys.J.* 94:3912-23
41. Naftalin RJ, Pedley KC (1999) Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J.Physiol* 514 (Pt 1):211-27
42. Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 82:205-44
43. Palmer LG, Andersen OS (1989) Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore. *Biophys.J.* 55:779-87

44. Panayotova-Heiermann M, Wright EM (2001) Mapping the urea channel through the rabbit Na(+)-glucose cotransporter SGLT1. *J.Physiol* 535:419-25
45. Pandey KN (2005) Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 26:901-32
46. Pech V, Kim YH, Weinstein AM, Everett LA, Pham TD, Wall SM (2007) Angiotensin II increases chloride absorption in the cortical collecting duct in mice through a pendrin-dependent mechanism. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 292:F914-F920
47. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38:233-52
48. Ronzaud C, Loffing J, Bleich M, Gretz N, Grone HJ, Schutz G, Berger S (2007) Impairment of sodium balance in mice deficient in renal principal cell mineralocorticoid receptor. *J.Am.Soc.Nephrol.* 18:1679-87
49. Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E (2002) Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu.Rev.Physiol* 64:877-97
50. Ruster C, Wolf G (2006) Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17:2985-91
51. Sausbier M, Matos JE, Sausbier U, Beranek G, Arntz C, Neuhuber W, Ruth P, Leipziger J (2006) Distal colonic K(+) secretion occurs via BK channels
9. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17:1275-82

52. Schmidt RF, Lang F (2007) *Physiologie des Menschen*. 721-736. Springer, Heidelberg.
53. Schultheiss G, Diener M (1998) K⁺ and Cl⁻ conductances in the distal colon of the rat. *Gen.Pharmacol.* 31:337-42
54. Schultheiss G, Ribeiro R, Schafer KH, Diener M (2003) Activation of apical K⁺ conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: fast and slow components. *J.Membr.Biol.* 195:183-96
55. Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, Warth R, Goldschmidt I, Peters J, Schutz G, Greger R, Bleich M (2001) Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflugers Arch.* 443:297-305
56. Seip G, Schultheiss G, Kocks SL, Diener M (2001) Interaction between store-operated non-selective cation channels and the Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger during secretion in the rat colon. *Exp.Physiol* 86:461-68
57. Siegl PK, Cragoe EJ, Jr., Trumble MJ, Kaczorowski GJ (1984) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:3238-42
58. Smith L, Smith JB (1994) Regulation of sodium-calcium exchanger by glucocorticoids and growth factors in vascular smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 269:27527-31
59. Strange K (2004) Cellular volume homeostasis. *Adv.Physiol Educ.* 28:155-59

60. Strutz-Seebohm N, Henrion U, Steinke K, Tapken D, Lang F, Seebohm G (2009) Serum- and glucocorticoid-inducible kinases (SGK) regulate KCNQ1/KCNE potassium channels. *Channels (Austin.)* 3:88-90
61. Takata K (1996) Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J.Electron Microsc.(Tokyo)* 45:275-84
62. Takebe K, Nio J, Morimatsu M, Karaki S, Kuwahara A, Kato I, Iwanaga T (2005) Histochemical demonstration of a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids (slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse. *Biomed.Res.* 26:213-21
63. Ussing HH, Zerahn K (1999) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from *Acta. Physiol. Scand.* 23: 110-127, 1951. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10:2056-65
64. Vazquez CM, Coletto R, Zanetti R, Ruiz-Gutierrez V (1996) Increased sodium-dependent D-glucose transport in the jejunal brush-border membrane of spontaneously hypertensive rat. *Pflugers Arch.* 432:329-35
65. Vennekens R, Nilius B (2007) Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb.Exp.Pharmacol.* 269-85
66. Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M (2007) Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat.Immunol.* 8:312-20

67. Wang KS, Ma T, Filiz F, Verkman AS, Bastidas JA (2000) Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 279:G463-G470
68. Wang T, Giebisch G (1996) Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am.J.Physiol* 271:F143-F149
69. Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, Frizzell RA (1982) Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218:1219-21
70. Wiemuth D, Lott JS, Ly K, Ke Y, Teesdale-Spittle P, Snyder PM, McDonald FJ (2010) Interaction of serum- and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) with the WW-domains of Nedd4-2 is required for epithelial sodium channel regulation. *PLoS.One.* 5:e12163
71. Winther SA, Egfjord M (2011) [The effect of aldosterone A on renal potassium excretion]. *Ugeskr.Laeger* 173:126-29
72. Yang B, Song Y, Zhao D, Verkman AS (2005) Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 288:C1161-C1170
73. Yoshikawa T, Inoue R, Matsumoto M, Yajima T, Ushida K, Iwanaga T (2011) Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem.Cell Biol.* 135:183-94

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
Amil	Amilorid
Amlu	Amilorid, luminal gegeben
ATI/ATII	AngiotensinI/II
ATP	Adenosintriphosphat
AQP ₂	Aquaporin 2
BGA	Blutgasanalyse
BE	Basenexzess
CA	Carboanhydrase
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Cl ⁻ -Kanal (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
C _{H2O}	Frei-Wasser-Clearance
CNT	Verbindungsstück
C _{Osmo}	Osmotische Clearance
Cre	Cre-Rekombinase
CD	Sammelrohr
C _x	Clearance für den Stoff X
DCT	Distales Konvolut
ENaC	Epithelialer Natrium Kanal
FA	Fäkale Ausscheidung
FE	Fraktionelle Ausscheidung
FS	Fettsäure
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glukose
Hkt	Hämatokrit
gKG	Gramm Körpergewicht
I _{sc}	Äquivalenter Kurzschlussstrom ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
KCNE3	Kaliumkanal (β -Untereinheit)
KCNQ1	Kaliumkanal (α -Untereinheit)
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ -Cotransporter
NND	Niedrig-Natrium-Diät
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PT	Proximaler Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
R _{te}	Transepithelialer Widerstand ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)

SGK	Serum- und Gukokortikoid-regulierte Kinase
SGLT1	Na ⁺ /Glu-Cotransporter Typ 1
slc5a8	Na ⁺ /Fettsäuren-Cotransporter
STD	Standarddiät
Osmo	Osmolalität
OT	Objektträger
TAL	Dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife
TG	Maus, transgen (Allele: flox/flox; cre/wildtyp)
TRPM4	Kationenkanal (transient receptor potential melastatin 4)
TTX	Tetrodotoxin
Urea	Harnstoff
V	Vena, Vene
V _{te}	Transepitheliales Potenzial (mV)
WT	Maus, Kontrolle (Allele: flox/flox; wildtyp/wildtyp)

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Bleich für die freundliche Überlassung des Themas und für die sehr engagierte und umfassende Betreuung bzgl. der wissenschaftlichen Datengewinnung, Ergebnisinterpretation und Erstellung dieser Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. med. Nina Himmerkus für die großartige und unermüdliche Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit und noch darüber hinaus.

Dr. rer. nat. Kerstin Suffrian, Dipl. biol. Wiebke Holtmann, Dipl. biol. Sandra Grüssel und Dr. rer. nat. Magda Gutowska danke ich für die Hilfe bei „Windows-induzierten“ und anderen Problemen und für bereichernde Gespräche, die nicht nur wissenschaftlicher Natur waren.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der CAU und besonders der AG Bleich für eine sehr gute und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ich danke außerdem ...

... Prof. Dr. med. Paul Steels für viele fruchtbare Diskussionen, die meine Arbeit sehr prägten.

... Thomas Stegmann für die Hilfe bei der Mausgenotypisierung und das Bereitstellen vieler Experimentallösungen.

... der AG Berger des Krebsforschungszentrums Heidelberg für die freundliche Bereitstellung des Mausmodells.

... und last but not least: meiner Familie und meinen Freunden für die passende Unterstützung und Ablenkung zur richtigen Zeit.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 18.08.1983
Geburtsort Linnich

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2011 **Universitätsklinikum Knappschafts Krankenhaus Bochum**
Assistenzärztin Innere Medizin

Studium

05/2011 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2007-05/2011 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt
09/2006-03/2007 **Universidade de Coimbra, Portugal**
Auslandssemester
08/2006 **Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004-08/2006 **Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**
Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt

Promotion

03/2008 **Beginn der Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Thema: *Intestinale Kompensationsmechanismen in Mäusen mit einem AQP₂-Promoter-abhängigen Knockout des Mineralokortikoidrezeptors*
(Betreuer: Prof. Dr. M. Bleich, Dr. N. Himmerkus)

Praktisches Jahr

10/2010-01/2011 **Westküstenklinikum Heide**
Chirurgie, 3. Tertial des Praktischen Jahres
08/2010-10/2010 **Universitätsklinikum Kiel**
Humangenetik, 2. Tertial des Praktischen Jahres (gesplittet)
06/2010-08/2010 **Städtisches Krankenhaus Kiel**
Pädiatrie, 2. Tertial des Praktischen Jahres (gesplittet)
02/2010-06/2010 **2. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Kiel**
Innere Medizin, 1. Tertial des Praktischen Jahres

Famulaturen

10/2009	Städtisches Krankenhaus Kiel Pädiatrie
08/2009	Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. B. Schmidt, Kiel
09/2008	2. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Kiel Hämatologie/Onkologie
09/2007	Universitätsklinikum Posen, Polen Kardiologie
08/2007	Hermann-Josef-Krankenhaus, Erkelenz Gynäkologie

Außeruniversitäre Aktivitäten

03/2005-heute	Friedensorganisation „pax christi“, Aachen Ehrenamtliches Engagement mit dem Schwerpunkt Friedensdienste
09/2003-10/2004	Heim für behinderte Männer in Bobrek, Polen Ehrenamtlicher Friedensdienst

Schulbildung

09/1994-06/2003	Cornelius-Burgh-Gymnasium, Erkelenz Allgemeine Hochschulreife
-----------------	---

7.4 Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

V. Trzeciak (2010) Abenteuer Doktorarbeit. Physiologisch 10. 2-3.

N. Himmerkus, V. Trzeciak, M. Bleich

Intestinal compensation in principal cell specific MR deficient mice

In Vorbereitung.

Kongressbeiträge:

N. Himmerkus, V. Trzeciak, C. Ronzaud, Q. Shan, S. Berger, G. Schütz, M. Bleich

New findings from a high aldosterone mouse model

41st Meeting on Membrane Transport at Sandbjerg, Denmark

V. Trzeciak, N. Himmerkus, M. Bleich

Intestinal compensation mechanisms in mice with a collecting duct principal cell specific knockout of the mineralocorticoid receptor

Acta Physiologica March 2009 195 (Supplement 669): S. 69

V. Trzeciak, N. Himmerkus, M. Bleich

Intestinal compensation in mice with principal cell MR deficiency

14. Treffen der Ostseephysiologen Mai 2009, Vortrag

7.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den 19. 01. 2013