

# **Phänotypisierung der tubulären Deletion von mTORC1 und mTORC2**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Rörden, Malte Carl

2016

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm

für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Aufgaben und Bau der Niere.....	1
1.2 Das Tubulussystem.....	2
1.3 Regulation tubulärer Funktionen.....	5
1.4 mTOR ( <u>m</u> ammalian <u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin).....	6
1.5 mTOR-Komplex 1 (mTORC1).....	7
1.5.1 Begleitproteine von mTOR in mTORC1.....	9
1.5.2 Regulation von mTORC1.....	10
1.6 mTOR-Komplex 2 (mTORC2).....	11
1.6.1 Regulation von mTORC2.....	12
1.7 Interaktionen zwischen mTORC1 und mTORC2.....	12
1.8 mTOR in der Niere .....	13
1.8.1 mTOR im Glomerulum.....	13
1.8.2 mTOR im Tubulusepithel.....	14
1.9 Fragestellung der Arbeit.....	17
2 Materialien und Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Medikamente.....	18
2.1.3 Biosubstanzen.....	19
2.1.4 Lösungen.....	19
2.1.5 Hergestellte Lösungen.....	19
2.1.6 Standardfutter und Spezialdiäten.....	20
2.1.7 Testkits.....	20
2.1.8 Laborequipment.....	21
2.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.10 Software.....	22

2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Versuchstiere als Modellorganismus.....	23
2.2.2 Haltung der Versuchstiere.....	25
2.2.3 Genehmigung der Versuchstierhaltung.....	25
2.2.4 Versuchsdurchführung und Probengewinnung.....	26
2.2.4.1 Metabolische Käfige.....	26
2.2.4.2 Narkose.....	26
2.2.4.3 Blutentnahme und Hämatokritbestimmung.....	27
2.2.4.4 Intraperitoneale Injektionen.....	27
2.2.5 Messung von Elektrolytkonzentrationen in Urin und Plasma.....	28
2.2.6 Glucose-Messung im Urin.....	31
2.2.7 Harnstoff-Messung im Plasma.....	32
2.2.8 Kreatinin-Messung im Urin.....	33
2.2.9 Albumin-Messung in Urin und Plasma.....	34
2.2.10 Seriendesigns .....	35
2.2.10.1 Kontrolle.....	35
2.2.10.2 Diuretikaapplikationen.....	35
2.2.10.3 Diabetesinduktion.....	37
2.2.10.4 Albuminbelastung.....	38
2.2.11 Bestimmung des Nierengewichts.....	39
2.2.12 Statistische Auswertung.....	39
 3 Ergebnisse.....	 40
3.1 Daten unter Kontrollbedingungen.....	40
3.1.1 Gewicht.....	40
3.1.2 Nahrungsaufnahme.....	42
3.1.3 Trinkmenge.....	43
3.1.4 Urinmenge.....	44
3.1.5 Elektrolythaushalt.....	45
3.1.5.1 Elektrolytkonzentrationen im Plasma.....	45
3.1.5.2 Elektrolytausscheidung im Urin.....	47
3.1.6 Tubuläre Nährstoffresorption.....	49

3.1.6.1	Glucose.....	49
3.1.6.2	Aminosäuren.....	50
3.1.6.3	Albumin.....	52
3.1.7	Globale Nierenfunktionsparameter.....	53
3.1.7.1	Harnstoff im Plasma.....	53
3.1.7.2	Nierengewicht.....	54
3.1.8	Hämatokrit.....	55
3.2	Diuretika-Applikation.....	56
3.2.1	Gewichtsverlust unter Diuretikaapplikation.....	56
3.1.2	Plasma-Harnstoff nach Diuretikaapplikation.....	58
3.3	Diabetesinduktion.....	59
3.3.1	Blutzucker nach Diabetesinduktion.....	59
3.3.2	Mortalität.....	60
3.3.3	Nahrungsaufnahme nach Diabetesinduktion.....	61
3.3.4	Trinkmenge nach Diabetesinduktion.....	62
3.3.5	Urinmenge nach Diabetesinduktion.....	63
3.3.6	Elektrolythaushalt nach Diabetesinduktion.....	64
3.3.6.1	Plasmaelektrolyte nach Diabetesinduktion.....	64
3.3.6.2	Urin-Elektrolytausscheidungen nach Diabetesinduktion.....	67
3.3.7	Albuminausscheidung nach Diabetesinduktion.....	69
3.3.8	Globale Nierenfunktionsparameter nach Diabetesinduktion..	70
3.3.8.1	Plasma-Harnstoff.....	70
3.3.8.2	Nierengewicht nach Diabetesinduktion.....	71
3.4	Albuminbelastung.....	72
3.4.1	Plasma-Albumin.....	72
3.4.2	Albuminurie.....	73
4	Diskussion.....	74
4.1	Proximal-tubuläre Dysfunktion.....	74
4.2	Elektrolyt- und Wasserhaushalt.....	79
4.3	Tubulärer Nährstoffverlust und Wachstum.....	82
4.4	Nierenwachstum.....	83
4.5	Gesteigerte Toxinsensibilität.....	84

4.6 Interaktionen zwischen den Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2.....	85
4.7 Vergleich mit therapeutischen mTOR-Inhibitoren.....	86
4.8 Ausblick.....	87
5 Zusammenfassung.....	88
6 Literaturverzeichnis.....	89
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	101
Veröffentlichungen.....	102
Danksagung.....	103
Lebenslauf.....	104
Anhang.....	105

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Nephron und Nierenquerschnitt.....	2
Abbildung 1.2	mTORC1 im zellulären Stoffwechsel.....	9
Abbildung 1.3	mTOR Signalling.....	12
Abbildung 2.1	Tubuläre Genexzision.....	24
Abbildung 2.2	Standardisierter Serienablauf.....	26
Abbildung 2.3	Angriffspunkte der eingesetzten Diuretika.....	36
Abbildung 3.1	Körpergewicht unter Kontrollbedingungen.....	41
Abbildung 3.2	Nahrungsaufnahme unter Kontrollbedingungen.....	42
Abbildung 3.3	Trinkmenge unter Kontrollbedingungen.....	43
Abbildung 3.4	Urinmenge unter Kontrollbedingungen.....	44
Abbildung 3.5	Plasmaelektrolytkonzentrationen unter Kontrollbedingungen.....	46
Abbildung 3.6	Urin-Elektrolytausscheidung unter Kontrollbedingungen.....	48
Abbildung 3.7	Glucoseausscheidung unter Kontrollbedingungen.....	49
Abbildung 3.8	Aminosäureausscheidung unter Kontrollbedingungen.....	51
Abbildung 3.9	Albuminausscheidung unter Kontrollbedingungen.....	52
Abbildung 3.10	Plasmaharnstoff unter Kontrollbedingungen.....	53
Abbildung 3.11	Nierengewicht unter Kontrollbedingungen.....	54
Abbildung 3.12	Hämatokrit unter Kontrollbedingungen.....	55
Abbildung 3.13	Gewichtsverlust unter Diuretikatherapie.....	57
Abbildung 3.14	Plasmaharnstoff nach Diuretikatherapie.....	58
Abbildung 3.15	Blutzuckerverlauf.....	59
Abbildung 3.16	Mortalität nach Diabetesinduktion.....	60
Abbildung 3.17	Nahrungsaufnahme nach Diabetesinduktion.....	61
Abbildung 3.18	Trinkmenge nach Diabetesinduktion.....	62
Abbildung 3.19	Urinmenge nach Diabetesinduktion.....	63
Abbildung 3.20	Plasmaelektrolytkonzentrationen nach Diabetesinduktion.....	66



Abbildung 3.21	Urin-Elektrolytausscheidung nach Diabetesinduktion.....	68
Abbildung 3.22	Albuminausscheidung nach Diabetesinduktion.....	69
Abbildung 3.23	Plasmaharnstoff nach Diabetesinduktion.....	70
Abbildung 3.24	Nierengewichtszunahme nach Diabetesinduktion.....	71
Abbildung 3.25	Plasmaprotein vor und nach Albuminbelastung.....	72
Abbildung 3.26	Albuminausscheidung nach Albuminbelastung.....	73
Abbildung 4.1	Albuminurie durch mTOR-Inhibition.....	77

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 2.2	Verwendete Medikamente.....	18
Tabelle 2.3	Verwendete Biosubstanzen.....	19
Tabelle 2.4	Verwendete Lösungen.....	19
Tabelle 2.5	Standardfutter und Spezialdiäten.....	20
Tabelle 2.6	Verwendete Testkits.....	20
Tabelle 2.7	Eingesetztes Laborequipment.....	21
Tabelle 2.8	Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 2.9	Verwendete Software.....	22
Tabelle 2.10	Versuchstiere.....	25
Tabelle 2.11	Konzentrationsbestimmung der Elektrolyte Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> und Ca <sup>2+</sup> .....	28
Tabelle 2.12	Konzentrationsbestimmung von Mg <sup>2+</sup> .....	29
Tabelle 2.13	Konzentrationsbestimmung von Phosphat.....	30
Tabelle 2.14	Konzentrationsbestimmung von Glucose.....	31
Tabelle 2.15	Konzentrationsbestimmung von Harnstoff.....	32
Tabelle 2.16	Konzentrationsbestimmung von Kreatinin.....	33
Tabelle 2.17	Konzentrationsbestimmung von Albumin.....	34
Tabelle 2.18	Datenerhebung unter Kontrollbedingungen.....	35
Tabelle 2.19	Verwendete Diuretika.....	35
Tabelle 2.20	Ablauf der Diuretikaversuche.....	36
Tabelle 2.21	Diabetesinduktion und Datenerhebung.....	37
Tabelle 2.22	Albuminbelastung und Datenerhebung.....	38

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt/PBK	Proteinkinase B
AMN	Megalin, Cubilin und Amnionless
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BZ	Blutzucker
CAD	Carbamoyl-Phosphat-Synthetase 2 / Dihydroorotase
Deptor	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECaC	epithelialer Calciumkanal
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
GLUT2	Glucose-Transporter 2
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GβL	G-protein β-subunit like protein
IRS1	Insulin Rezeptorsubstrat 1
i.p.	intraperitoneal
kDA	Kilodalton
KO	Knock-Out
LKB1	liver kinase B1
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mSIN	mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1
mRNA	mitochondriale RNA
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1/2	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NKCC2	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> - Symporter

PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC $\alpha$	Proteinkinase C
PRAS40	proline-rich AKT1 substrate 40
PRR5	proline rich protein 5
p.i.	post inductionem
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rap <sup>-/-</sup>	tubulärer Raptor (mTORC1) - Knockout
Rap <sup>-/-</sup> Ric <sup>-/-</sup>	tubulärer Raptor (mTORC1) und Rictor (mTORC1) - Knockout
Ric <sup>-/-</sup>	tubulärer Rictor (mTORC1) - Knockout
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	renal outer medullary potassium channel
rtTA	reverse tetracycline-controlled transactivator
SGK1	Serum und Glucocorticoid-regulierte Kinase 1
SGLT 1/2	sodium-glucose linked transporter 1/2
sog.	sogenannte(r)
SREBP1/2	sterol regulatory element-binding protein 1/2
STZ	Streptozotocin
Syn.	Synonym
S6K1	S6 Kinase 1
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
TAL	tall ascending limb
TSC 1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
4E-BP1	4E-bindendes Protein 1

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

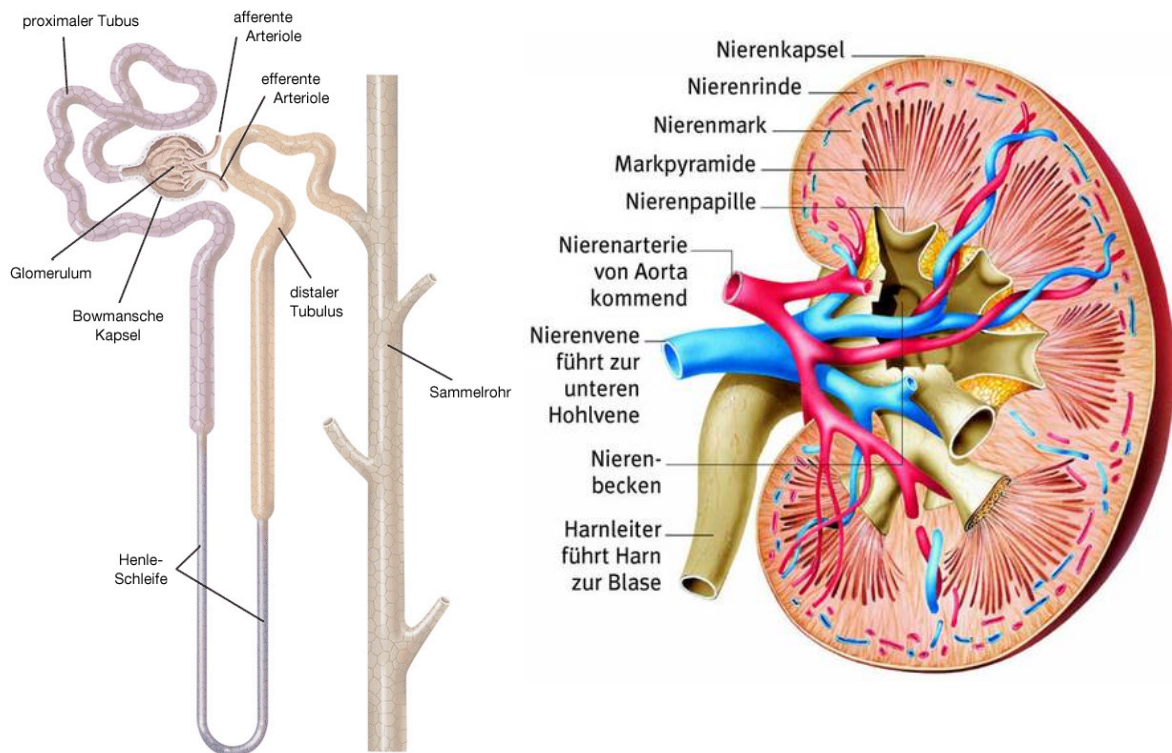
# 1 Einleitung

## 1.1 Aufgaben und Bau der Niere

Die Nieren sind als harnbildendes Organ im Harnsystem des Menschen paarig im Retroperitoneum angelegt. Neben ihrer Ausscheidungsfunktion hat die Niere eine zentrale Stellung in der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, des Säure-Basen-Haushaltes sowie des Blutdruckes inne [1]. Über die Bildung von Erythropoetin sowie den Abbau und die Modifikation von Hormonen ist die Niere zusätzlich in eine Vielzahl weiterer Regelkreisläufe integriert und beeinflusst dabei die Hämatopoese, den Knochenstoffwechsel und den Calcium-Phosphat-Haushalt [1, 2].

Das Nephron (Abb. 1.1) stellt die funktionelle Grundeinheit der Niere dar. Die Bildung des Endharns erfolgt in den Nephronen stark vereinfacht in zwei Schritten. Zunächst wird ein Teil des über die zuführenden Blutgefäße strömenden Blutvolumens in den Glomeruli, einem dichten Gefäßknäuel das von spezialisierten, einen Filter bildenden Zellen (sog. Podozyten) umgeben wird, filtriert und gelangt in die Bowman'sche Kapsel. Von hier gelangt dieses Ultrafiltrat - auch als Primärharn bezeichnet - in das aus proximalem Tubulus, Henle'scher Schleife, distalem Tubulus und Sammelrohr bestehende Tubulussystem. Beim Transport durch dieses System wird der Primärharn von spezialisierten Tubulusepithelzellen durch Reabsorption und Sekretion weiter verändert. Der so entstehende Endharn wird im Nierenbecken gesammelt und über den Harnleiter zur Blase geleitet [1].

Makroskopisch ist die Niere in Rinde (Cortex) und das aus den Markpyramiden bestehende Mark (Medulla) gegliedert. Während die das Blut filternden Glomeruli in der Nierenrinde liegen, durchzieht das Tubulussystem in spezifischer Weise das Nierenmark und mündet hier zuletzt in den Nierenpapillen.



**Abbildung 1.1 - Nephron und Nierenquerschnitt:** Schematische Darstellung eines Nephrons mit Glomerulum, proximalem Tubulus, Henle'scher Schleife, distalem Tubulus und Sammelrohr [3] sowie Querschnitt der Niere mit Gliederung in Markpyramiden und Rinde [4].

## 1.2 Das Tubulussystem

Aufgabe des Tubulusepithels ist es, über Reabsorption und Sekretion den in den Glomeruli entstehenden Primärharn so zu verändern, dass ein den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt des Organismus im Gleichgewicht haltender Endharn ausgeschieden wird. Stoffwechselendprodukte und andere Substanzen müssen dabei ausgeschieden und die Elektrolyt- und Wasserausscheidung exakt an gegebene Stoffwechselbedingungen angepasst werden. Um diese Funktionen zu erfüllen, sind die Tubulusepithelzellen entlang der Tubulusabschnitte funktionell und strukturell spezialisiert. Während in proximalen Tubulusabschnitten vor allem die Rückresorption eines Großteils des filtrierten Wassers und wertvoller Substanzen wie Nährstoffen stattfindet, sind weiter

distal gelegene Tubulusabschnitte besonders für die Feineinstellung der Elektrolyt- und Wasserausscheidung verantwortlich [5].

### *Proximaler Tubulus*

Das Ultrafiltrat aus den Glomeruli gelangt über die Bowman'sche Kapsel zunächst in den aus einem gewundenen (Pars convoluta) und einem geraden Anteil (Pars recta) bestehenden proximalen Tubulus. Hauptaufgabe des proximalen Tubulus ist die quantitative Rückresorption von Elektrolyten und Wasser, Aminosäuren und filtrierten Proteinen sowie Glucose [5]. Um diese enorme Transportkapazität leisten zu können, ist die luminal Oberfläche der Epithelzellen im proximalen Tubulus durch tausende Mikrovilli je Zelle - in ihrer Gesamtheit als Bürstensaum bezeichnet - zur Verankerung von Transportkanälen und luminalen Enzyme auf ein Vielfaches vergrößert [6].

Die Natriumresorption ist eine grundlegende Aufgabe des proximalen Tubulus und viele weitere Transportprozesse sind an diese gekoppelt. Durch basolateral gelegene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen wird ein stetiger, nach intrazellulär gerichteter Natriumgradient aufrecht erhalten. Dieser Gradient wird genutzt, um Natrium sowie daran gekoppelte Substanzen aus dem Lumen in die Tubuluszellen zu transportieren. Bei den meisten Transportprozessen des proximalen Tubulus handelt es sich um solch sekundär-aktive Prozesse. Die sehr hohe Mitochondriendichte stellt das histologische Korrelat für diese energieaufwendigen Resorptionsvorgänge dar [5, 6].

Die Wasserresorption ist durch entstehende osmotische Ausgleichsströmungen an die Natriumresorption gekoppelt. Weitere Elektrolyte (v.a. Chlorid) werden durch das transepitheliale Potential, das durch die Resorption der positiv geladenen Natriumionen entsteht sowie durch die Ausgleichsströmungen vor allem parazellulär (sog. „solvent drag“) reabsorbiert [7-10]. Auch Phosphat wird überwiegend im proximalen Tubulus rückresorbiert. Von den hieran beteiligten Transportern stellt der Subtyp IIa, der Phosphat im Symport mit drei Natriumionen ( $3\text{Na}^+ \text{HPO}_4^{2-}$ -Symport) resorbiert den wichtigsten Vertreter dar [11, 12]. Freie Aminosäuren und frei filtrierte kleinmolekulare Proteine < 70kDa werden im proximalen Tubulus nahezu vollständig rückresorbiert. Die Membranproteine

## Einleitung

Megalin, Cubilin und Amnionless (AMN) vermitteln die endozytotische Aufnahme der Proteine, welche in der Zelle abgebaut und recycled werden [13]. Freie Aminosäuren werden über eine Vielzahl verschiedener Aminosäuretransporter in der luminalen Membran aufgenommen [8, 14-18]. Auch Glucose wird bis zu einem Schwellenwert (sog. Nierenschwelle) im proximalen Tubulus vollständig rückresorbiert. Hierfür sind Glucosetransporter, die Glucose im Symport mit Natrium in die Zelle transportieren (*sodium-glucose linked transporter*, SGLT1 und SGLT2) [10, 19] verantwortlich.

Neben Resorptionsprozessen findet im proximalen Tubulus auch die aktive Sekretion von Substanzen statt, die basolateral aus dem Plasma aufgenommen und nach luminal sezerniert werden. Zu diesen Substanzen gehören unter anderem viele Medikamente, wie beispielsweise Diuretika.

### *Henle'sche Schleife*

Die Henle'sche Schleife wird aus dem geraden Anteil des proximalen Tubulus, dem Intermediärtubulus und dem geraden Anteil des distalen Tubulus gebildet [6]. Hauptaufgabe dieses Nephronabschnittes ist die Harnkonzentrierung durch Schaffung eines interstiell hyperosmolaren Nierenmarks. Der Aufbau einer hohen interstitiellen Osmolarität im Nierenmarks dient als treibende Kraft für den transzellulären Transport von Wasser über Aquaporine in den Sammelrohrzellen [5]. Zudem werden die Kationen Magnesium und Calcium vorrangig in diesem Nephronabschnitt resorbiert.

Im wasserundurchlässigen, dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife findet eine sekundär-aktive Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  aus dem Lumen statt. In diesem Nephronabschnitt ist dabei ein apikaler  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kanal (NKCC2) von zentraler Bedeutung. Während Natrium und Chlorid über basolaterale Kanäle ins Interstitium gelangen, rezirkuliert Kalium zurück in das Lumen, um die Resorption weiter aufrecht zu erhalten. Die effektive Resorption von je einem  $\text{Na}^+$ - und zwei  $\text{Cl}^-$ -Ionen führt zum Aufbau eines luminal positiven, transzellulären elektrischen Gradienten, der zum parazellulären Ausstrom von Kationen (insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) aus dem Lumen führt.



Die Harnstoffkonzentrierung im Nierenmark wird durch die unterschiedliche Harnstoffpermeabilität der Tubulusabschnitte ermöglicht und erlaubt eine weitere Anhebung des kortikomedullären Osmolaritätsgradienten. Das Gegenstromprinzip und die geringe Durchblutung des Nierenmarks verhindern schließlich ein Auswaschen der aufgebauten Osmolarität [5].

### *Distaler Tubulus und Sammelrohr*

Der distale Tubulus, der wie der proximale Tubulus aus einer Pars recta und einer Pars convoluta besteht, stellt den letzten Nephronabschnitt dar und ist über ein kurzes Verbindungsstück mit dem Sammelrohr, in das viele tausende Einzelnephrone münden verbunden [6].

Im distalen Tubulus findet eine weitere Natrium- und Chloridresorption über  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ -Symporter in der apikalen Membran, wiederum angetrieben durch basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen, statt [5, 20]. Auch  $\text{Ca}^{2+}$  (über epitheliale Calciumkanäle, *EcaC* [21]) und  $\text{Mg}^{2+}$  (über TRPM6-Magnesium-Kanäle [22]) werden hier nochmals resorbiert. Ab dem späten distalen Tubulus und im Sammelrohr wird die Natrium- und Wasserresorption zur Feineinstellung der Diurese hormonell reguliert. Aldosteron steigert hier durch die Induktion von epithelalen Natriumkanälen (*ENaC*) [5] und ROMK-Kaliumkanälen (*Renal Outer Medullary K<sup>+</sup> channel*) [23] die  $\text{Na}^+$ -Resorption sowie die  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Sekretion. ADH (*Antidiuretisches Hormon*) vermittelt im Sammelrohr den Einbau von Aquaporinen in die luminale Membran und bestimmt dadurch, inwieweit Wasser transzellulär aus dem Lumen in das hypertone Interstitium des Nierenmarks strömen kann [5].

Darüber hinaus ist das Sammelrohr an der renalen Regulation des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt [5, 24].

### **1.3 Regulation tubulärer Funktionen**

In der Niere findet eine intrinsische sowie hormonelle Regulation der Tubulusfunktion statt. Der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus erlaubt eine Anpassung der glomerulären Filtration an die tubuläre Resorptionsleistung. Osmosensorische, juxtaglomeruläre Zellen in der Macula densa messen hierzu

die luminalen  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  - Konzentration im distalen Tubulus, um bei unzureichender Resorptionsleistung die glomeruläre Filtration durch Vasokonstriktion des Vas afferens zu drosseln [25, 26].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) dient vorwiegend der Blutdruckeinstellung und ist an der Schnittstelle zwischen intrinsischer und extrinsischer Nierenregulation zu sehen. Spezialisierte juxtaglomeruläre Zellen reagieren auf eine Abnahme des renalen Perfusionsdrucks mit der Ausschüttung von Renin. Dieses katalysiert die Bildung von Angiotensin I aus hepatisch gebildetem Angiotensinogen, was im Blutkreislauf rasch zu Angiotensin II - einem sehr potenten Vasokonstriktor - gespalten wird.

Angiotensin II stimuliert zudem die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere. Aldosteron stimuliert wiederum die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr, was zu einer Steigerung des Extrazellulärvolumens und einer weiteren Blutdrucksteigerung führt [27, 28].

Das Peptidhormon ADH wird als Reaktion auf eine gesteigerte Blutosmolarität aus dem Hypophysenhinterlappen freigesetzt und fördert in der Niere den Einbau von Aquaporinen in die Membran der Zellen im distalen Tubulus und Sammelrohr. Dies führt über einem Anstieg der Wasserresorption zu einer Minderung der Diurese [5, 29].

### **1.4 mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)**

Das *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Kinase die an der Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse wie dem Zellwachstum, Metabolismus und der Proteinbiosynthese beteiligt ist [30]. Das 289 kDa große, evolutionär hoch konservierte Protein kann in allen eukaryontischen Zellen angetroffen werden und ist als zentraler Bestandteil zweier strukturell und funktionell distinkter intrazellulärer Proteinkomplexe (mTORC1 und mTORC2) in eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen zur Vermittlung extra- und intrazellulärer Signale eingebunden [31].

Die zufällige Entdeckung der antifungalen Substanz Rapamycin aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* stellte in den 1970er Jahren den ersten Schritt auf dem Weg zur Identifizierung mTORs dar. Nachdem auffiel, dass

diese Substanz auch immunsuppressive Eigenschaften inne hat, wurde deren Wirkmechanismus untersucht und schließlich das Zielmolekül von Rapamycin - folglich ‚*target of rapamycin*‘ (TOR) genannt - identifiziert [32]. Heute ist mTOR nicht zuletzt dank seiner klinischen Relevanz Gegenstand breiter Forschungsbemühungen. Diese erschließt sich im Besonderen aus der Vermittlung zellulärer Wachstumssignale in der Karzinogenese, der pathogenetischen Relevanz für verschiedenste weitere Erkrankungen und der spezifischen Hemmbarkeit durch Rapamycin und weitere Pharmaka [33]. Die Anwendungsgebiete von Therapeutika mit dem Zielmolekül mTOR umfassen hierbei neben der Tumorthherapie auch die therapeutische Immunsuppression und die Prophylaxe von Stentstenosierungen durch antiproliferative Beschichtungen.

### **1.5 mTOR-Komplex 1 (mTORC1)**

mTORC1 wird neben der Kinase mTOR aus den Proteinen Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), mLST8/GβL (*mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein*), LST8 (*lethal with sec thirteen 8*), PRAS40 (*proline-rich AKT1 substrate 40*) und Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) gebildet [34].

mTORC1 fungiert als zentraler molekularer Integrator einer Vielzahl extra- und intrazellulärer Signale, um zelluläre Prozesse wie die Transkription, Proteinbiosynthese und das Zellwachstum zu steuern [31, 35]. Übergeordnete Signale wie Wachstumsfaktoren, das Nährstoffangebot sowie der zelluläre Energiehaushalt modulieren die Aktivität von mTORC1 in der Vermittlung dieser anabolen Zellfunktionen [36].

Zu den zentralen Funktionen von mTORC1 gehört die Induktion der zellulären Proteinsynthese. Die Proteine 4E-BP1 (*E4 binding protein 1*) und S6K1 (*S6 Kinase 1*) sind Regulatoren der mRNA-Translation an Ribosomen und stellen hierbei die beiden wichtigsten Substrate von mTORC1 dar. Unphosphoryliertes 4E-BP1 bindet und hemmt den eukaryontischen Initiationsfaktor 4E (*eIF-4e*), welcher einen essenziellen Bestandteil des Initiationskomplexes der Translation und somit der Proteinbiosynthese darstellt. Die sequentielle Phosphorylierung

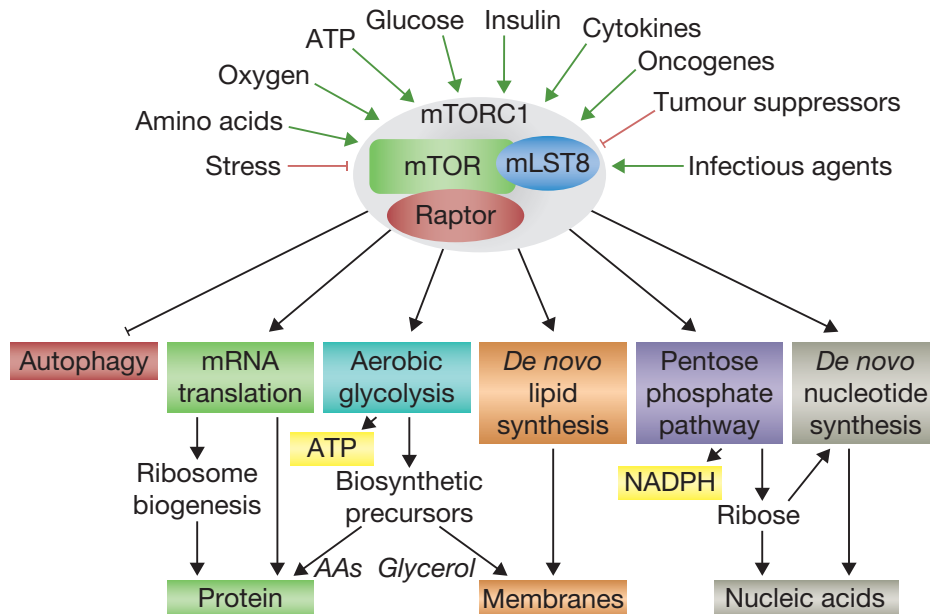
## Einleitung

von 4E-BP1 durch mTORC1 führt durch Freisetzung von eIF-4E zur Enthemmung der mRNA-Translation. Die mTOR-abhängige Freisetzung von eIF-4E induziert insbesondere die Transkription solcher mRNAs, die sich durch regulierende Elemente in den *5'-untranslated terminal regions* auszeichnen. Diese kodieren für Proteine, die für den Zellyklusübergang von der G1 in die S-Phase von Bedeutung und damit wichtig für das Zellwachstum sind.

Das mTORC1-Substrat S6K1 ist eine wichtige stromabwärts gelegene Kinase, die an der Initiierung der Proteinbiosynthese beteiligt ist und von mTORC1 aktiviert wird. Dies führt (über weitere Zwischenschritte) zu einer gesteigerten Transkription von sog. 5'TOP-mRNAs, die sich durch eine Poly-Pyrimidin-Kette unmittelbar stromabwärts der 5'-Cap-Struktur auszeichnen. Diesen mRNAs ist gemein, dass sie ausschließlich für Proteine der Translationmaschine, wie ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren kodieren [37]. Über Aktivierung der S6K1 induziert mTORC1 so den Ausbau des zellulären Proteinsyntheseapparats. Darüber hinaus induziert mTOR weitere für das Zellwachstum wichtige Prozesse. Über die Regulation von Transkriptionsfaktoren induziert mTORC1 die Transkription einer Reihe von Genen die für verschiedene anabole Biosynthesepathways essenziell sind [38]. mTORC1-Signaling stimuliert hierüber die für Zellwachstum notwendige zelluläre Aufnahme von Nährstoffen wie Glucose, Aminosäuren, Lipoproteinen und Eisen [39, 40]. Über Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SREBP1 und 2 (*sterol regulatory element-binding proteins 1 und 2*) induziert mTORC1 die Expression von Enzymen der Lipidsynthese [40-42]. Die Nukleotidsynthese wird über eine S6K1-vermittelte Phosphorylierung des Enzyms CAD (*Carbamoyl-Phosphat-Synthetase 2, Aspartat-Transcarbamoylase, Dihydroorotase*) verstärkt, wodurch deren Verfügbarkeit zur RNA- und DNA-Synthese steigt [43, 44].

Auch die zelluläre Energiegewinnung wird entscheidend durch mTORC1 reguliert. mTORC1 beeinflusst den Metabolismus, die Biogenese und Energiegewinnung der Mitochondrien [45, 46]. Durch Induktion der Expression von Schlüsselenzymen induziert mTORC1 zudem den Pentosephosphatweg und die Glycolyse [40].

Neben der Induktion anaboler Prozesse ist mTORC1 zudem an der Inhibition kataboler Prozesse wie der mRNA Degradation, Proteolyse und Autophagie beteiligt [47-50].



**Abbildung 1.2 - mTORC1 im zellulären Stoffwechsel:** Übersicht über von mTORC1 integrierte Signale und den durch mTORC1 regulierten zellulären Metabolismus [51].

### 1.5.1 Begleitproteine von mTOR in mTORC1

Über die Funktion der Proteine mit denen mTOR in mTORC1 interagiert ist unterschiedlich viel bekannt. Raptor ist als Bestandteil des Proteinkomplexes mTORC1 unabdingbar für dessen Funktion [35]. Raptor dient hierbei als Adapterprotein zur Rekrutierung der genannten Substratproteine, indem es die stromabwärts befindlichen Effektoren S6K1 und 4E-BP1 bindet und der Phosphorylierung durch mTOR zugänglich macht [52]. Ein Fehlen des Proteins Raptor führt dazu, dass die Substrate von mTORC1 nicht rekrutiert werden können, mTORC1 seine Funktion als Regulator von zellulären Prozessen verliert und funktionell inaktiv wird [35, 52]. PRAS40 fungiert als negativer Regulator von mTORC1 indem es die Substratbindung durch Raptor blockiert [53-55]. Das noch wenig charakterisierte Protein Deptor fungiert als Inhibitor der mTORC1-Funktion [56]. Die Rolle von mLST8 in mTORC1 ist unklar [36].

### 1.5.2 Regulation von mTORC1

mTORC1 selbst wird über unterschiedliche stromaufwärts befindliche Signalkaskaden reguliert. Als Initiator anaboler Zellfunktionen wird mTORC1 über übergeordnete Signale aktiviert, die eine gute Energie- und Nährstoffversorgung des Organismus und der Zelle widerspiegeln und durch Energie- und Nährstoffdepletion gehemmt.

Aktivierende Signale stellen extrazelluläre Wachstumsfaktoren, der intrazelluläre Energie- und Sauerstoffhaushalt, sowie die Anwesenheit von Aminosäuren als Grundbaustein der Proteinbiosynthese dar [57]. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Zellmembranrezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen) führt über Phosphorylierung von IRS1 (*Insulin receptor substrate 1*) zur Aktivierung der mTORC1 übergeordneten PI3K/AKT-Signalkaskade. Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat*) zum zellulären Messenger PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat*), der schließlich die Proteinkinase B (*Akt/PKB*) aktiviert. Indem die Akt in der Folge durch Phosphorylierung von TSC2 im Tuberous Sclerosis Complex (*TSC* - Komplex der beiden Proteine Hamartin (=TSC1) und Tuberin (=TSC2)) eine Enthemmung des mTORC1-aktivierenden GTP-bindenden Proteins Rheb herbeiführt [58], wird mTORC1 über diese Kaskade stimuliert.

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (*AMPK*) stellt einen weiteren Regulator der mTORC1-Aktivität dar. Die Aktivität dieser Proteinkinase wird anhand des zellulären AMP/ATP-Spiegel über den Energiehaushalt der Zelle gesteuert [47]. Ein hoher AMP-Spiegel repräsentiert hierbei einen energetisch ungünstigen Zustand und führt zur Aktivierung von AMPK, welche mTORC1 über Aktivierung des TSC-Komplexes hemmt. Die zelluläre Kinase LKB1 (*liver kinase B1*) wird ebenfalls durch niedrige Energiespiegel aktiviert und stimuliert AMPK [59]. Neben der indirekten Inhibition durch Aktivierung von TSC hemmt AMPK mTORC1 zusätzlich direkt durch die Phosphorylierung und Hemmung von Raptor [60]. Über Aktivierung von S6K1 bildet mTORC1 zudem einen negativen Feedback-Loop zum PI3K/Akt-Signalweg [61, 62].

Die Induktion anaboler Prozesse durch mTORC1 ist zusätzlich an das Vorhandensein ausreichender Baustoffe der Proteinbiosynthese, insbesondere

Aminosäuren gekoppelt. In Anwesenheit von Aminosäuren führen spezifische GTPasen (sog. Rag-Proteine) zur direkten Aktivierung von mTORC1 [63].

### **1.6 mTOR-Komplex 2 (mTORC2)**

Als zweiter Proteinkomplex, in dem mTOR anzutreffen ist, wird mTORC2 aus den Proteinen mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mLST8/GβL, mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*), Deptor, Protor und PRR5 (*proline rich 5*) gebildet [64].

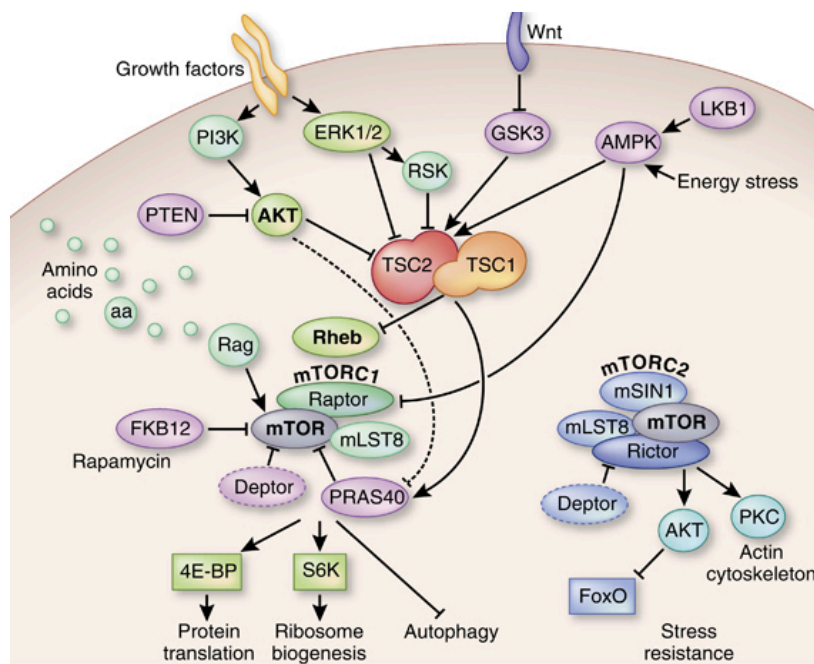
Im Gegensatz zu mTORC1 ist über den erst 2004 beschriebenen Komplex [64] mTORC2 in Hinblick auf dessen Funktionen und Signallingmechanismen noch wenig bekannt. mTORC2 galt zunächst als nicht Rapamycin-sensitiv [64], heute ist jedoch bekannt, dass eine langfristige Rapamycin-Behandlung auch zu einer Hemmung dieses Komplexes führt [65]. Durch Untersuchungen der Zielmoleküle von mTORC2 konnten dem Komplex Funktionen in der Regulation des Aktinzytoskelettes, zellulärer Wachstumsprozesse und des Natriumhaushaltes zugeschrieben werden [64, 66-69].

Bekannte Substrate von mTORC2 in der Vermittlung dieser Funktionen sind Akt/PKB [68], SGK1 [66] und PKCα (*Proteinkinase C*) [64, 69, 70]. Die Proteinkinase Akt/PKB fungiert als Regulator von Zellwachstum, Zellüberleben und Proliferation [71]. Durch Aktivierung dieser Kinase übt mTORC2 Einfluss auf zelluläre Wachstumsprozesse aus [68]. Das Aktin-Zytoskelett wird durch Aktivierung von PKCα durch mTORC2 reguliert [69]. PKCα ist eine ubiquitär exprimierte Proteinkinase die mit unterschiedlichen zellulären Funktionen wie der Apoptose, Zellwachstum, Zellzykluskontrolle und der Regulation der Zellform in Verbindung gebracht wird [72] und Vermittler der Aktinzytoskelettorganisation durch mTORC2 zu sein scheint [64].

mTORC2 ist zudem für die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr relevant. Über die Aktivierung der SGK1 - einer Serin/Threonin-Kinase, die eine zentrale Rolle im Natriumhaushalt innehat [73] - vermittelt mTORC2 hier die hormonell gesteuerte ENaC-Expression in der luminalen Membran [64, 66].

### 1.6.1 Regulation von mTORC2

Auch über die Regulation von mTORC2 ist noch wenig bekannt. Ähnlich wie bei mTORC1 führen Wachstumsfaktoren zu einer Stimulation von mTORC2 [74, 75]. mTORC2 wird dabei durch eine physische Assoziation zu Ribosomen aktiviert [67, 75], die über den PI3-Kinase-Weg initiiert wird [74, 76, 77]. Da der zelluläre Ribosomengehalt mit der Wachstumskapazität einer Zelle korreliert, wird die Aktivität von mTORC2 so auch anhand der Proliferationsfähigkeit der Zelle reguliert [75].



**Abbildung 1.3 - mTOR Signalling:** Vereinfachte Übersicht über das zelluläre Signalling von mTORC1 und mTORC2 [78].

### 1.7 Interaktionen zwischen mTORC1 und mTORC2

Über Interaktionen zwischen den beiden Komplexen, in denen mTOR organisiert ist, ist noch relativ wenig bekannt. Die Überschneidungen hinsichtlich zellulärer Funktionen und bekannter Zielmoleküle der beiden Komplexe - beispielsweise in der Zellwachstumsregulation - lassen jedoch Interaktionen zwischen den Komplexen vermuten. Die beschriebene zelluläre Kaskade legen nahe, dass mTORC2 über die Aktivierung der Akt/PKB, welche funktionell stromaufwärts von mTORC1 liegt, indirekt eine Aktivierung von mTORC1 herbeiführen könnte. Eine verminderte mTORC1 Aktivität bei einem



Fehlen von mTORC2 konnte jedoch bisher nicht belegt werden [64]. Weitere Interaktionen zwischen mTORC1 und mTORC2 konnten zumindest auf Signallingebeue bisher nicht beschrieben werden.

### **1.8 mTOR in der Niere**

Trotz des detaillierten Wissens über die molekularen Mechanismen des mTOR-Signallings und der breiten klinischen Anwendung von mTOR-Inhibitoren wurde die Auswirkung einer Hemmung von mTORC1 und mTORC2 insbesondere auf tubuläre Funktionen bisher kaum isoliert untersucht. Viele Erkenntnisse über die Rolle mTORs in der Niere beruhen daher auf beobachteten Effekten der nicht organ- oder gewebsspezifischen mTOR-Inhibition durch verschiedenen Therapeutika. Der Entstehungsmechanismus dieser beobachtbaren Störungen ist dabei folglich nur schwer einzelnen Organsystemen zuzuordnen.

Nichtsdestotrotz sind eine Reihe von Funktionen der beiden Proteinkomplexe, vor allem im Glomerulum bekannt. Auch wurde eine pathogenetische Relevanz mTORs für eine Reihe von renalen Erkrankungen beschrieben.

#### **1.8.1 mTOR im Glomerulum**

Beide mTOR-Komplexe spielen eine wichtige Rolle für die Integrität und Homöostase des glomerulären Filterapparats unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen [79].

mTORC1 ist maßgeblich an der Ausbildung des glomerulären Filters beteiligt, indem es die Größe der Podozyten reguliert [79]. Dies scheint vor allem während der Glomerulumsentwicklung sowie im Rahmen kompensatorischer Wachstumsvorgänge als Antwort auf verschiedenste glomeruläre Verletzungen relevant zu sein [79]. Kann mTORC1 diese Funktion zum Beispiel durch pharmakologische Hemmung nicht ausüben, entsteht eine Proteinurie mit dem histopathologischen Korrelat einer Glomerulosklerose [79, 80]. Die häufig unter der Therapie mit Rapamycin zu beobachtende Entwicklung einer Proteinurie wird dieser zellulären Beeinträchtigung zugeschrieben. Auch mTORC2 scheint für einen intakten glomerulären Filter bedeutsam zu sein. Über die Aktivierung der Akt2 übt mTORC2 eine protektive Wirkung auf Podozyten aus [81].

Auch eine gesteigerte mTOR-Aktivität kann für die Pathogenese glomerulärer Erkrankungen bedeutsam sein, beispielsweise für die Entstehung der diabetischen Nephropathie [79, 82]. Schon in frühen Stadien dieser Erkrankung kann eine solche mTOR-Überaktivität beobachtet werden [83]. Pathophysiologisch wird diese Überstimulation durch die diabetesbedingte Hyperglykämie erklärt. Die hohen Glucosespiegel führen zu einer Hemmung der AKMP und einer Aktivierung der Akt [84]. Beide dieser stromaufwärtsbefindlichen Mechanismen steigern die mTOR-Aktivität. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine übersteigerte mTOR-Aktivität in der Niere zu einer der diabetischen Nephropathie ähnlichen glomerulären Hypertrophie [83, 85] und zu extrazellulären Veränderungen der Glomerulumsstruktur, wie einer Verbreiterung der Basalmembran und einer Zunahme mesangialer Matrix führt [86].

Darüber hinaus konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung mTORs eine Reihe glomerulärer Erkrankungen positiv beeinflusst, sodass eine pathogenetische Bedeutung auch hier angenommen werden kann. Hierzu gehören neben der genannten diabetischen Nephropathie die minimal change disease [87], fokal segmentale Glomerulosklerose [88] und membranöse Nephropathie [89].

### **1.8.2 mTOR im Tubulusepithel**

Während einige Funktionen mTORs im Glomerulum bereits gut charakterisiert werden konnten, ist dessen Rolle für die tubuläre Funktion noch wenig bekannt.

#### *Resorption und Sekretion*

Unter der Therapie mit mTOR-Inhibitoren konnten mehrere Störungen des Elektrolythaushaltes beobachtet werden, die einer Beeinträchtigung des Tubulusapparates zugeschrieben werden. Hierzu gehören vor allem die Entstehung einer Hypophosphatämie sowie einer Hypokaliämie [90]. Die Phosphatresorption stellt eine überwiegend proximal-tubuläre Leistung dar, wobei der  $\text{Na}^+\text{P}_i$ -Symporter IIa eine Schlüsselrolle einnimmt [11, 12]. Obwohl mTOR an der Regulation dieses Symporters beteiligt zu sein scheint und ein

renaler Phosphatverlust für die entstehende Störung verantwortlich ist [91], bleibt der zelluläre Mechanismus dieser Störung bisher nicht vollständig geklärt [92, 93]. Kalium wird entlang des Tubulus über unterschiedlichste Transportwege rückresorbiert. Die unter mTOR-Inhibitor-Therapie zu beobachtenden Hypokaliämien werden derzeit am ehesten einer gesteigerten tubulären Kaliumsekretion zugeschrieben [91].

Sowohl Kalium als auch Phosphat werden über komplexe hormonelle Regelkreise mit vielen, auch extrarenalen Effektoren reguliert. Daher ist unklar, ob die zu beobachtenden Effekte lediglich auf der Beeinflussung der tubulären Funktion oder auch weiterer, renaler oder extrarenaler Strukturen durch Rapamycin und andere Substanzen beruhen.

Weiterhin konnten unter mTOR-Inhibition die Entwicklung von geringgradigen Glucosurien und Aminoazidurien beobachtet werden [92]. Auch hier scheinen proximal-tubuläre Resorptionsprozesse durch die mTOR-Inhibition gestört zu werden. Weitere Informationen zur Funktion mTORs im Tubulussystem konnten durch die Untersuchung von Mausmodellen mit konstitutionellen, selektiv distal-tubulären mTORC1- und mTORC2-Deletionen gewonnen werden [45]. Bei diesen Tieren konnten mehrere phänotypische Auffälligkeiten beobachtet werden. Die distal-tubuläre mTORC1-Deletion führte zu einer gestörten Harnkonzentrierung und Polyurie. Dies konnte auf eine Resorptionsstörung im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (*tall ascending limb, TAL*) zurückgeführt werden. Pathomorphologisch wurde eine verminderte Expression des wichtigen NKCC2-Kanals und ultrastrukturelle Veränderungen im TAL beschrieben [45]. Passend zur Lokalisation dieser Störung wurden erhöhte Ausscheidungsparameter für die vor allem im TAL resorbierten Kationen Magnesium und Calcium beobachtet [45].

mTORC2 spielt wie bereits beschrieben eine wichtige Rolle für die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr. Durch Phosphorylierung der SGK1 vermittelt mTORC2 dabei die ENaC-Aktivierung in der luminalen Zellmembran der Hauptzellen [66], was zu einer gesteigerten Natriumresorption führt [94]. Über die Interaktion mit der PKC übt mTORC2 zudem einen regulierenden Einfluss auf sekretorische ROMK1-Kaliumkanäle im

distalen Tubulus aus [23]. Nach Aktivierung der PKC durch mTORC2 phosphoryliert und aktiviert diese ROMK1-Kanälen [23]. Die mTORC2-vermittelte Aktivierung von ENaC- sowie ROMK1-Kanälen führt hier somit zu einer Steigerung der Natriumresorption sowie der Kaliumsekretion [23, 94, 95].

### *Proliferation und Regeneration*

Die am besten charakterisierte Funktion mTORs stellt die Vermittlung von zellulären Wachstumsprozessen dar. Dies ist auch im Tubulusepithel unter unterschiedlichsten (patho-) physiologischen Gegebenheiten relevant.

So kommt mTORC1 eine kritische Rolle in der Regeneration nach ischämischer Nierenschädigung zu. Eine tubuläre Deletion von mTORC1 führt hier im Tiermodell durch eine verminderte tubuläre Proliferation zu einer verzögerten Regeneration [45]. Die klinische Beobachtung einer verzögerten Grafffunktion nach Nierentransplantation unter mTOR-hemmender Immunsuppression konnte so durch die Störung der postischämischen Regeneration der Tubuluszellen durch die Inhibition von mTORC1 erklärt werden [45, 96, 97]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass weitere renale Wachstumsprozesse wie die kompensatorische Hypertrophie nach unilateraler Nephrektomie oder nach Diabetesinduktion zumindest zu einem wichtigen Anteil durch mTORC1 vermittelt werden. Eine Hemmung mTORs führte auch hier zu verminderten Proliferationsraten und einer Störung dieser kompensatorischen Wachstumsvorgänge [98-102]. Nicht zuletzt kann mTOR als Vermittler zellulärer Wachstumsprozesse entscheidend an der Karzinogenese renaler Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom beteiligt sein [103].

### *Interstitielle Fibrose*

mTOR scheint darüberhinaus für die Entstehung interstitieller Veränderungen im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen von Bedeutung zu sein. Bei Niereninsuffizienz konnte eine erhöhte mTORC1-Aktivität im Tubulusepithel beobachtet werden [86]. Diese Überaktivität begünstigt in der Folge über eine Reihe weiterer Mechanismen die Entstehung einer interstitiellen Fibrose mit weiterer Verschlechterung der Nierenfunktion. Zugrundliegende Mechanismen

stellen hier die mTORC1-vermittelte Induktion der Lymphozyten- und Fibroblastenproliferation [58] sowie eine gesteigerte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine dar [100]. Die folgende intersititelle Entzündungsreaktion führt über eine gesteigerte Kollagensynthese seitens der aktivierten Fibroblasten zu Vernarbung und Fibrose [86, 104, 105]. mTOR könnte des Weiteren eine Rolle für die „epithelial-to-mesenchymal-transition (EMT) - Theorie“ spielen. Diese geht davon aus, dass sich durch eine Entzündung aktivierte Tubuluszellen in Fibroblasten umwandeln und interstitiell durch Kollagenbildung zur Fibrose beitragen [106-108]. Da mTOR-Inhibitoren diese interstitielle Fibrosierung im Rahmen einer Nierensinsuffizienz im Tiermodell zu bremsen vermögen, scheint mTOR auch hier eine wichtige Rolle zu spielen [109].

### **1.9 Fragestellung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Phänotypisierung eines Tiermodells mit tubulärer Deletion der Proteine Raptor und Rictor - und somit einer Ausschaltung der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 im Tubulussystem - weiteres Wissen über die Aufgaben und Funktionen von mTOR im Tubulus zu erlangen.

Die Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf weitere Funktionen mTORs ermöglichen und dazu beitragen, bekannte Funktion dieser Proteinkomplexe im tubulären Epithel besser zu charakterisieren. Der verbreitete therapeutische Einsatz von mTOR-Inhibitoren bedingte hierbei eine hohe klinische Relevanz dieser Fragestellung.

Tubuläre Funktionen sollten hierzu unter verschiedenen Stoffwechselgegebenheiten und externen Stressoren geprüft werden. Um phänotypische Merkmale möglichst genau auf die Funktion eines der Proteinkomplexe zurückführen zu können, sollte je ein Modell mit einfacher mTORC1- oder mTORC2-Deletion, sowie ein Modell mit mTORC1/mTORC2-Doppeldeletion untersucht werden. Dieser Ansatz sollte darüber hinaus durch den Vergleich der unterschiedlichen Modelle dazu dienen, mögliche Interaktionen zwischen beiden Proteinkomplexen aufzudecken.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Es folgt eine tabellarische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, Substanzen, Testkits und Laborgeräte.

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1 - Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Konzentration	Bezugsquelle
Salzsäure	HCl	1N (=1 mol/l)	MERCK
Natriumcitrat	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	- (≥ 99% Pulver)	MERCK

#### 2.1.2 Medikamente

Tabelle 2.2 - Verwendete Medikamente

Pharmakon	Wirkstoff	Konzentration	Bezugsquelle
Diamox ®	Acetazolamid-Natrium	- (Lyophilisat)	MercuryPharma®
Lasix ®	Furosemid-Natrium	10mg/ml	Sanofi-Aventis®
Triamteren	Triamteren	- (≥ 99% Pulver)	Sigma-Aldrich®
Hydrochlorothiazid (HCT)	Hydrochlorothiazid	- (> 99% Pulver)	Sigma-Aldrich®
Isofluran CP®	Isofluran	1ml/ml	CP-Pharma®
Streptozotocin (STZ)	Streptozotocin	- (≥ 98% Pulver)	Sigma-Aldrich®

### 2.1.3 Biosubstanzen

Tabelle 2.3 - Verwendete Biosubstanzen

Bezeichnung	Wirkstoff	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
BSA	bovines Serum-Albumin	≥ 98% (Pulver)	Sigma-Aldrich®
Mäusealbumin	murines Serum-Albumin	≥ 96% (Pulver)	

### 2.1.4 Lösungen

Tabelle 2.4 - Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Herstellerangaben	Bezugsquelle
PBS Puffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, low endotoxin	Sigma-Aldrich®
Ampuwa®	Lösungsmittel zur Parenteralherstellung	Fresenius Kabi®
Immersionsöl	-	-
Aqua Dest	-	-
Leitungswasser	-	Stadtwerke Tübingen
Flammenphotometer- Lösungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reinigungslösung</li> <li>• Urin-Standard</li> <li>• Serum-Standard</li> <li>• Lithium Stammlösung</li> <li>• System-Leerwertlösung</li> </ul>	biorapid GmbH
Fomalin	Formaldehyd-Lösung 4,0%, neutral gepuffert	Fischer®

### 2.1.5 Hergestellte Lösungen

Als Injektionslösung für die Verabreichung von Streptozotocin (vgl. 2.2.10.3) wurde ein Natriumcitrat-Puffer wie folgt hergestellt:

1,68g C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>9</sub> (tri-Natriumcitrat-dihydrat) + 50ml ddH<sub>2</sub>O  
+ pH-Meter-kontrollierte Titration mit 1N HCl auf pH 4,5

### 2.1.6 Standardfutter und Spezialdiäten

Als Futter erhielten die Versuchstiere verschiedene Spezialdiäten mit definierten Elektrolytgehalten.

**Tabelle 2.5 - Standardfutter und Spezialdiäten**

Bezeichnung	Bezugsquelle	Na <sup>+</sup> %	K <sup>+</sup> %	Ca <sup>2+</sup> %	Mg <sup>2+</sup> %	P <sub>i</sub> %
Standarddiät V1534-703	ssniff Spezialdiäten GmbH	0,24	1,02	1,0	0,22	0,7
C1000	Altromin	0,25	0,71	0,9	0,68	0,7
C1314	Spezialfutter GmbH	0,22	1,02	0,7	0,20	0,5

### 2.1.7 Testkits für photometrische und flourometrische Messungen

Zur photometrischen und flourometrischen Bestimmung verschiedener Messparameter in Urin und Serum wurden verschiedene Testkits verwendet.

**Tabelle 2.6 - Verwendete Testkits**

Bezeichnung	Parameter	Test-Kit-Inhalt	Bezugsquelle
LT-SYS® Kreatinin	Kreatinin	Pikrinsäure, Puffer (NaOH), Standard	Eberhard Lehmann GmbH
LT-SYS® Phosphat	P <sub>i</sub>	Testreagenz, Standard	
LT-SYS® Magnesium	Mg <sup>2+</sup>	Testreagenz, Standard	
LT-SYS® Glucose	Glucose	Testreagenz, Standard	
LT-SYS® Harnstoff	Harnstoff	Urease, Puffer, Standard	
Microfloural™ Microalbumin Test	Albumin	Mikrotiterplatten, Positivkontrolle, Standard, Verdünnungspuffer, AB580 Konzentrat	Progen Biotechnik



## 2.1.8 Laborequipment

Tabelle 2.7 - Eingesetztes Laborequipment

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller
Pipetten	Research® plus (0,5-10 µl) Research® plus (2-20 µl) Research® plus (10-100 µl) Research® plus (20-200 µl) Research® plus (100-1000 µl)	Eppendorf AG
Flammen-Photometer	EFUX 5057	Eppendorf AG
Floureszenz-Photometer	SPECTRAFlour	Tecan®
Photometer	BioMate 3	Thermo Scientific®
Narkosegerät	Vapor 2000 Isoflurane	Drägerwerk AG
Präzisions-Waage	ALT 100-4M	KERN®
Metabolische Käfige	3600 M 021	Tecniplast
Blutzuckermessgerät	Contour® Next	Bayer AG
Zentrifuge	Megafuge 2.0R	Thermo Scientific®
pH-Meter	ph 211	Hanna Instruments
Vortexmischer	VF2	IKA®-Labortechnik
Kühlschrank	Liebherr Comfort (2-8°C)	Liebherr
Gefrierschrank -20° C	-	Liebherr
Gefrierschrank -80° C	-	Liebherr

### 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.8 - Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Pipettenspitzen		
• 0,1-10 µl	Pipettenspitzen mikro	Carl Roth GmbH®
• 1-200 µl	Pipettenspitzen gelb	ratiolab® GmbH
• 50-1000 µl	epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG
Eppendorf-Cups	Reaction Tubes (1,5ml)	greiner bio-one®
Photometerküvetten	UV-Küvette mikro (70µl)	BRAND®
Injektionskanülen	BD Microlance 3	Becton, Dickinson and Co.
Spritzen	Omnifix-H (1ml)	Braun AG®
Kapillaren (Na <sup>+</sup> -heparinisiert)		
• Hämatokrit-Kapillaren	75µl Hkt-Kapillaren	Hirschmann®
• Blutgaskapillaren	280µl BG-Kapillaren	Laborgeräte
Käfigeinstreu	Espen-Tiereinstreu AB	AsBe-Wood GmbH
Blutzucker-Sticks	Contour Next Sensoren	Bayer®

### 2.1.10 Software

Folgende Software wurde für in der Dokumentation und Auswertung der Experimenten verwendet.

Tabelle 2.9 - Verwendete Software

Bezeichnung	Version	Entwickler
Excel®	Excel 2007	Microsoft®
Word®	Word 2007	Microsoft®
EndNote®	X6.0.1	Thomson Reuters
GraphPad Prism®	Version 4.03	Graph Pad Software
XFLOUR4	Version 4.51	Tecan®

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere als Modellorganismus

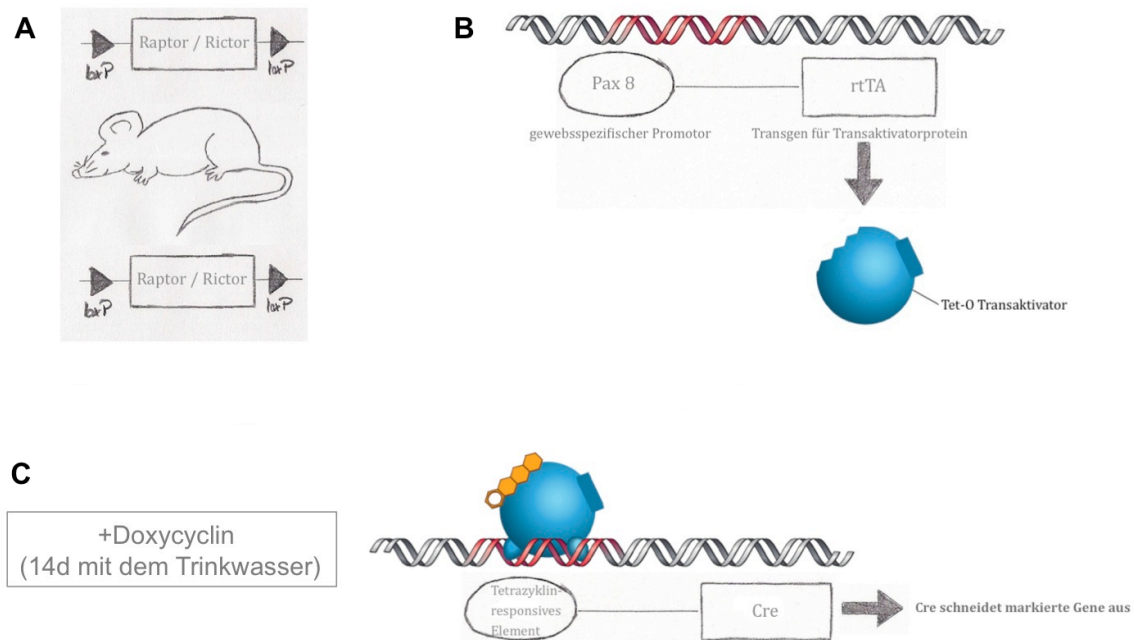
Zur Untersuchung der Fragestellung wurden Mäuse der Gattung *Mus musculus* vom Stamm C57BL/6 (auch „Black-6“ genannt) mit einer gewebsspezifischen Gendeletion - sog. Knock-Out-Mäuse - als Modellorganismus eingesetzt. Vor Beginn der Experimente wurden die kodierenden Genabschnitte der für die Funktion der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 notwendigen Proteine Raptor (als Bestandteil von mTORC1) und / oder Rictor (als Bestandteil von mTORC2) mittels eines induzierbaren Cre/LoxP-Verfahrens gezielt und selektiv aus dem tubulären Genom der Versuchstiere ausgeschnitten.

Das Cre/loxP-System ist eine verbreitete Methode, welche die gezielte Extraktion von markierten DNA-Sequenzen im lebenden Organismus ermöglicht [110]. Voraussetzung für die postnatal induzierbare Extraktion der Zielgene ist dabei neben einer speziellen Markierung das Vorhandensein zweier Transgene („Knock-in Gene“) im Genom der Modellorganismen. Die Einbringung von Transgenen ins Versuchstiergenom wird durch DNA-Mikroinjektionen in entnommene, befruchtete Eizellen ermöglicht [111]. Durch die anschließende Verpaarung der verschiedenen transgenen Tierlinien entstehen in den Folgegenerationen Tiere, die alle gewünschten Transgene tragen.

Eines dieser Transgene (Pax8-rtTA) kodiert hierbei für das Transaktivatorprotein TetO und wird unter dem tubulusspezifischen Promotor Pax8 (*Paired Box 8*) exprimiert (Abb 2.1 B). Die orale Verabreichung eines Tetrazyklins führt im Zielgewebe - hier im Tubulussystem - durch Komplexbildung mit dem Transaktivatorprotein TetO zur Bindung an den Tetrazyklin-responsiven Promotor TRE eines zweiten Transgens (TRE-Cre), welches in der Folge abgelesen wird (Abb 2.1 C) und die Rekombinase Cre freisetzt. Diese katalysiert schließlich die Deletion der mittels einer spezifischen Sequenz („loxP“, eine 34 Basenpaare lange Erkennungssequenz zu beiden Seiten der Zielgene) markierten Genabschnitte aus dem Genom [112, 113].

Bei den untersuchten Pax8-rtTA\*TetO-Cre Modellen führte somit die postnatale, orale Verabreichung eines Tetrazyklins mit dem Trinkwasser zum Ablesen

zweier Transgene, was schließlich in der Exzision der loxP-markierte Zielgene Raptor und / oder Rictor aus dem tubulären Genom mündete (Abb. 2.1) [112-115].



**Abbildung 2.1 - Tubuläre Genexzision:** Schematische Darstellung der Tetrazyklin-induzierten Expression der Rekombinase Cre [eigene Darstellung, 2015]. Die jeweiligen Zielgene Raptor und/oder Rictor sind im Genom der Versuchstiere durch die Erkennungssequenz „loxP“ markiert (A). Das rtTA-Gen für das Transaktivatorprotein TetO wird unter dem gewebsspezifischen Promotor Pax8 im Tubulussystem exprimiert (B). Die 2-wöchige Behandlung mit Doxycyclin führt zur Komplexbildung und Induktion des Ablesens der Rekombinase Cre - Gens (C). Diese schneidet die Zielgene anhand der Erkennungssequenzen aus dem Genom aus [112-115].

Die Induktion der Genextraktion wurde bei den Versuchstieren im Alter von acht Wochen durchgeführt. Geschwistertiere ohne die gewebsspezifische Gendeletion wurden für die Experimente als Kontrollgruppe herangezogen. Die Deletionen der entsprechenden Genabschnitte wurden mittels Expressionsanalysen kontrolliert. Die beschriebenen Versuchstiere wurden über Kooperationspartner Dr. med. Grahammer (Universität Freiburg) bezogen, wo auch die Züchtung, Induktion und Expressionsanalysen der Versuchstiere

durchgeführt wurden. Versuchstiere mit folgenden gewebsspezifischen Gendelektionen wurden in den Experimenten eingesetzt.

**Tabelle 2.10 - Versuchstiere:** Übersicht über die tubulusspezifischen Gendelektionen der untersuchten Versuchstiere.

Kurzbezeichnung	Promotor	Extrahierte(s) Gen(e)	betroffener Nephronabschnitt
Rap <sup>-/-</sup>	Pax 8	Raptor	gesamtes Tubulussystem
Ric <sup>-/-</sup>	Pax 8	Rictor	gesamtes Tubulussystem
Rap <sup>-/-</sup> Ric <sup>-/-</sup>	Pax 8	Raptor und Rictor	gesamtes Tubulussystem

### 2.2.2 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden entsprechend den Empfehlungen der *Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V.* [116] in gleichgeschlechtlichen Gruppen zu maximal fünf Tieren in mit trockenem Einstreu ausgelegten Standardkäfigen mit kontinuierlichem Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten. Die Käfige wurden regelmäßig gewechselt und gereinigt. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein regelmäßiger Hell-Dunkel-Rhythmus gewährleistet (12:12 h). Die Urinsammlung und Bilanzierung während der Experimente erfolgte in sog. metabolischen Käfigen, in denen jedes Tier einzeln untergebracht war (vgl. 2.2.4.1).

### 2.2.3 Genehmigung der Versuchstierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere sowie die Durchführung der Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung und gemäß der Vorgaben durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Genehmigungsnummer M4/11. Für die Durchführung der Tierversuche lag seitens des Regierungspräsidiums Tübingens eine Ausnahmegenehmigung nach § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchG für meine Person vor.

## 2.2.4 Versuchsdurchführung und Probengewinnung

Es folgt eine Beschreibung der durchgeführten Versuche, Techniken und Methoden der Probengewinnung sowie der Messmethoden.

### 2.2.4.1 Metabolische Käfige

Um eine Bilanzierung der Mäuse sowie die Urinsammlung zu ermöglichen, wurden die Versuchstiere während der Experimente einzeln in sog. metabolischen Käfigen gehalten. Die Versuchstiere saßen hierbei auf einem Gitter mit darunter befindlichem Trichtersystem, welches dem Auffangen des Urins in ein Urinsammelgefäß diente. Die Versuchstiere wurden jeweils einen Tag vor Beginn der Messungen in die metabolischen Käfige gesetzt, um eine Gewöhnungszeit an die veränderten Umgebungsbedingungen zu gewähren. Während der Serien wurden die Tiere täglich zur gleichen Uhrzeit gewogen und der ausgeschiedene Urin entsprechend eines 24h-Sammelurins asserviert. Die Käfige verfügten über abnehmbare Komponenten für Trinkwasser und Futter, die täglich gewogen wurden, um Nahrungs- und Wasseraufnahme zu bilanzieren. Der Sammelurin wurde anschließend bei 3500 rpm zentrifugiert und bei -20°C in Eppendorf-Cups aufbewahrt. Die Käfige und insbesondere das Trichtersystem wurden täglich während der Probensammlung gereinigt, um etwaige Rückstände vom zurückliegenden Versuchstag zu entfernen. Vor Beginn der eigentlichen Experimente und Interventionen wurden zu Serienbeginn stets zwei Kontrolltage durchgeführt.

Tag -1	Tag 1-2	Tag 3-5/7	Tag 5/7
Einsetzen in die metabolischen Käfige	Kontrolle	Versuchszeitraum	Serienende und Blutentnahme
	Bilanzierung und Urinsammlung		

**Abbildung 2.2 - Standardisierter Serienablauf:** Standardisierter Ablauf einer Serie mit Urinsammlung und Bilanzierung im metabolischen Käfig.

### 2.2.4.2 Narkose

Zur Gewinnung von Blut und zur Opferung der Versuchstiere nach Beendigung der Untersuchungen wurde durch Verabreichung des Inhalationsnarkotikums Isofluran eine Narkose bei den Tieren durchgeführt. Zur Applikation wurde ein

Narkosekreissystem mit Verdampfer eingesetzt, bei dem das in einem Becherglas sitzende Versuchstier über eineinhalb Minuten mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (5% Vol. Isofluran, O<sub>2</sub>-Fluss 2l/min) sediert wurde.

### **2.2.4.3 Blutentnahme und Hämatokritbestimmung**

Um Messungen im Serum der Versuchstiere zu ermöglichen, wurden bei den Versuchstieren venöse Blutentnahmen durchgeführt [117]. Die Probengewinnung erfolgte dabei durch Punktion des retrobulbären Venenplexus. Unter Sedierung wurde dabei die Bindehaut am medialen Augenwinkel mit einer feinen Glaskapillaren durchstoßen und eine Verbindung zum Venenplexus geschaffen. Das über die Kapillare abfließende Blut wurde wiederum mit größeren, heparinisierten Kapillaren aufgefangen und die blutgefüllten Kapillaren mittels einer Knetmasse einseitig verschlossen. Die blutgefüllten Kapillaren wurden daraufhin zur Sedimentation der zellulären Blutbestandteile zentrifugiert (3500rpm, 10 Minuten). Anhand der zentrifugierten Kapillaren konnte der Hämatokritwert abgelesen werden (zellulärer Anteil / Gesamtblut). Die Kapillaren wurden dann mittels eines Glasschneiders an der Grenzlinie beider Phasen inzidiert und abgebrochen. Die zellulären Blutbestandteile wurden verworfen, das Plasma in ein Eppendorf-Gefäß übertragen und anschließend bei -20°C gelagert.

Geringe Mengen Blut, etwa zur Blutzuckerbestimmung, konnten alternativ aus der Schwanzvene der Tiere gewonnen werden [117]. Hierzu wurden die Tiere an der Schwanzwurzel fixiert und ein kurzer Teil des distalen Schwanzendes mit einem Skalpell gekappt. Durch Ausstreichen der Schwanzvene nach distal konnte so der benötigte Blutstropfen gewonnen werden.

### **2.2.4.4 Intraperitoneale Injektionen**

Die Verabreichung verschiedener Substanzen erfolgte durch intraperitoneale Injektionen. Hierbei wurden 1ml-Omnifix H-Spritzen und Microlance 3 – Kanülen (30 G) verwendet. Die Tiere wurden dabei mit einer Hand durch Fixierung an der Schwanzwurzel und der Nackenfalte gehalten, bevor die Injektion im rechten unteren Quadranten des Abdomens erfolgte.

### 2.2.5 Messung von Elektrolyt-Konzentrationen in Urin und Plasma

Es wurden Messungen von Elektrolytkonzentrationen im Sammelurin sowie in den gewonnenen Serumproben der Versuchstiere durchgeführt.

#### *Natrium, Kalium, Calcium*

Die Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium in Urin und Serum wurden mittels eines Flammenphotometers bestimmt. Zusammenfassend wird dabei die gelöste Messsubstanz als Aerosol in eine nicht leuchtende Flamme gebracht, wodurch eine substanzspezifische Färbung entsteht, die der Elektrolytkonzentration der Probe proportional ist. Durch Vergleich der Intensität mit einer bekannten Standardlösung wird hieraus die Probenkonzentration berechnet [118].

**Tabelle 2.11 - Konzentrationsbestimmung der Elektrolyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>**

Messparameter	Natrium, Kalium, Calcium
Gerätebezeichnung und Eigenschaften	Eppendorf EFOX 5057 <ul style="list-style-type: none"> <li>Messbereiche:                              Serum: Na<sup>+</sup> (80-180mmol/l), K<sup>+</sup> (1,0-9,99mmol/l), Ca<sup>2+</sup> (1-5 mmol/l)                              Urin: Na<sup>+</sup> (10-300mmol/l), K<sup>+</sup> (5-200mmol/l), Ca<sup>2+</sup> (0,5-20 mmol/l)</li> <li>Unpräzision: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ≤ 0,5% , Ca<sup>2+</sup> ≤ 0,8%</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>Einstellen der aufgetauten und gevortexten Proben im Eppendorf-Cup</li> <li>Kontrolle von Gasanschluss, Standard-, Reinigungs- und Messlösungen</li> <li>Anschalten des Photometers, Abwarten der Startreinigung und Auswahl von Messverfahren und Probenanzahl</li> <li>Automatisierter Ablauf der Messung</li> <li>Proben mit Elektrolytkonzentrationen außerhalb des empfohlenen Messbereichs wurden entsprechend mit Ampuwa verdünnt nachgemessen</li> </ul>



*Magnesium*

Magnesiumkonzentrationen wurden unter Verwendung eines Test-Kits photometrisch bestimmt. Die Messmethode beruhte auf einem photometrischen Farbttest auf Grundlage der Xylidylblaureaktion. Magnesium bildet dabei in alkalischer Lösung mit Xylidylblau einen purpurroten Komplex, dessen Absorption proportional zur Magnesiumkonzentration der Probe ist [119].

**Tabelle 2.12 - Konzentrationsbestimmung von Mg<sup>2+</sup>**

Messparameter	Magnesium
Testkit und Photometereinstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photometer: Thermo Scientific <i>Biomate 3</i></li> <li>• LT-SYS Magnesium mit Testreagenz und Standard (0,82 mmol/l)</li> <li>• Inkubationszeit 10min (Komplex für 60min stabil)</li> <li>• Absorptionsmessung bei 520nm Wellenlänge</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 µl Leerwert / Standard / Probe + 200 µl Testreagenz werden in Küvette pipettiert</li> <li>• Magnesium der Probe + Xylidylblau bilden purpurroten Komplex</li> <li>• Photometrisch messbare Absorption des gebildeten Komplexes ist proportional zur Konzentration</li> <li>• Proben außerhalb des linearen Messbereiches wurden entsprechend mit Ampuwa verdünnt</li> </ul>
Auswertung	$  \begin{aligned}  & \text{Konzentration (Probe)} = \\  & \frac{\text{Absorption (Probe)} - \text{Absorption (Leerwert)}}{\text{Absorption (Standard)} - \text{Absorption (Leerwert)}} \\  & \times \text{Standardkonzentration}  \end{aligned}  $

*Phosphat*

Die Phosphatkonzentrationen in Urin und Serum wurden mittels eines photometrischen Testkits bestimmt, bei dem die Testreagenz mit dem anorganische Phosphat der Probe einen Ammonium-Phosphomolybdat-Komplex bildet, dessen Absorption proportional zur Phosphatkonzentration der Probe ist [120].

**Tabelle 2.13 - Konzentrationsbestimmung von Phosphat**

Messparameter	Phosphat
Testkit und Photometereinstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photometer: Thermo Scientific <i>Biomate 3</i></li> <li>• LT-SYS Phosphat mit Testreagenz und Standard (1,29 mmol/l)</li> <li>• Inkubationszeit 10min (Komplex für 60min stabil)</li> <li>• Absorptionsmessung bei 340nm Wellenlänge</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 µl Leerwert / Standard / Probe + 300µl Testreagenz werden in Küvette pipettiert</li> <li>• Phosphat der Probe + Testreagenz bilden Ammonium-Phosphomolybdat-Komplex</li> <li>• Photometrisch messbare Absorption des gebildeten Komplexes ist proportional zur Konzentration</li> <li>• Proben außerhalb des linearen Messbereiches wurden entsprechend mit Ampuwa verdünnt</li> </ul>
Auswertung	$\text{Konzentration (Probe)} = \frac{\text{Absorption (Probe)} - \text{Absorption (Leerwert)}}{\text{Absorption (Standard)} - \text{Absorption (Leerwert)}} \times \text{Standardkonzentration}$

### 2.2.6 Glucose-Messung im Urin

Die Glucosekonzentrationen in den Urinsammelproben wurden durch eine photometrische Bestimmung mit Hilfe eines standardisierten Test-Kits ermittelt. Die Glucose der Probe wird dabei durch die Glucose-Oxidase der Testreagenz zu Gluconat oxidiert. Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxid wird zu Chinonimin umgesetzt (Trinder-Reaktion). Die Extinktion des gebildeten Farbstoffes ist proportional zur Glucosekonzentration der Probe [121].

**Tabelle 2.14 - Konzentrationsbestimmung von Glucose**

Messparameter	Glucose
Testkit und Photometereinstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photometer: Thermo Scientific <i>Biomate 3</i></li> <li>• LT-SYS Glucose mit Testreagenz und Standard (100mg/dl bzw. 5,55mmol/l)</li> <li>• Messung des Absorptionsanstiegs bei 546nm Wellenlänge nach 15 min Inkubation</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 µl Leerwert / Standardreihe / Probe + 200µl Testreagenz werden in Küvette pipettiert</li> <li>• Inkubation für 15 min</li> <li>• Photometrisch messbare Absorption des gebildeten Chinonimin ist proportional zur Konzentration</li> <li>• Proben außerhalb des linearen Messbereiches wurden entsprechend mit Ampuwa verdünnt</li> </ul>
Auswertung	Konzentrationsbestimmung durch X-Interpolation anhand der Standardreihen durch GraphPad Prism

### 2.2.7 Harnstoff-Messung im Plasma

Die Harnstoffkonzentration der gewonnenen Serumproben wurde durch eine photometrische Absorptionsbestimmung in einem enzymatischen Test durchgeführt. Das Enzym Urease katalysiert hierbei die enzymatische Spaltung des Harnstoffs in Ammoniak und Bikarbonat. Das Enzym GLDH (*Glutamatdehydrogenase*) katalysierte die folgende Reaktion des freiwerdenden Ammoniaks mit Ketoglutarat und NADH (*Nicotinamidadenindinukleotid*) zu Glutamat und NAD<sup>+</sup>. Der Verbrauch von NADH und die damit einhergehende Minderung der Absorption waren hierbei proportional zur Harnstoffkonzentration der Probe [122].

**Tabelle 2.15 - Konzentrationsbestimmung von Harnstoff**

Messparameter	Harnstoff (HST)
Testkit und Photometereinstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photometer: Thermo Scientific <i>Biomate 3</i></li> <li>• LT-SYS Harnstoff mit Testreagenz und Standard (40 mg/dl)</li> <li>• Messung des Absorptionsabfalls bei 340nm Wellenlänge nach 8 min Inkubation</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 µl Leerwert / Standard / Probe werden in Küvette pipettiert</li> <li>• Testreagenzherstellung: Lösung der Urease im Puffer</li> <li>• Zugabe von 300µl Testreagenz zur Probe                         <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Messung 1: unmittelbar nach Zugabe</li> <li>○ Messung 2: nach exakt 8min</li> <li>○ Delta = Minderung der Absorption (T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub>)</li> </ul> </li> <li>• Photometrisch messbare Absorptionsminderung (Delta) ist proportional zur Konzentration der Probe</li> </ul>
Auswertung	$\text{Konzentration (Probe)} = \frac{\text{Delta (Probe)} - \text{Delta (Leerwert)}}{\text{Delta (Standard)} - \text{Delta (Leerwert)}} \times \text{Standardkonzentration}$

### 2.2.8 Kreatinin-Messung im Urin

Die Kreatininkonzentrationen in den Urinsammelproben wurden durch eine photometrische Bestimmung mit Hilfe eines standardisierten Test-Kits (modifizierte Jaffé Methode) ermittelt. Das Kreatinin der Probe bildet dabei unter Zugabe der Testreagenz einen dunkelgelben Komplex mit der Pikrinsäure, dessen Absorption proportional zur Kreatininkonzentration der Probe ist [123].

**Tabelle 2.16 - Konzentrationsbestimmung von Kreatinin**

Messparameter	Kreatinin
Testkit und Photometereinstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photometer: Thermo Scientific <i>Biomate 3</i></li> <li>• LT-SYS Kreatinin mit Testreagenz und Standard (2mg/dl)</li> <li>• Messung des Absorptionsanstiegs bei 492nm Wellenlänge nach 8 min Inkubation</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µl Leerwert / Standard / Probe werden in Küvette pipettiert</li> <li>• Testreagenzherstellung: Pikrinsäure und Puffer im Verhältnis 1:1</li> <li>• Zugabe von 200µl Testreagenz zur Probe               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Messung 1: unmittelbar nach Zugabe</li> <li>○ Messung 2: nach exakt 8 min</li> <li>○ Delta = Absorptionsanstieg (T<sub>8</sub>-T<sub>0</sub>)</li> </ul> </li> <li>• Photometrisch messbarer Absorptionsanstieg (Delta) ist proportional zur Konzentration der Probe</li> </ul>
Auswertung	$\text{Konzentration (Probe)} = \frac{\text{Delta (Probe)} - \text{Delta (Leerwert)}}{\text{Delta (Standard)} - \text{Delta (Leerwert)}} \times \text{Standardkonzentration}$

### 2.2.9 Albumin-Messung in Urin und Plasma

Der Urin der Versuchstiere wurde während verschiedener Experimente auf das Vorliegen einer (Mikro-) Albuminurie hin getestet. Zudem wurde jeweils das Plasmaalbumin bestimmt. Hierfür wurde ein Testkit zur flourometrischen Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Testsubstanz Albumin Blue 580 (AB580) des Testkits entwickelt durch Bindung an Albumin eine rote Floureszenz, die der Albuminkonzentration der Probe proportional ist [124].

**Tabelle 2.17 - Konzentrationsbestimmung von Albumin**

Messparameter	Albumin
Testkit und Flourometer-einstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flourometer SPECTRAFlour</li> <li>• Testkit mit AB580 Testreagenz und Verdünnungspuffer, eigene Standardreihen für murines und bovines Albumin (gelöstes Pulver)</li> <li>• Automatisierte Messung der Floureszenz unter Anregung mit 590nm und Emission bei 635nm Wellenlänge</li> </ul>
Messablauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 µl Leerwert / Standardreihen (murines und bovines Albumin) / Proben (Plasma verdünnt) werden in Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert</li> <li>• Testreagenzherstellung: 360µl der Testreagenz AB580 wurde mit Verdünnungspuffer auf 18ml aufgefüllt</li> <li>• Pipettierung von je 150µl Testreagenz zur Probe                         <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Mischung des Testansatzes durch Mikrotiterplattenschüttler</li> </ul> </li> <li>• Einschalten des Flourometers und Festlegung der Messeinstellungen</li> <li>• Darstellung der Floureszenzmesswerte in Excel-Diagramm durch Flourometer-Software als relative Floureszenz Counts (RFC) / Minute</li> </ul>
Auswertung	X-Interpolation anhand der gemessenen Standardreihen (bovines / murines Albumin) durch GraphPad Prism

## 2.2.10 Seriendesigns

### 2.2.10.1 Kontrolle

Die Versuchstiere wurden zunächst unter Kontrollbedingungen auf das Vorliegen genotypenspezifischer Unterschiede hin untersucht.

**Tabelle 2.18 - Datenerhebung unter Kontrollbedingungen**

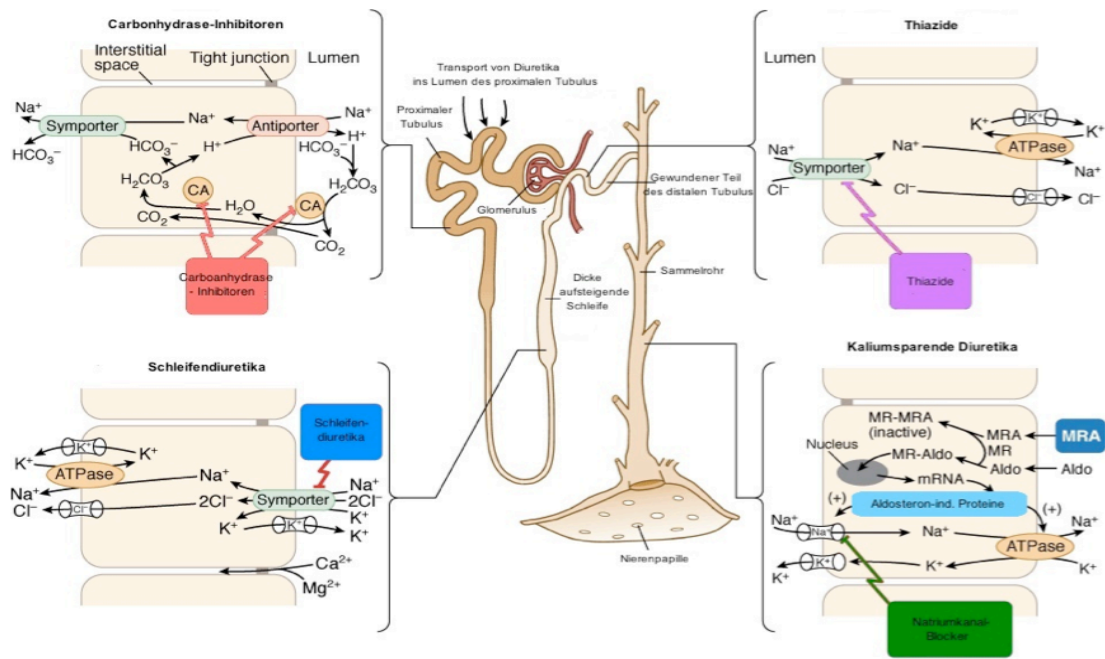
	Serientag	Intervention
Bedingungen		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelhaltung in metabolischen Käfigen</li> <li>• Leitungswasser und C1000-Spezialdiät</li> <li>• Bilanzierung und Urinsammlung</li> </ul>
Kontrolle	Tag 1-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Urinsammlung und Bilanzierung</li> <li>• Blutentnahme an Tag 3</li> </ul>

### 2.2.10.2 Diuretikaapplikationen

Den Versuchstieren wurden Diuretika verabreicht, die mit Resorptionsprozessen in unterschiedlichen Abschnitten des Tubulussystems (Abb. 2.3) interagieren, um dadurch tubuläre Gegenregulationsmechanismen zu erzwingen. Die Applikation von Diuretika erfolgte als Lösung im Trinkwasser.

**Tabelle 2.19 - Verwendete Diuretika**

Diuretikum	Konzentration	Tubulärer Angriffspunkt
Acetazolamid	400 mg/l	proximaler Tubulus (Carboanhydrase)
Furosemid	125 mg/l	Henle-Schleife (NKCC2-Transporter)
Hydrochlorothiazid (HCT)	400 mg/l	Distaler Tubulus (NCC-Transporter)
Triamteren	200 mg/l* *pH-Meter-kontrollierte Ansäuerung auf pH 2 durch 1N HCl zur Löslichkeitsverbesserung	Sammelrohr (ENaC)



**Abbildung 2.3 - Angriffspunkte der eingesetzten Diuretika:** Schematische Darstellung der Wirkmechanismen und Angriffspunkte der verwendeten Diuretika im Tubulussystem [125].

Um die gelösten Substanzen vor einem beschleunigten Zerfall durch Lichteinfall zu schützen, wurden die Trinkflaschen mit den darin befindlichen Lösungen während aller Ansätze stets in Aluminiumfolie gewickelt.

**Tabelle 2.20 - Ablauf der Diuretikaversuche**

	Serientag	Intervention
Bedingungen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelhaltung in metabolischen Käfigen</li> <li>• Leitungswasser und C1000-Spezialdiät</li> <li>• Bilanzierung und Urinsammlung</li> </ul>	
Kontrolle	Tag 1-2	Urinsammlung und Bilanzierung
Diuretikaapplikation	Tag 3-7	Diuretika mit dem Trinkwasser, Urinsammlung und Bilanzierung, Blutentnahme an Tag 7



### 2.2.10.3 Diabetes-Induktion

Um die Relevanz von mTORC1 und mTORC2 für die tubuläre Adaptation an ein diabetisches Stressmodell zu prüfen, wurde bei den Versuchstieren durch Applikation des Beta-Zellgifts Streptozotocin (STZ) eine diabetische Stoffwechsellage entsprechend eines insulinopenen Typ-I-Diabetes erzeugt. STZ ist ein biologisches Zytostatikum und wird selektiv über den Glucose-Transporter-2 (GLUT2), welcher in hoher Dichte in der Membran der pankreatischen Betazellen vorkommt, in die Zelle aufgenommen. In der Zelle führt das Zytostatikum STZ über eine Alkylierung von DNA zu deren Zerstörung [126, 127].

Ein Protokoll des „*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*“ diente als Vorlage zur Niedrigdosis-STZ-Applikation [128]. Streptozotocin wurde den Tieren als in einem Natrium-Citrat-Puffer vorliegende Injektionslösung in einer Dosierung von 50mg / kg Körpergewicht / Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert. Der Puffer (vgl. 2.1.5) wurde einmalig vor Beginn der Induktion zubereitet. Auf Grund des schnellen biologischen Zerfalls von STZ [129] wurde die Injektionslösung stets erst unmittelbar vor der Injektion hergestellt. Das Injektionsvolumen wurde an das jeweilige Körpergewicht der Mäuse angepasst um die genannte Dosierung zu erzielen. Der Erfolg der Diabetes-Induktion wurde im Verlauf durch Blutzuckerbestimmungen aus Schwanzvenenblut kontrolliert.

**Tabelle 2.21 - Diabetesinduktion und Datenerhebung**

	Serientag	Intervention
Diabetesinduktion	Tag -5 bis -1	50mg STZ /kg KG/d intraperitoneal
Blutzuckermessungen	ab Tag 1 bis Serienende	BZ-Messung
Kontrolle 1	Woche 2 post induction (p.i.)	Urinsammlung und Blutentnahme
Kontrolle 2	Woche 4 p.i.	
Opferung	Ende Woche 4 p.i.	Tötung der Tiere, Entnahme und Wiegen der Nieren

#### 2.2.10.4 Albuminbelastung

Um die tubuläre Albuminresorption unter Belastung mit Albumin zu prüfen, wurde bei den Tieren intraperitoneale Albumininjektionen durchgeführt. Hierbei wurde endotoxin-freies bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

Die Injektionslösung wurde durch Lösung des Albuminpulvers in PBS-Puffer (250mg BSA / ml PBS-Puffer) hergestellt. Anschließend erfolgte die einmalige, gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion von 10 mg BSA / g KG (= 40 µl Injektionslösung / g KG).

**Tabelle 2.22 - Albuminbelastung und Datenerhebung**

	Serientag	Intervention
Bedingungen		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelhaltung in metabolischen Käfigen</li> <li>• Leitungswasser und C1000-Spezialdiät</li> <li>• Bilanzierung und Urinsammlung</li> </ul>
Kontrolle	Tag 1	Urinsammlung und Injektion von 40µl BSA/g KG i.p.
Albuminbelastung	Tag 2	Urinsammlung und Blutentnahme

#### 2.2.14 Tötung der Versuchstiere

Zur Bestimmung des Nierengewichts, sowie nach Beendigung der Experimente mussten die Versuchstiere getötet werden. Hierbei wurde streng nach Tierschutzgesetz (§4 TierSchG) [130] vorgegangen.

Die Versuchstiere wurden zunächst in tiefe Narkose versetzt, bevor im Anschluss eine zervikale Dislokation erfolgte. Der Schädel des zu tötenden Tieres wurde hierzu mittels einer im Nacken aufgedrückten Pinzette fixiert, während ein ruckartiger Zug an der Schwanzwurzel zu einer Durchtrennung des Rückenmarks zwischen Schädel und erstem Halswirbel führte.

### **2.2.11 Bestimmung des Nierengewichts**

Zur Bestimmung des Nierengewichtes und insbesondere zur Kontrolle der Nierengewichtsveränderungen im diabetischen Stressmodell wurden die Nieren der getöteten Tiere entnommen und gewogen. Zur Entnahme wurden die zuvor getöteten Tiere durch Pins in Rückenlage auf einer Styroporplatte fixiert. Nach Längslaparotomie wurde bis zu den Nierenlagern präpariert. Hier wurden die Arteria und Vena renalis sowie der Ureter am Nierenbecken abgesetzt und die Nieren entnommen. Die Nieren wurden auf einer Präzisionswaage einzeln gewogen und das jeweilige Gewicht notiert.

### **2.2.12 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel® sowie der Statistik- und Grafiksoftware GraphPad Prism® durchgeführt.

Die Daten wurden anhand von *D'Agostino & Pearson normality tests* auf Normalverteilung hin überprüft. Zur Varianzanalyse wurden *One-way ANOVA-Analysen* bei normalverteilten Daten, sowie *Kruskal-Wallis-Tests* bei nicht-normalverteilten Daten herangezogen. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Datensätzen der verschiedenen Genotypen wurde mittels *student's t-test* Analysen überprüft. Bei nicht normalverteilten Ergebnissen wurde ein *Dunn-Posttest* verwendet.

Unterschiede zwischen Datensätzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,05 wurden dabei als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

Wo nicht anders vermerkt sind alle Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Bilanz- und Ausscheidungsparameter beziehen sich jeweils auf den Zeitraum eines Beobachtungstages.

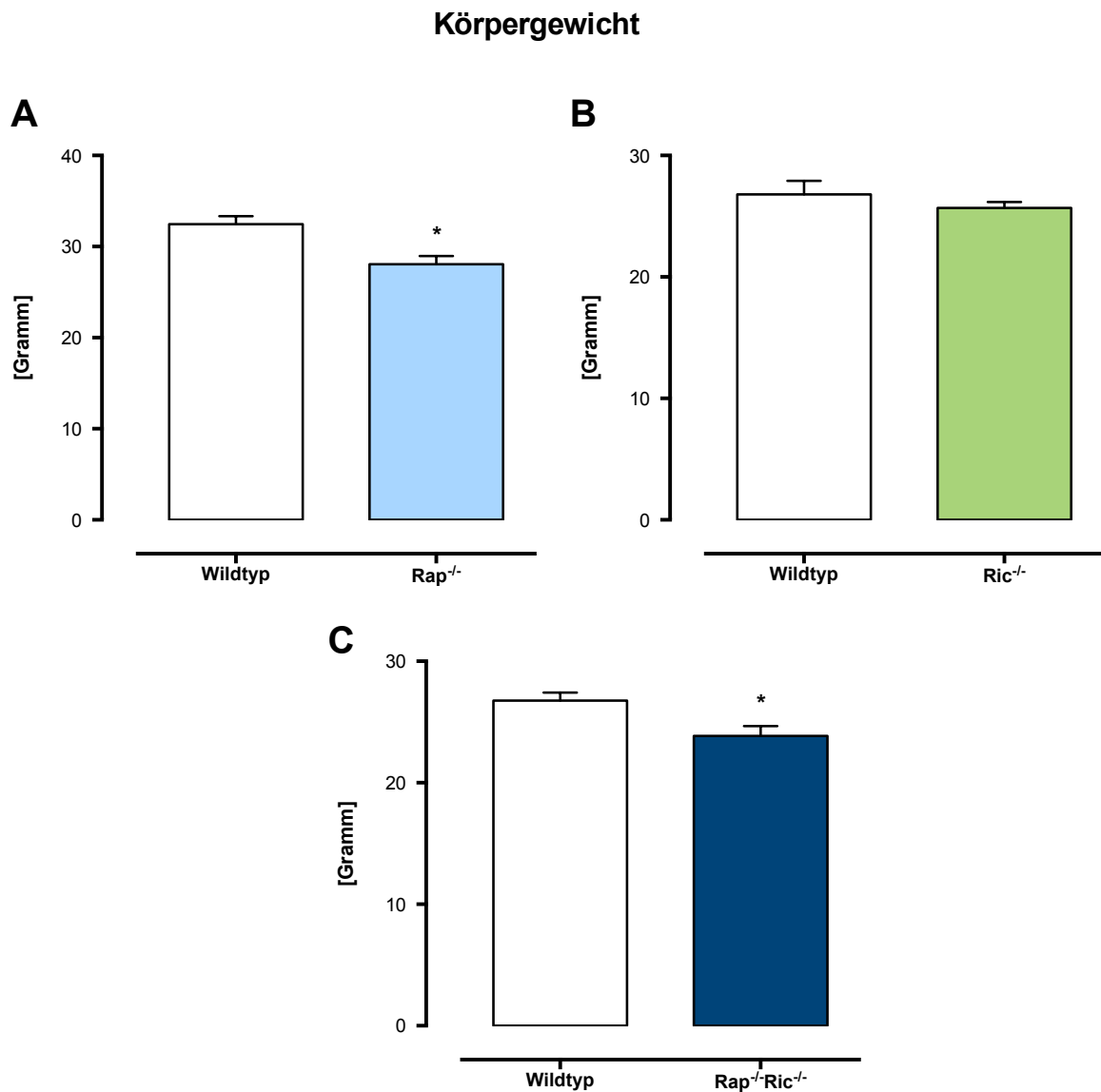
#### 3.1 Daten unter Kontrollbedingungen

Die Tiere der verschiedenen Genotypen (Wildtyp, sowie die KO-Tiere  $Rap^{-/-}$ ,  $Ric^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ ) wurden zunächst unter Kontrollbedingungen (vgl. Kapitel 2.2.2) auf das Vorliegen von Genotyp-spezifischen Unterschieden hin untersucht.

##### 3.1.1 Gewicht

Die Erhebung des Körpergewichts wurde bei Tieren annähernd gleichen Alters durchgeführt. Das Geschlechterverhältnis war dabei in allen analysierten Gruppen ausgewogen. Um einen optimalen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Körpergewichtsdaten hier ausnahmsweise streng innerhalb der eigenen Kohorten aus KO- und Wildtyp-Tieren (als Vergleich von Geschwistertieren mit und ohne Gendeletion) analysiert.

Tiere mit mTORC1-Deletion (im Folgenden  $Rap^{-/-}$  genannt) wiesen ein Gewicht von  $28,1 \pm 0,9$  g auf und waren dabei signifikant leichter als ihre Wildtyp-Geschwistertiere mit  $32,5 \pm 0,9$  g (p-Wert 0,01). Auch die Tiere mit mTORC1/mTORC2-Doppel-KO (im Folgenden  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  genannt) waren mit einem Körpergewicht von  $23,9 \pm 0,8$  g signifikant leichter als ihre kohortenspezifische Kontrollgruppe mit  $23,9 \pm 0,8$  g (p-Wert 0,04). Die Tiere mit mTORC2-Deletion (im Folgenden  $Ric^{-/-}$  genannt) unterschieden sich bei einem Körpergewicht von  $25,7 \pm 0,5$  g nicht signifikant von ihrer Wildtyp-Kontrollgruppe, die ein mittleres Körpergewicht von  $26,8 \pm 1,1$  g aufwies.



**Abbildung 3.1 - Körpergewicht unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte des Körpergewichts der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in Gramm.

(A) Rap<sup>-/-</sup>-Kohorte (n [Wildtyp] = 20, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 20), Alter 173 ± 2 Tage

(B) Ric<sup>-/-</sup>-Kohorte (n [Wildtyp] = 12, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 12), Alter 155 ± 2 Tage

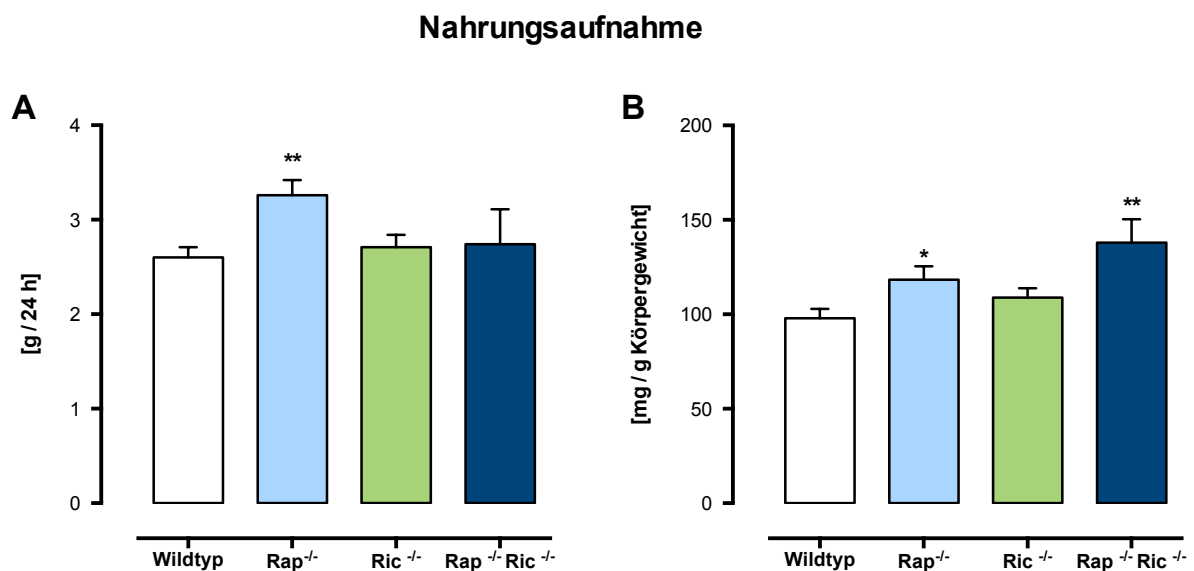
(C) RapRic<sup>-/-</sup>-Kohorte (n [Wildtyp<sup>-/-</sup>] = 16, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 18), Alter 151 ± 5 Tage

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01.

### 3.1.2 Nahrungsaufnahme

Bezüglich der Nahrungsaufnahme ergaben sich auffällige Befunde auf Seiten der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ . Die Normierung der Werte anhand des Körpergewichts ermöglicht hierbei die beste Vergleichbarkeit der unterschiedlich schweren Genotypen (vgl. 5.1.1).  $Rap^{-/-}$  - Tiere nahmen hier mit  $118 \pm 7$  mg Futter / g Körpergewicht ebenso wie  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  - Tiere mit  $138 \pm 12$  mg Futter / g Körpergewicht signifikant mehr Nahrung zu sich als Wildtyp-Tiere mit  $98 \pm 4$  mg Futter / g Körpergewicht.

Die Tiere des  $Ric^{-/-}$ -Genotyps unterschieden mit einer Nahrungsaufnahme von  $109 \pm 5$  mg Futter / g Körpergewicht nicht signifikant vom Wildtyp.



**Abbildung 3.2 - Nahrungsaufnahme unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der Nahrungsaufnahme der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in g / 24h (A) und in mg / g Körpergewicht (B).

(n [Wildtyp] = 31, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 12, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 12, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 6)

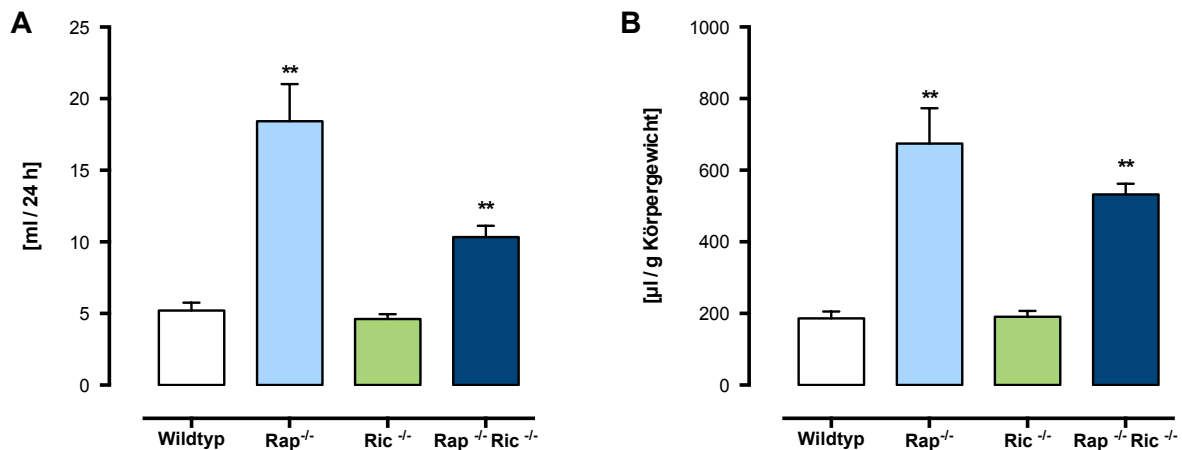
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.3 Trinkmenge

Die Trinkmengenerhebung zeigte eine erhöhte Trinkmenge der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ . Dies traf sowohl für die absoluten, als auch die anhand des Körpergewichts normierten Werte zu.  $Rap^{-/-}$ -Tiere tranken  $675 \pm 98 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht,  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere  $532 \pm 30 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht und damit jeweils signifikant mehr als Wildtyp-Tiere mit  $186 \pm 19 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht.

$Ric^{-/-}$  unterschied sich bei einer Trinkmenge von  $191 \pm 16 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht nicht signifikant vom Wildtyp.

### Trinkmenge



**Abbildung 3.3 - Trinkmenge unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der Trinkmenge der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in ml / 24h (A) und  $\mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht (B).

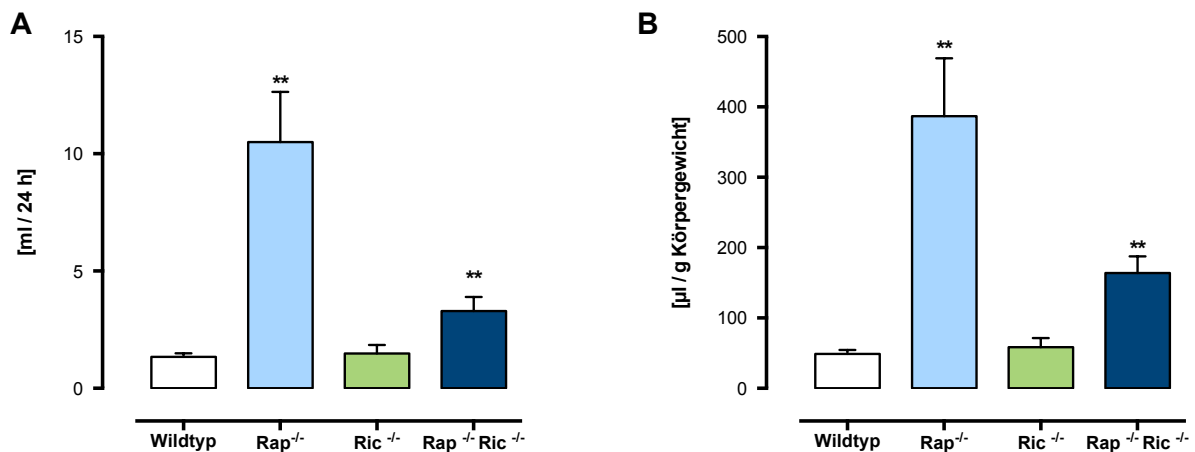
(n [Wildtyp] = 29, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 12, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 11, n [ $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.4 Urinmenge

Die Urinmengenerhebung zeigte eine zur Polydipsie (vgl. 3.1.3) passende (absolute wie relative) Polyurie der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ . Auch hier konnten bei einem Urinvolumen von  $387 \pm 82 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht des  $Rap^{-/-}$ -Genotyps, sowie  $164 \pm 24 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps signifikante Abweichungen vom Wildtyp mit  $49 \pm 6 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht beobachtet werden. Die  $Ric^{-/-}$ -Tiere unterschieden sich bei einem Urinvolumen  $58 \pm 13 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht wiederum nicht signifikant vom Wildtyp.

### Urinvolumen



**Abbildung 3.4 - Urinvolumen unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte des Urinvolumens der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in ml / 24h (A) und  $\mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht (B),

(n [Wildtyp] = 32, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 12, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 12, n [ $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01



### 3.1.5 Elektrolythaushalt

Der Elektrolythaushalt wurde zunächst unter Kontrollbedingungen durch Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen im Plasma sowie der Elektrolytausscheidung im Urin untersucht.

#### 3.1.5.1 Elektrolytkonzentrationen im Plasma

##### *Natrium*

Die Messungen der Plasmanatriumkonzentrationen zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Tieren. Die Tiere des Genotyps Ric<sup>-/-</sup> wiesen darüber hinaus auch bei den weiteren erhobenen Plasmaelektrolytkonzentrationen (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Phosphat) Wildtypen-identische Werte auf.

##### *Kalium*

Rap<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen mit  $3,3 \pm 0,1$  mmol / l eine im Vergleich zum Wildtyp mit  $3,8 \pm 0,1$  mmol / l signifikant erniedrigte Kaliumkonzentration im Plasma auf. Tiere des Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Genotyps wiesen hier mit  $3,7 \pm 0,1$  mmol / l lediglich eine nicht signifikante, leichte Erniedrigung des Plasmakaliums auf.

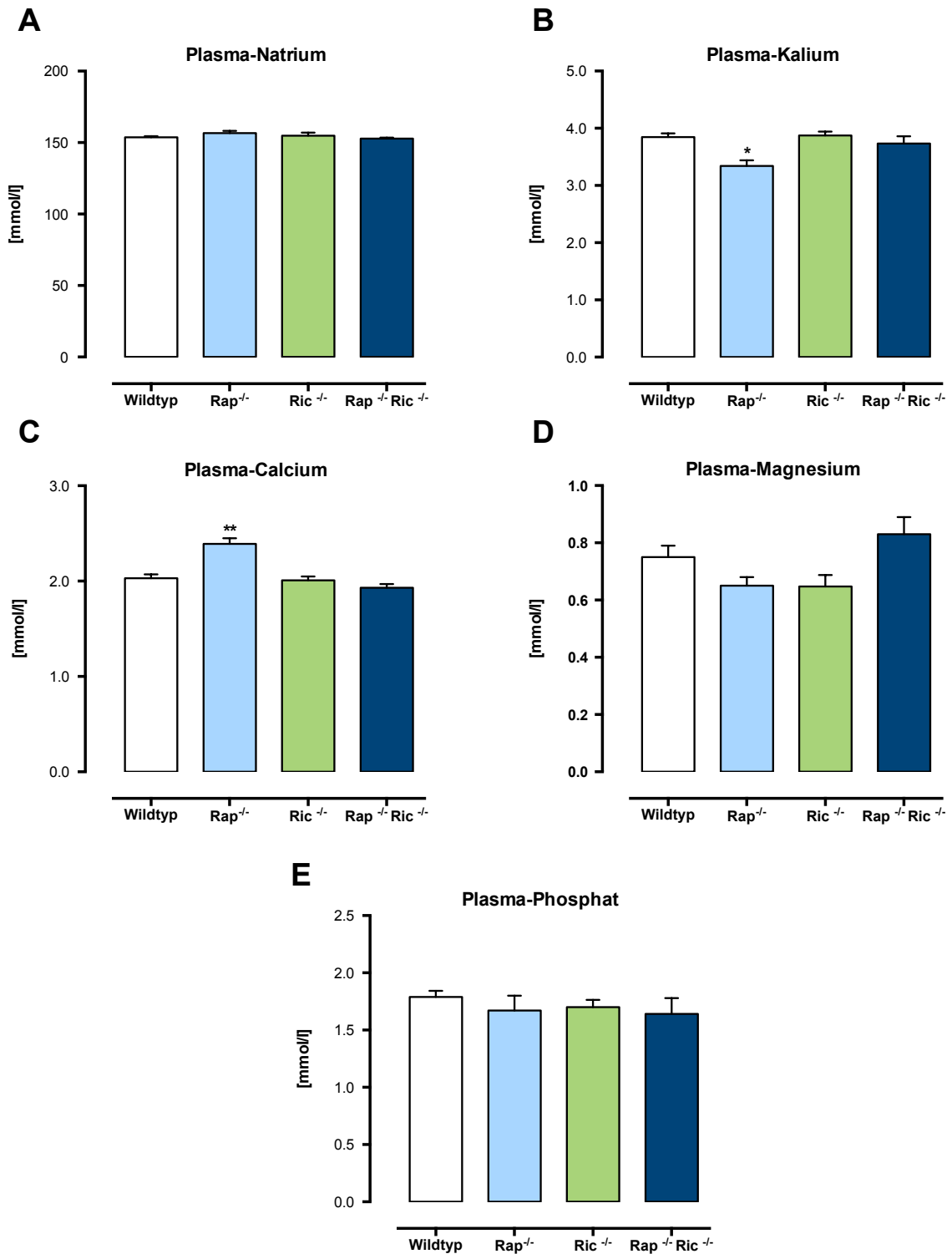
##### *Calcium und Magnesium*

Beim Genotyp Rap<sup>-/-</sup> konnte eine mit  $2,4 \pm 0,1$  mmol / l signifikant höhere Plasmacalciumkonzentration beobachtet werden als beim Wildtyp mit  $2,0 \pm 0,04$  mmol / l. Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup> unterschied sich hier nicht vom Wildtyp. Bezüglich der plasmatischen Magnesiumkonzentrationen unterschieden sich Wildtyp- und KO-Tiere nicht voneinander.

##### *Phosphat*

Die Plasmaphosphatkonzentrationen von Wildtyp- und KO-Tiere unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.5 - Plasmaelektrolytkonzentrationen unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Natrium (A), Kalium (B), Calcium (C), Magnesium (D) und Phosphat (E) der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in mmol / l.

(n [Wildtyp] = 23, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 9)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.5.2 Elektrolytausscheidung im Urin

Die Konzentrationen der mit dem Urin ausgeschiedenen Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphat wurden bestimmt und zur besseren Vergleich- und Interpretierbarkeit anhand der Kreatininausscheidung sowie der aufgenommenen Futtermenge normiert.

#### *Natrium und Kalium*

Bei den Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  konnte eine erhöhte Urinausscheidung der beiden wichtigsten Elektrolyte Natrium und Kalium (bei  $Rap^{-/-}$  lediglich als Trend) festgestellt werden. Die mTORC1/mTORC2-Doppeldeletion der  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere führte hier jeweils zu einem ausgeprägteren Phänotyp als die einfache mTORC1-Deletion der  $Rap^{-/-}$ -Tiere. Die alleinige mTORC2-Deletion der  $Ric^{-/-}$ -Tiere führte zu keinen Auffälligkeiten dieser Parameter.

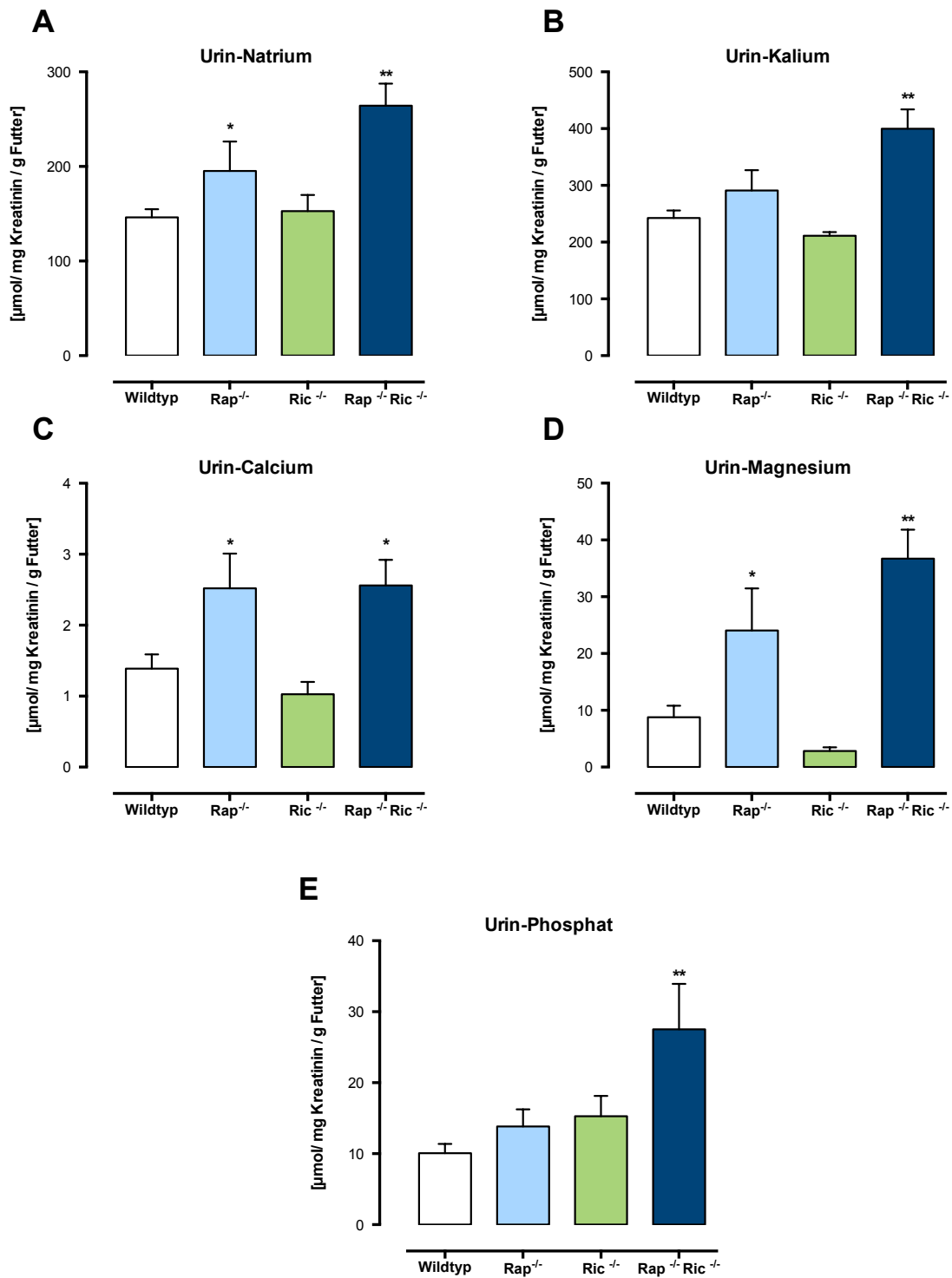
#### *Calcium und Magnesium*

Analog dazu konnten auch bezüglich der Ausscheidung von Magnesium und Calcium bei den Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  erhöhte Werte festgestellt werden.  $Ric^{-/-}$ -Tiere wiesen wiederum eine Wildtypen-identische Ausscheidung auf.

#### *Phosphat*

Beim Genotyp  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  konnte ein erhöhte Urinausscheidung von Phosphat beobachtet werden. Die Einzel-KO-Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Ric^{-/-}$  unterschieden sich hier nicht signifikant vom Wildtyp.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6 - Urin-Elektrolytausscheidung unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der renalen Ausscheidung der Elektrolyte Natrium (A), Kalium (B), Calcium (C), Magnesium (D) und Phosphat (E) der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in  $\mu\text{mol/mg Kreatinin/g Futter}$ .

(n [Wildtyp] = 23, n [ $\text{Rap}^{-/-}$ ] = 12, n [ $\text{Ric}^{-/-}$ ] = 12, n [ $\text{Rap}^{-/-} \text{Ric}^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

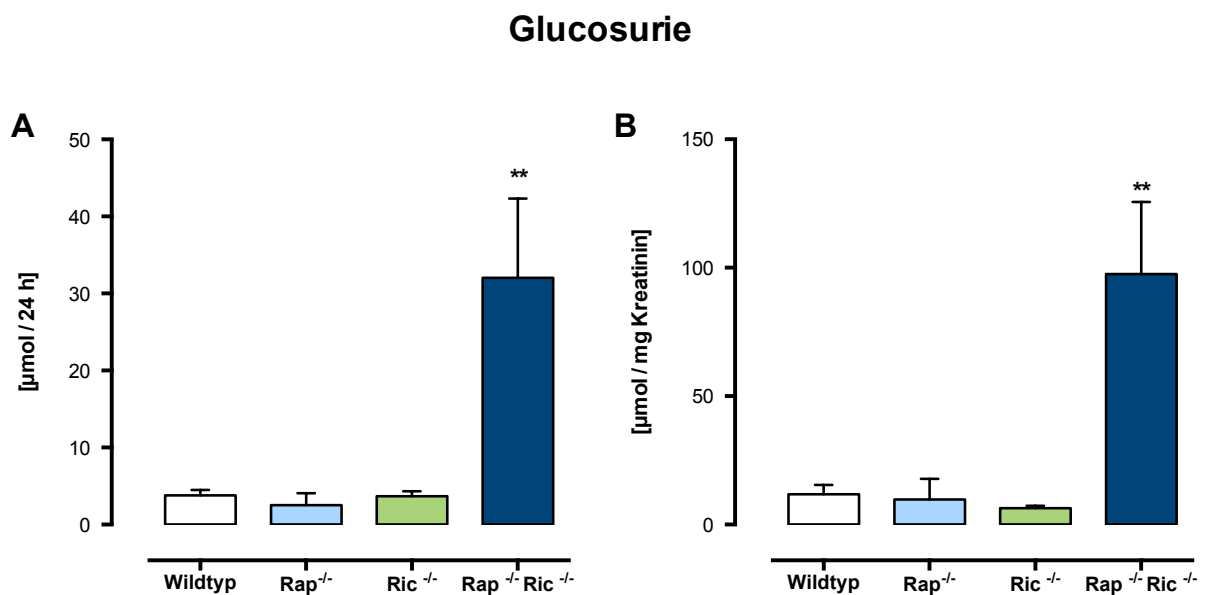
### 3.1.6 Tubuläre Nährstoffresorption

Zur weiteren Untersuchung der tubulären Funktion wurden die Versuchstiere auf einen renalen Nährstoffverlust hin untersucht. Hierbei wurden die Ausscheidungen von Glucose, Aminosäuren und Albumin im Urin gemessen.

#### 3.1.6.1 Glucose

Der Urin der Versuchstiere wurde auf das Vorliegen einer Glucosurie hin untersucht und die Werte anhand des Urinkreatinins normiert. Rap<sup>-/-</sup> und Ric<sup>-/-</sup> unterschieden sich dabei nicht signifikant vom Wildtyp.

Beim Doppel-KO-Modell Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup> konnte eine signifikante Glucosurie beobachtet werden. Diese Tiere schieden mit  $98 \pm 28 \mu\text{mol} / \text{mg}$  Kreatinin fast zehnmal soviel Glucose aus wie der Wildtyp mit  $12 \pm 3 \mu\text{mol} / \text{mg}$  Kreatinin.



**Abbildung 3.7 - Glucoseausscheidung unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der renalen Glucoseausscheidung der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in  $\mu\text{mol} / 24\text{h}$  (A) und in  $\mu\text{mol} / \text{mg}$  Kreatinin (B).

(n [Wildtyp] = 21, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 5, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 5)

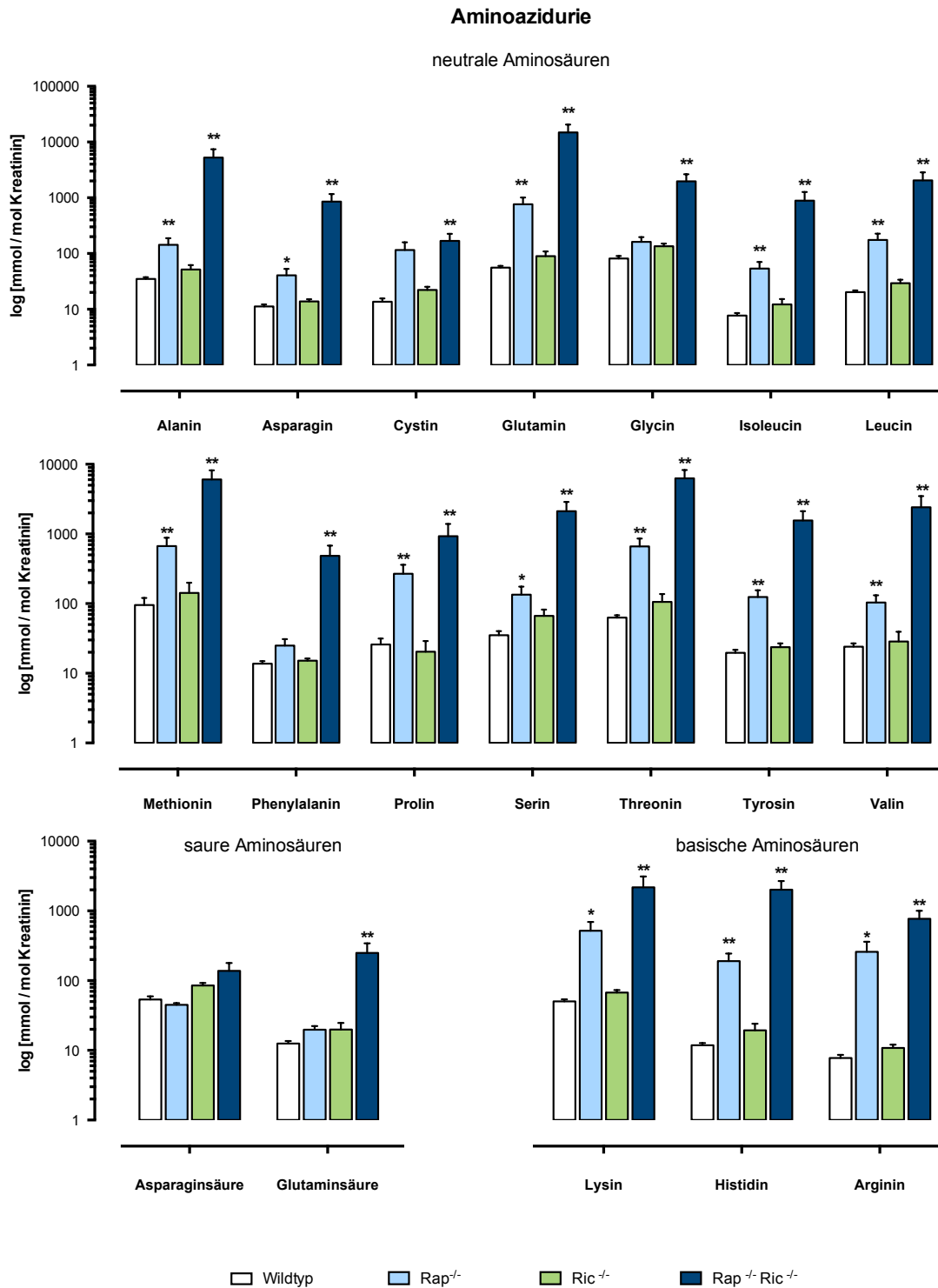
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.6.2 Aminosäuren

Bei der Bestimmung der Aminosäureausscheidung im Urin ließ sich eine (mit wenigen Ausnahmen, siehe Abb. 3.8) globale Aminoazidurie der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  beobachten. Die Tiere mit  $Ric^{-/-}$ -Genotyp wiesen stets Wildtypen-identische Werte oder statistisch nicht signifikante, leichte Erhöhungen der Aminosäureausscheidung auf.

Zu beobachten war darüber hinaus, dass die Deletion beider mTOR-Komplexe bei den  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tieren zu einer stärkeren Ausprägung dieses Phänotyps führte als die einfache mTORC1-Deletion der  $Rap^{-/-}$ -Tiere. Dies war für die neutralen (mit Ausnahme von Cystein, Glycin und Phenylalanin) und basischen Aminosäuren feststellbar und lies sich als wiederkehrendes Muster erkennen. Auch hinsichtlich der Ausscheidung saurer Aminosäuren konnte bei den Tieren des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps erhöhte Werte (statistisch signifikant für Glutaminsäure) beobachtet werden, während  $Rap^{-/-}$  und  $Ric^{-/-}$ -Tiere keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Werten des Wildtyps aufwiesen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.8 - Aminosäureausscheidung unter Kontrollbedingungen:**

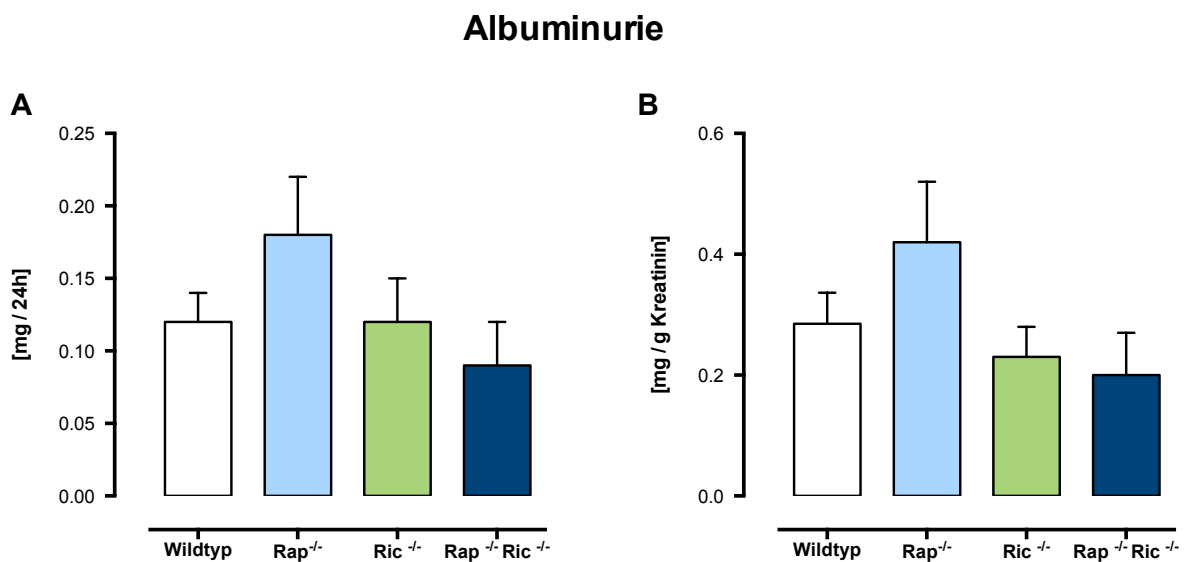
Logarithmische Darstellung der Mittelwerte der Ausscheidung neutraler, saurer und basischer Aminosäuren der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in mmol / mol Kreatinin.

(n [Wildtyp] = 18, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 9, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 7)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.6.3 Albumin

Um das Vorliegen einer Albuminurie zu prüfen wurden Albuminmessungen im Urin durchgeführt und die Absolutausscheidung zusätzlich anhand des jeweiligen Urinkreatinins als Albumin-Kreatinin-Ratio normiert. Unter Kontrollbedingungen wurden hier keine Auffälligkeiten festgestellt. Sowohl Wildtyp-Tiere, als auch die verschiedenen KO-Genotypen wiesen nur eine minimale Ausscheidung von Albumin auf. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden dabei nicht.



**Abbildung 3.9 - Albuminausscheidung unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte der Urin-Albuminausscheidung der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in mg / 24 (A) und in mg / g Kreatinin (B).

(n [Wildtyp] = 20, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 17, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 12, n [Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>] = 9)

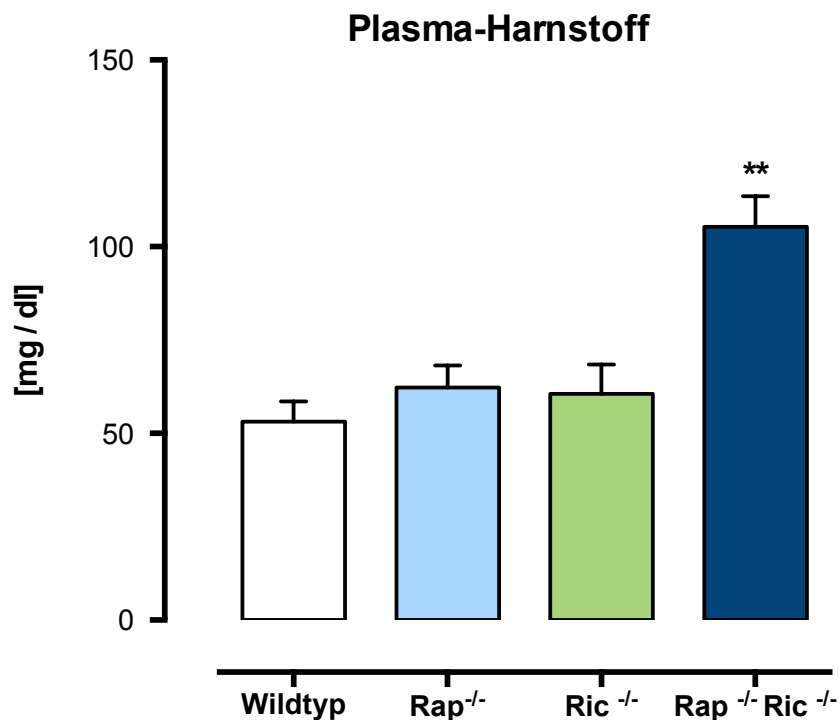
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01



### 3.1.7 Globale Nierenfunktionsparameter

#### 3.1.7.1 Harnstoff im Plasma

Die unter Kontrollbedingungen erhobenen Daten der Plasma-Harnstoff-Konzentrationen zeigten statistisch signifikant erhöhte Werte der Tiere mit  $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ -Genotyp, welche einen Durchschnittswert von  $105 \pm 8 \text{ mg / dl}$  im Vergleich zu einer durchschnittlichen Harnstoffkonzentration von  $53 \pm 5 \text{ mg / dl}$  auf Seiten des Wildtyps aufwiesen. Die Genotypen  $\text{Rap}^{-/-}$  mit einer mittleren Konzentration von  $62 \pm 6 \text{ mg / dl}$  sowie  $\text{Ric}^{-/-}$  mit  $61 \pm 8 \text{ mg / dl}$  unterschieden sich nicht signifikant von den Wildtyp-Tieren.



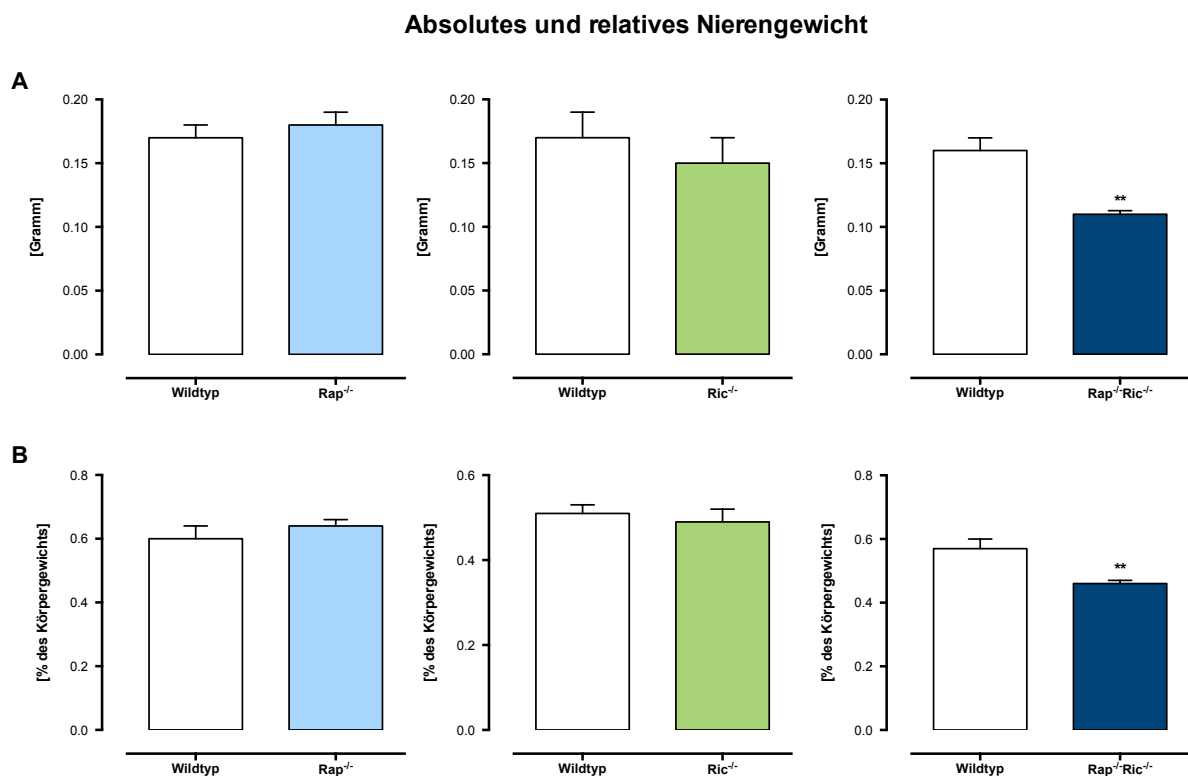
**Abbildung 3.10 - Plasmaharnstoff unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte des Plasma-Harnstoffs der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in mg / dl.

(n [Wildtyp] = 17, n [ $\text{Rap}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Ric}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.7.3 Nierengewicht

Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Versuchstiere getötet und das Nierengewicht bestimmt. Analog zum Körpergewicht wurden die Daten innerhalb der jeweiligen Kohorte als Vergleich zwischen Geschwistertieren analysiert. Die Tiere des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps wiesen mit einem Nierengewicht von  $0,46 \pm 0,01\%$  des Körpergewichts signifikant niedrigere Werte auf als die entsprechenden Wildtyp-Tiere. Die Einzel-KO-Tiere unterschieden sich bei Nierengewichtswerten von  $0,64 \pm 0,02\%$  des Körpergewichts bei  $Rap^{-/-}$  und  $0,49 \pm 0,03\%$  des Körpergewichts bei  $Ric^{-/-}$  nicht signifikant vom jeweiligen Wildtyp der Kohorte. Das Absolutgewicht der Nieren verhielt sich hierzu analog.



**Abbildung 3.11 - Nierengewicht unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte des Nierengewichts der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen in g (A) und in Prozent des Körpergewichts (B), jeweils je Niere.

$Rap^{-/-}$ -Kohorte (n [Wildtyp] = 5, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 12),  $355 \pm 2$  Tage

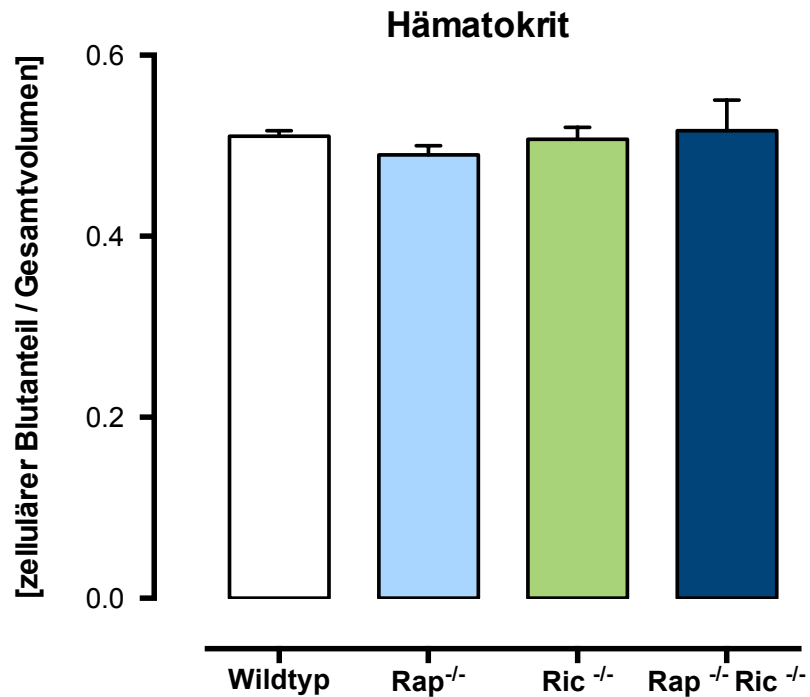
$Ric^{-/-}$ -Kohorte (n [Wildtyp] = 4, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 6),  $329 \pm 4$  Tage

$RapRic^{-/-}$ -Kohorte (n [Wildtyp $^{-/-}$ ] = 18, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 15), Alter  $212 \pm 7$  Tage

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.1.8 Hämatokrit

Bei der Bestimmung des Hämatokrits wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Der ermittelte zelluläre Blutanteil am Gesamtvolumen lag bei den untersuchten Genotypen zwischen 0,49 und 0,51.



**Abbildung 2.12 - Hämatokrit unter Kontrollbedingungen:** Mittelwerte des Hämatokrits der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen (zellulärer Anteil des Gesamt-Blutvolumens).

(n [Wildtyp] = 24, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \*=p-Wert vs Wildtyp <0,05, \*\*=p-Wert vs Wildtyp <0,01

### 3.2 Diuretika-Applikation

Diuretika mit unterschiedlichen Angriffspunkten im Tubulussystem der Niere wurden eingesetzt um tubuläre Gegenregulationsmechanismen bei den Versuchstieren zu untersuchen. Die Diuretika Acetazolamid, Furosemid, Hydrochlorothiazid und Triamteren wurden den Tieren jeweils im Trinkwasser gelöst verabreicht.

#### 3.2.1 Gewichtsverlust unter Diuretika-Applikation

Über die Dauer der Diuretikaapplikation wurde das Körpergewicht der Tiere als Surrogatparameter für das Gesamtkörperwasser beobachtet. Die verschiedenen Genotypen wurden hinsichtlich der Abnahme ihres Körpergewichts nach fünf Behandlungstagen verglichen.

##### *Acetazolamid*

Die Genotypen  $Rap^{-/-}$  mit einem Gewichtsverlust von  $10,6 \pm 0,8\%$  des Körpergewichts und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  mit einem Verlust von  $18,9 \pm 1,1\%$  des Körpergewichts verloren signifikant mehr Gewicht als die Tiere mit Wildtyp-Genom, welche  $6,9 \pm 1,0\%$  ihres Ausgangsgewichts verloren. Die  $Ric^{-/-}$ -Tiere unterschieden sich bei einem Verlust von  $5,5 \pm 0,8\%$  ihres Körpergewichts nicht signifikant vom Wildtyp.

##### *Furosemid*

Unter Furosemidbehandlung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Tieren festgestellt werden. Wildtyp-Tiere verloren durchschnittlich  $1,2 \pm 0,6\%$  ihres Körpergewichts,  $Rap^{-/-}$ -Tiere mit  $0,8 \pm 0,6\%$  ihres Körpergewichts tendenziell sogar etwas weniger.  $Ric^{-/-}$ -Tiere verzeichneten einen Verlust von  $2,3 \pm 0,5\%$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere  $2,8 \pm 1,5\%$  ihres Körpergewichts.

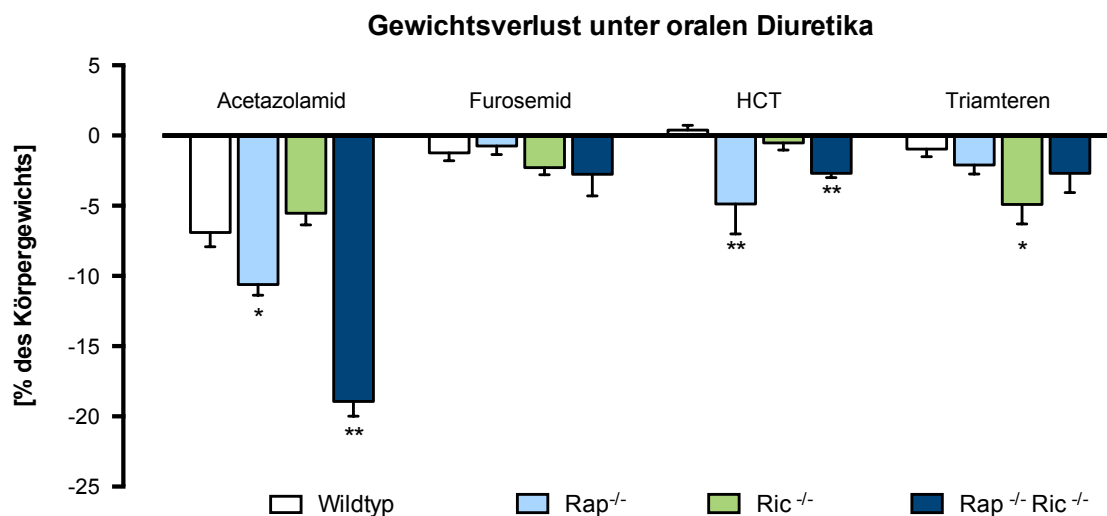
## Ergebnisse

### Hydrochlorothiazid

Unter Blockade distal-tubulärer Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>-Kanäle durch Hydrochlorothiazid konnte bei den Tieren mit Rap<sup>-/-</sup>- und Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Genom ein signifikant höherer Körpergewichtsverlust beobachtet werden als beim Wildtyp, während sich der Ric<sup>-/-</sup>-Genotyp nicht signifikant von diesem unterschied. Wildtyp-Tiere nahmen trotz Diuretikaapplikation durchschnittlich 0,4 ± 0,3% ihres Ausgangsgewichts zu, für die KO-Tiere hingegen ergaben sich mittlere Körpergewichtsverluste von 4,9 ± 2,1% für Rap<sup>-/-</sup>, 0,5 ± 0,5% für Ric<sup>-/-</sup>, sowie 2,7 ± 0,3% für Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>.

### Triamteren

Der Gewichtsverlust unter Triamteren fiel für Ric<sup>-/-</sup> mit 4,9 ± 1,4% signifikant höher aus als für den Wildtyp mit 1,0 ± 0,5% des Ausgangsgewichts. Rap<sup>-/-</sup> mit einem Verlust von 2,1 ± 0,7% und Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup> mit einem Verlust von 2,7 ± 1,4% des Körpergewichts unterschieden sich nicht signifikant von den Wildtyp-Tieren, wiesen jedoch ebenfalls leicht erhöhte Verluste auf.



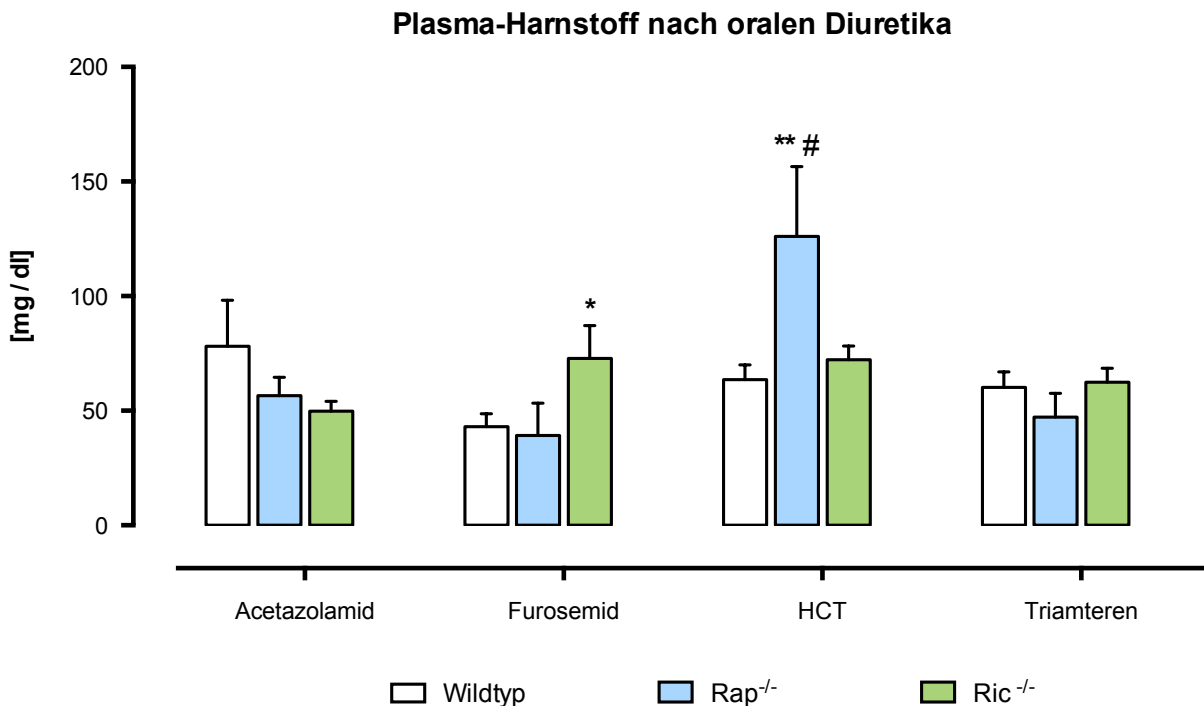
**Abbildung 3.13 - Gewichtsverlust unter Diuretikatherapie:** Mittelwerte des relativen Körpergewichtsverlustes der untersuchten Genotypen an Tag 5 der Applikation verschiedener Diuretika in Prozent des Ausgangskörpergewichts.

(n [Wildtyp] = 15, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.2.2 Plasma-Harnstoff nach Diuretika-Applikation

Anschließend an die je fünftägige Diuretikaapplikation erfolgte eine Plasma-Harnstoff-Kontrolle bei den Versuchstieren (nicht durchgeführt bei  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ ). Nach Applikation von Acetazolamid und Triamteren konnte hier kein Unterschied zwischen Wildtyp und den KO-Tieren  $Rap^{-/-}$  und  $Ric^{-/-}$  festgestellt werden. Nach Behandlung mit Furosemid wiesen Tiere mit  $Ric^{-/-}$ -Genotyps signifikant erhöhte Plasma-Harnstoff-Werte, während sich  $Rap^{-/-}$  nicht vom Wildtyp unterschied. Ein umgekehrtes Bild ergab sich nach der Verabreichung von HCT. Hier wurden bei den Tieren des  $Rap^{-/-}$ -Genotyps signifikant erhöhte Harnstoffwerte festgestellt, während  $Ric^{-/-}$  normwertige Harnstoffkonzentrationen aufwies.



**Abbildung 3.14 - Plasmaharnstoff nach Diuretikatherapie:** Mittelwerte der Plasma-Harnstoffkonzentrationen der untersuchten Genotypen an Tag 5 der Applikation verschiedener Diuretika in mg / dl.

(n [Wildtyp] = 15, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 6, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 6, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

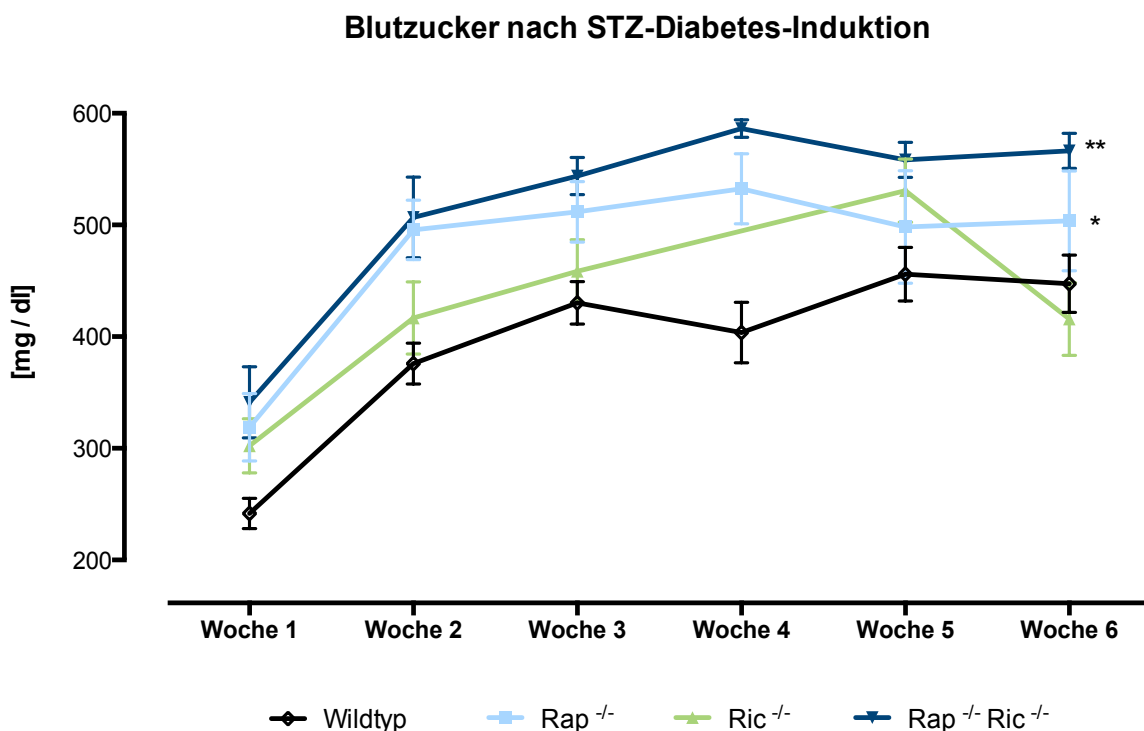
# = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.3 Diabetes-Induktion

Um die tubuläre Funktion in einem Modell mit glomerulärer Hyperfiltration zu prüfen, wurde bei den Versuchstieren durch Verabreichung des Betazellgifts Streptozotocin (STZ) ein Diabetes mellitus induziert.

#### 3.3.1 Blutzucker nach Diabetesinduktion

Um den Erfolg der Diabetesinduktion zu überprüfen und als Vergleichsparameter für das Ausmaß des induzierten Hyperglykämie und folglich glomerulären Hyperfiltration wurden nach Abschluss des Induktionsprotokolls regelmäßige Blutglucose-Messungen durchgeführt (zwei mal pro Woche). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die KO-Tiere stets höhere BZ-Werte aufwiesen als der Wildtyp. Dies war für die Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  über die gesamte Beobachtungsperiode in signifikanter Weise feststellbar.



**Abbildung 3.15 - Blutzuckerverlauf:** Mittelwerte des Blutzuckers der untersuchten Genotypen nach STZ-Diabetesinduktion in mg / dl.

(Nach Induktion: n [Wildtyp] = 29, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 19, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 11, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 8)

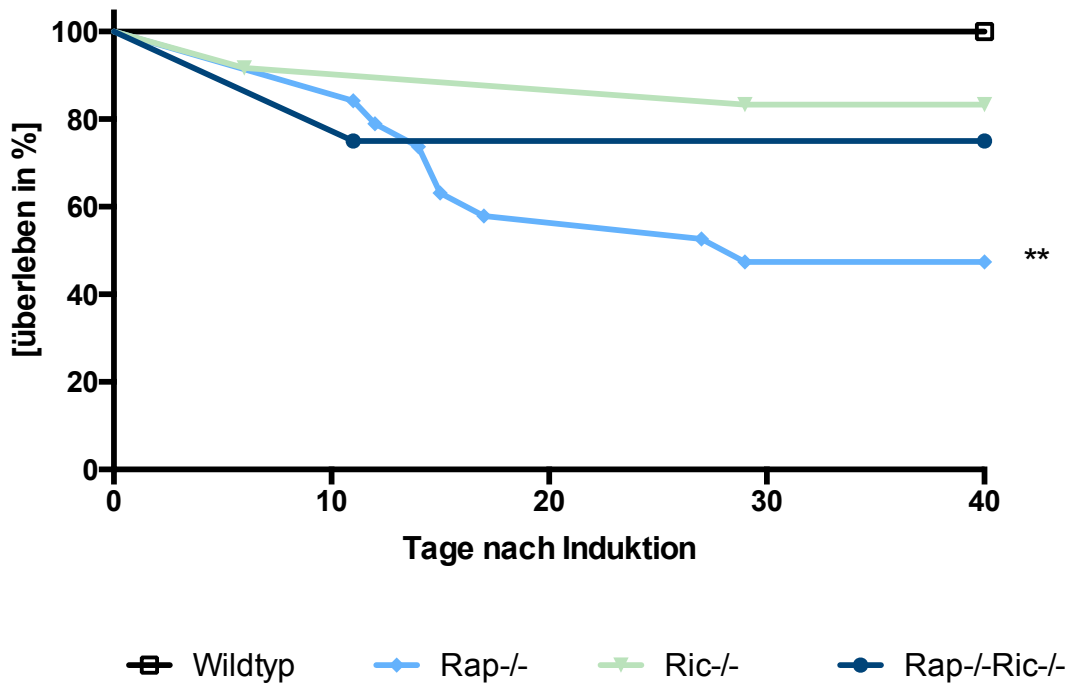
(Woche 6: n [Wildtyp] = 29, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 3, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 9, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 6)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.3.2 Mortalität

Das anhand des Blutzuckerverlaufs (Abb. 3.15) beobachtbare verstärkte Ansprechen vor allem der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  auf die gewichtsadaptierte STZ-Applikation spiegelte sich auch in einer erhöhten Mortalität der betreffenden Tiere wieder. Während über die Beobachtungsdauer von 40 Tagen nach Induktion keines der Wildtyp-Tiere verstarb, verstarben 53% der Tiere des  $Rap^{-/-}$ -Genotyps und 25% der  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere.  $Ric^{-/-}$ -Tiere wiesen eine 40-Tages-Mortalität von 17% auf.

#### Überleben nach STZ-Diabetes-Induktion

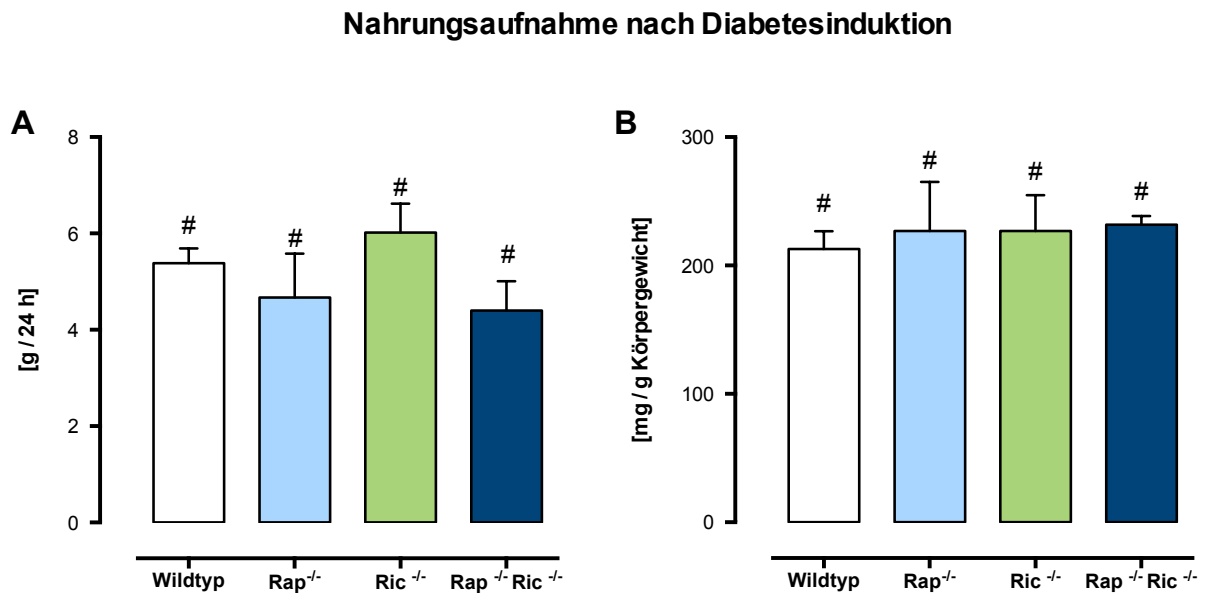


**Abbildung 3.16 - Mortalität nach Diabetesinduktion:** Kaplan-Meier-Analyse des Überlebens über 40 Tage nach STZ-Diabetesinduktion der untersuchten Genotypen. (Nach Induktion: n [Wildtyp] = 34, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 19, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 12, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 8) (Tag 40: n [Wildtyp] = 34, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 9, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 10, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 6) Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01



### 3.3.3 Nahrungsaufnahme nach Diabetesinduktion

Während durch die STZ-Diabetesinduktion bei allen Genotypen eine signifikante Zunahme der relativen Nahrungsaufnahme festzustellen war, konnte zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.



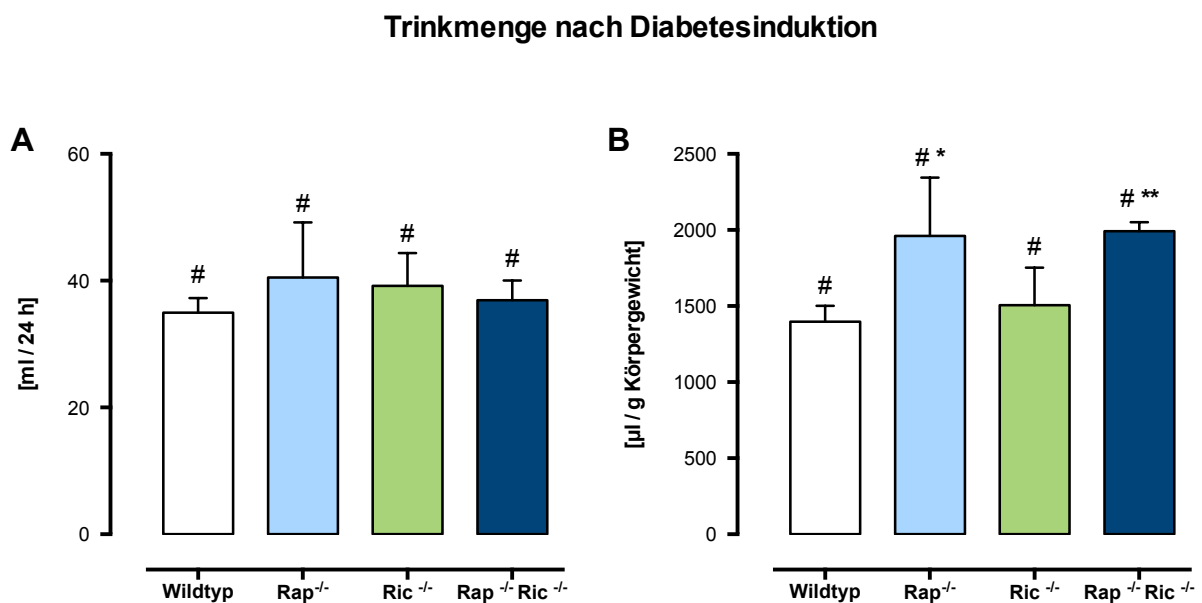
**Abbildung 3.17 - Nahrungsaufnahme nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte der Nahrungsaufnahme der untersuchten Genotypen 30 ± 3 Tage post inductionem in g / 24 h (A) und in mg / g Körpergewicht (B).

(n [Wildtyp] = 22, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01, # = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.3.4 Trinkmenge nach Diabetesinduktion

Die relative Trinkmenge aller Genotypen stieg durch die Diabetesinduktion signifikant an.  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere wiesen zudem eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere relative Trinkmenge auf. Wildtyp-Tiere nahmen durchschnittlich  $1397 \pm 104 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht zu sich, die entsprechenden Werte der KO-Tiere betragen  $1962 \pm 383 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht für  $Rap^{-/-}$ ,  $1505 \pm 247 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht für  $Ric^{-/-}$  und  $1992 \pm 58 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht für  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ .



**Abbildung 3.18 - Trinkmenge nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte der Trinkmenge der untersuchten Genotypen 30  $\pm$  3 Tage post inductionem in ml / 24 h (A) und in  $\mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht (B).

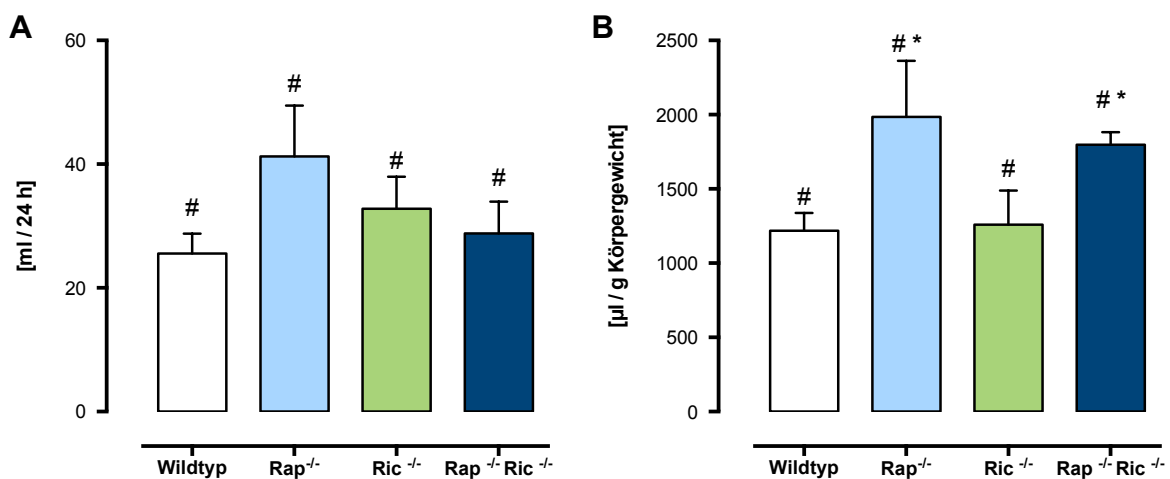
(n [Wildtyp] = 22, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 6, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 6, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp  $< 0,05$ , \*\* = p-Wert vs Wildtyp  $< 0,01$ , # = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen  $< 0,05$

### 3.3.5 Urinmenge nach Diabetesinduktion

Bei allen untersuchten Genotypen konnte eine signifikante Zunahme des ausgeschiedenen Urinvolumens beobachtet werden. Tiere mit  $Rap^{-/-}$ - und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyp wiesen wiederum eine nochmals signifikant höhere relative Urinausscheidung auf als der Wildtyp, während sich die Tiere des  $Ric^{-/-}$ -Genotyps nichts signifikant vom Wildtyp unterschieden. Die Tiere mit Wildtyp-Genom schieden nach Diabetesinduktion  $1219 \pm 119 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht aus,  $Rap^{-/-}$   $1985 \pm 378 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht,  $Ric^{-/-}$   $1259 \pm 230 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$   $1798 \pm 83 \mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht, was jeweils einer Zunahme des Urinvolumens um mindestens Faktor fünf im Vergleich zu den Daten der Kontrollbedingungen bedeutete.

Urinvolumen nach Diabetesinduktion



**Abbildung 3.19 - Urinmenge nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte des Urinvolumens der untersuchten Genotypen 30  $\pm$  3 Tage post inductionem in ml / 24 h (A) und in  $\mu\text{l} / \text{g}$  Körpergewicht (B).

(n [Wildtyp] = 22, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 6, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 6, n [ $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ ] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp  $< 0,05$ , \*\* = p-Wert vs Wildtyp  $< 0,01$ , # = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen  $< 0,05$

### 3.3.6 Elektrolythaushalt nach Diabetesinduktion

Nach der Erhebung des Elektrolythaushalts unter Kontrollbedingungen wurden die Plasma-Elektrolytkonzentrationen sowie die Elektrolytausscheidung im Urin bei allen Genotypen auch nach STZ-Diabetesinduktion kontrolliert. Wiederum dienten Kreatininmessungen im Urin sowie die Futteraufnahme zur Verbesserung der Vergleichbarkeit und Einordnung der Werte als Normierungsparameter für die Urin-Elektrolytausscheidung.

#### 3.3.6.1 Plasmaelektrolyte nach Diabetesinduktion

##### *Natrium*

Bei den Tieren der Genotypen  $Rap^{-/-}$  und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  konnten nach Diabetesinduktion signifikant erhöhte Plasma-Natriumkonzentrationen gemessen werden.  $Ric^{-/-}$ -Tiere unterschieden sich hier nicht vom Wildtyp. Für den Wildtyp konnten Werte von  $145 \pm 1$  mmol / l gemessen werden,  $Rap^{-/-}$  hingegen wies eine Konzentration von  $155 \pm 6$  mmol / l auf. Für den Genotypen  $Ric^{-/-}$  wurde ein Wert von  $143 \pm 1$  mmol / l erhoben,  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  wies eine Konzentration von  $164 \pm 3$  mmol / l auf.

##### *Kalium*

Bei der Bestimmung der Plasma-Kaliumkonzentrationen konnten nach der Diabetesinduktion keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und KO-Tieren festgestellt werden. Die mittleren Plasma-Konzentrationen betragen  $3,7 \pm 0,1$  mmol / l bei den Wildtyp-Tieren,  $4,0 \pm 0,5$  mmol / l beim Genotyp  $Rap^{-/-}$ ,  $3,7 \pm 0,2$  mmol / l beim Genotyp  $Ric^{-/-}$  und  $3,9 \pm 0,2$  mmol / l für Tiere des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps.

##### *Calcium*

Der Genotyp  $Rap^{-/-}$  zeigte bei einer mittleren Plasmakonzentration von  $2,2 \pm 0,1$  mmol / l im Vergleich zum Wildtyp mit  $2,0 \pm 0,04$  mmol / l signifikant erhöhte Plasma-Calcium-Werte.

## Ergebnisse

Die Genotypen Ric<sup>-/-</sup> mit  $2,0 \pm 0,04$  mmol / l und Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup> mit  $2,1 \pm 0,03$  mmol / l unterschieden sich nicht in signifikanter Weise vom Wildtyp.

### *Phosphat*

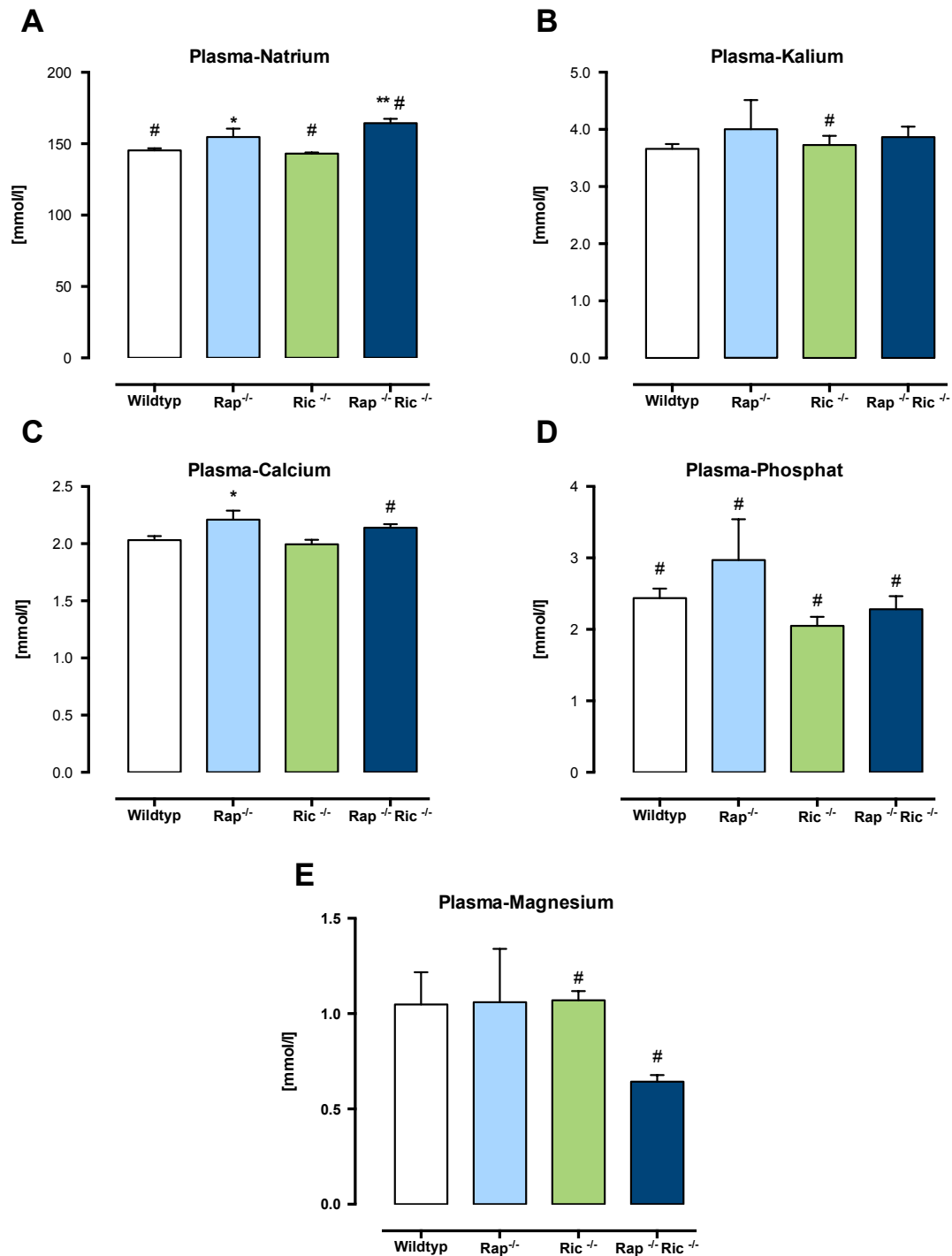
Die Plasma-Phosphatbestimmungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Genotypen.

Hierbei wiesen Wildtyp-Tiere eine mittlere Konzentration von  $2,4 \pm 0,1$  mmol / l auf. Bei den KO-Tiere ergaben sich mittlere Konzentrationen von von  $3,0 \pm 0,6$  mmol / l bei Rap<sup>-/-</sup>,  $2,1 \pm 0,1$  mmol / l beim Genotyp Ric<sup>-/-</sup>-Tiere sowie  $2,3 \pm 0,2$  mmol / l bei den Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Tieren.

### *Magnesium*

Bei der Bestimmung der Plasma-Magnesium-Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und KO-Tieren festgestellt werden, wenngleich Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Tiere eine Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen aufwiesen. Für Wildtyp-Tiere ergab sich ein Mittelwert von  $1,1 \pm 0,2$  mmol / l, für Rap<sup>-/-</sup>  $1,1 \pm 0,3$  mmol / l, für Ric<sup>-/-</sup>  $1,1 \pm 0,1$  mmol / l und für den Genotyp Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>  $0,6 \pm 0,03$  mmol / l.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.20 - Plasmaelektrolytkonzentrationen nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte der Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Natrium (A), Kalium (B), Calcium (C), Magnesium (D) und Phosphat (E) der untersuchten Genotypen 30 ± 3 Tage nach STZ-Diabetesinduktion in mmol / l.

(n [Wildtyp] = 23, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>] = 9)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

# = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.3.6.2 Urin-Elektrolytausscheidung nach Diabetesinduktion

#### *Natrium*

Analog der Befunde unter Kontrollbedingungen konnte nach Diabetesinduktion wiederum eine signifikant erhöhte Urin-Natrium-Ausscheidung bei Tieren des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps erhoben werden.  $Rap^{-/-}$ -Tiere ließen lediglich die Tendenz einer erhöhter Natriumausscheidung erkennen, für  $Ric^{-/-}$  ergaben sich im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhten Parameter. Die Tiere des Wildtyps schieden dabei  $110 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  aus, bei den KO-Tieren wurden folgende Werte erhoben:  $156 \pm 46 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für den Genotyp  $Rap^{-/-}$ ,  $102 \pm 6 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für  $Ric^{-/-}$  sowie  $208 \pm 53 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für Tiere des  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Genotyps.

#### *Kalium*

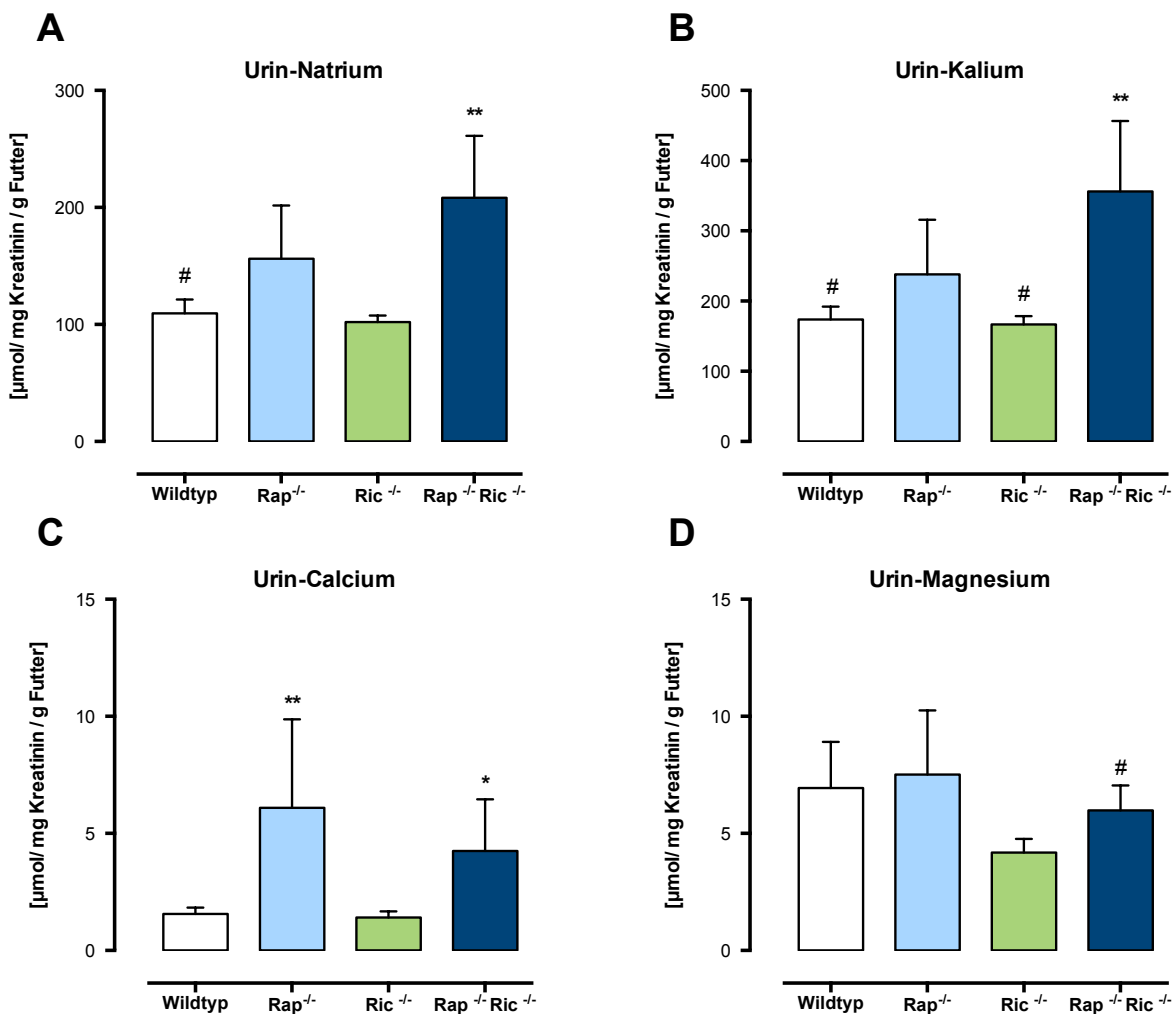
Die Bestimmung der Urin-Kalium-Ausscheidung zeigte ein ähnliches Bild bei einer signifikant erhöhten Urin-Kaliumausscheidung der  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$ -Tiere mit  $356 \pm 101 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  gegenüber dem Wildtyp mit einer Ausscheidung von  $174 \pm 18 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$ .  $Rap^{-/-}$ -Tiere wiesen mit  $238 \pm 78 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  wiederum leicht erhöhte Werte auf, wohingegen der Genotyp  $Ric^{-/-}$  mit einer Kaliurese von  $167 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  unauffällig war.

#### *Calcium*

Sowohl  $Rap^{-/-}$  als auch  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$  wiesen nach STZ-Diabetesinduktion eine gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Calciumausscheidung auf. Während Wildtyp-Tiere durchschnittlich  $1,6 \pm 0,3 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  ausschieden, betrug die Ausscheidung bei  $Rap^{-/-}$   $6,1 \pm 4 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  und bei  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$   $4,3 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$ .  $Ric^{-/-}$  wies mit  $1,4 \pm 0,3 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  erneut unauffällige Werte auf.

*Magnesium*

Die Bestimmung der Urin-Magnesium-Ausscheidung nach Diabetesinduktion ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Tieren. Beim Wildtyp konnte ein Wert von  $6,9 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  erhoben werden, die entsprechenden Werte der KO-Tiere betragen  $7,5 \pm 3 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für  $\text{Rap}^{-/-}$ ,  $4,3 \pm 0,6 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für  $\text{Ric}^{-/-}$  sowie  $6,0 \pm 1 \mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$  für  $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ .



**Abbildung 3.21 - Urin-Elektrolytausscheidung nach Diabetesinduktion:**

Mittelwerte der renalen Ausscheidung der Elektrolyte Natrium (A), Kalium (B), Calcium (C), und Magnesium (D) der untersuchten Genotypen 30 ± 3 Tage nach STZ-Diabetesinduktion in  $\mu\text{mol} / \text{mg Kreatinin} / \text{g Futter}$ .

(n [Wildtyp] = 27, n [ $\text{Rap}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Ric}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ ] = 6)

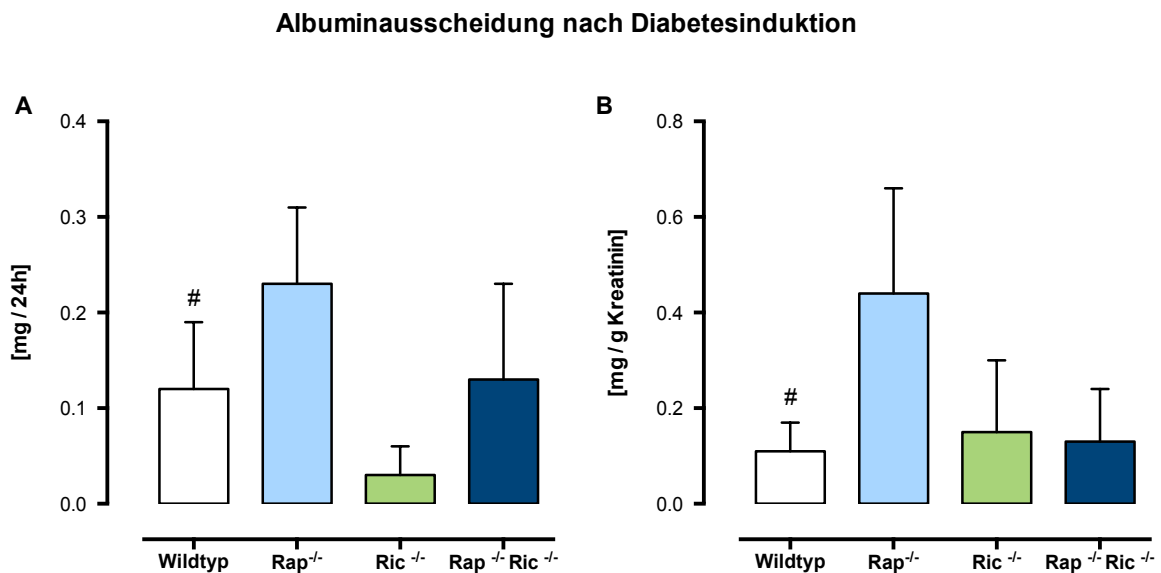
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

# = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05



### 3.3.7 Albuminausscheidung nach STZ-Diabetesinduktion

Die Diabetesinduktion führte zu einer nahezu unveränderten Albuminausscheidung bei den Versuchstieren. Beim Wildtyp war ein leichter Abfall der Albuminausscheidung festzustellen. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Tieren bestanden auch nach Diabetesinduktion nicht. Wildtyp-Tiere wiesen eine Albuminausscheidung von  $0,11 \pm 0,1$  mg / g Kreatinin auf, die sich hiervon nicht signifikant unterscheidenden Genotypen  $Rap^{-/-}$   $0,44 \pm 0,2$  mg / g Kreatinin,  $Ric^{-/-}$   $0,15 \pm 0,15$  mg / g Kreatinin und  $Rap^{-/-}Ric^{-/-}$   $0,13 \pm 0,1$  mg / g Kreatinin.



**Abbildung 2.22 - Albuminausscheidung nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte der Urin-Albuminausscheidung der untersuchten Genotypen 30 ± 3 Tage post inductionem in mg / 24h (A) und in mg / g Kreatinin (B).

(n [Wildtyp] = 22, n [ $Rap^{-/-}$ ] = 6, n [ $Ric^{-/-}$ ] = 6, n [ $RapRic^{-/-}$ ] = 5)

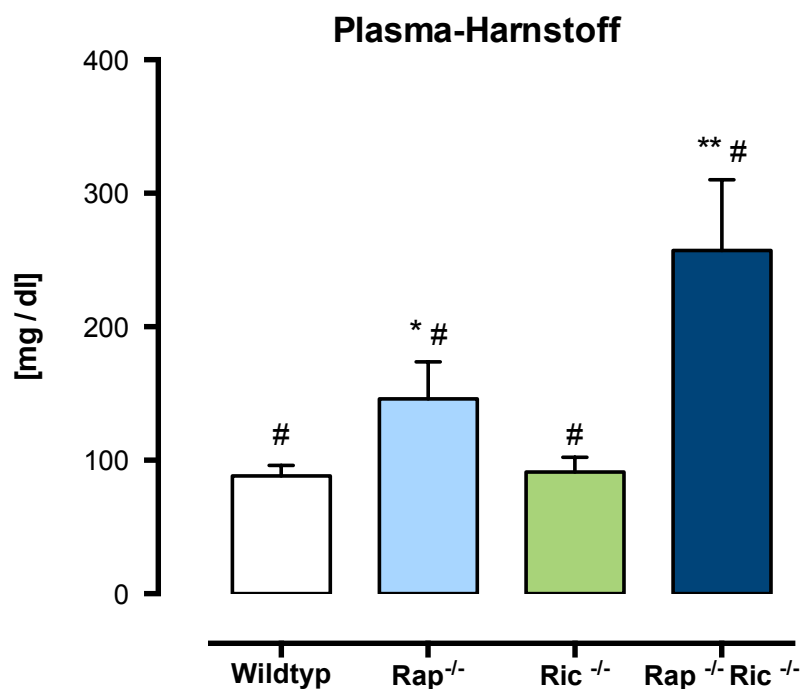
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

# = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.3.8 Globale Nierenfunktionsparameter nach Diabetesinduktion

#### 3.3.8.1 Plasma-Harnstoff

Die Harnstoffwerte im Plasma stiegen durch die Diabetesinduktion bei allen untersuchten Genotypen signifikant an. Der bereits unter Kontrollbedingungen zu erhebende Befund erhöhter Harnstoff-Plasmawerte der  $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ -Tiere (Abb. 3.10) wurde hierbei bei einer mittleren Plasmakonzentration von  $257 \pm 53$  mg / dl nochmals deutlicher. Die unter Kontrollbedingungen beobachtete Tendenz erhöhter Plasma-Harnstoffwerte der  $\text{Rap}^{-/-}$ -Tiere ließ sich nach Diabetesinduktion als nun signifikant erhöhter Wert mit  $146 \pm 28$  mg / dl wiedererkennen. Wildtyp-Tiere wiesen nach Diabetesinduktion eine mittlere Harnstoffkonzentration von  $88 \pm 8$  mg / dl auf.  $\text{Ric}^{-/-}$ -Tiere unterschieden sich hiervon bei einer mittleren Konzentration von  $91 \pm 11$  mg / dl nicht signifikant.



**Abbildung 3.23 - Plasmaharnstoff nach Diabetesinduktion:** Mittelwerte der Plasma-Harnstoff-Konzentrationen der untersuchten Genotypen 30 ± 3 Tage post inductionem in mg / dl.

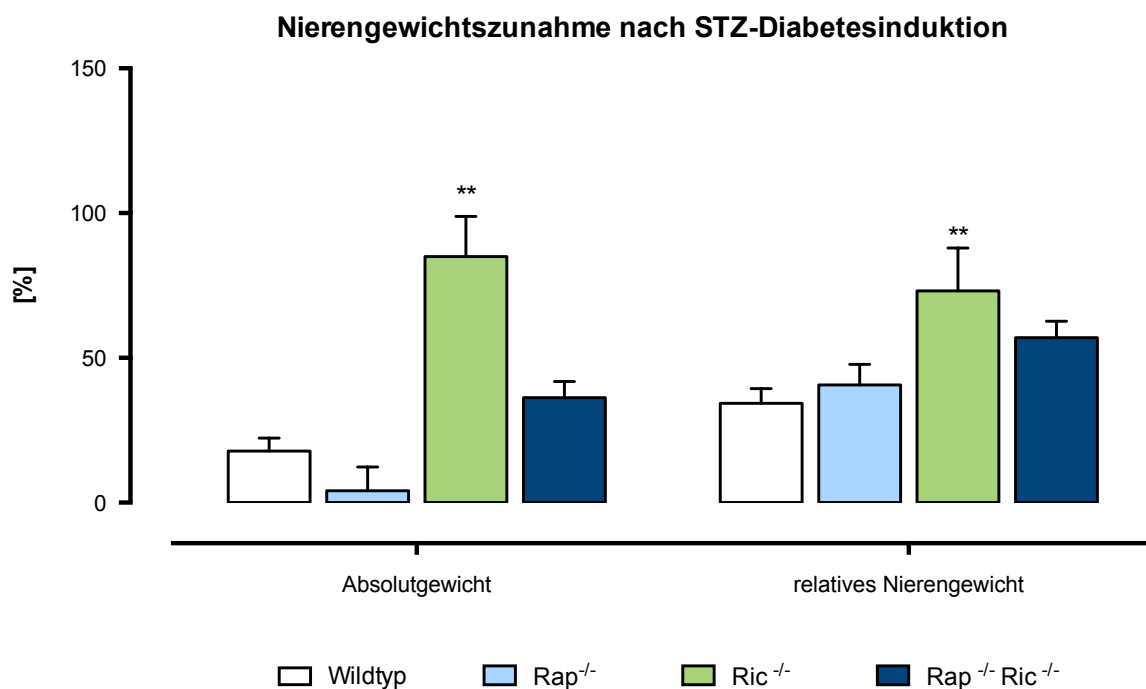
(n [Wildtyp] = 22, n [ $\text{Rap}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Ric}^{-/-}$ ] = 6, n [ $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$ ] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01, # = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.3.8.2 Nierengewicht nach Diabetesinduktion

Nach Beendigung der Beobachtungen unter STZ-induziertem Diabetes wurden die Versuchstiere geopfert und die Nieren zur Nierengewichtsbestimmung entnommen. Diese Nierengewichtsdaten wurden mit den Daten des jeweiligen Genotyps unter Kontrollbedingungen verglichen. Für alle Genotypen konnte eine signifikante Zunahme sowohl des Absolutgewichts, als auch des relativen Nierengewichts im Vergleich zu den Kontrollbedingungen festgestellt werden.

Der Genotyp Ric<sup>-/-</sup> zeigte dabei einen signifikant höheren Anstieg des Nierengewichts als der Wildtyp. Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Tiere, die unter Kontrollbedingungen signifikant leichtere Nieren aufgewiesen hatten (Abb. 3.11) und Rap<sup>-/-</sup> unterschieden sich nicht signifikant von den Wildtyp-Tieren.



**Abbildung 3.24 - Nierengewichtszunahme nach Diabetsinduktion:** Mittelwerte der Veränderungen des absoluten und relativen Nierengewichts im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen erhobenen Daten der untersuchten Genotypen 40 Tage post inductionem in %.

(n [Wildtyp] = 22, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 5)

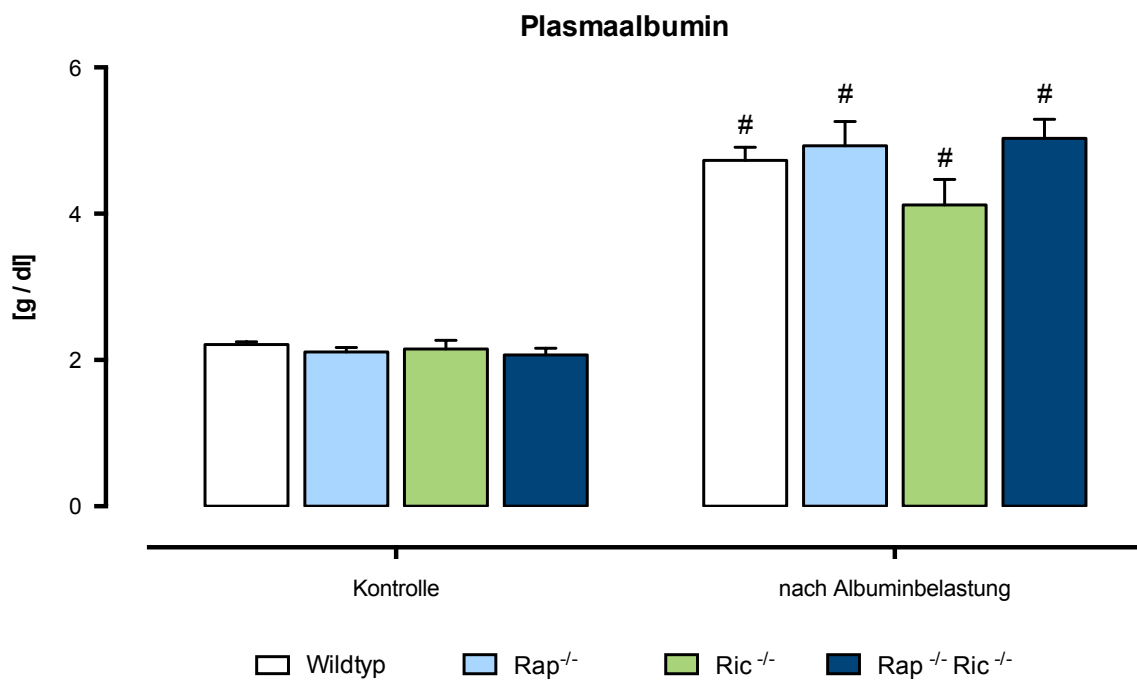
Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01

### 3.4 Albuminbelastung

Nachdem unter Kontrollbedingungen keine erhöhte Albuminausscheidung auf Seiten der KO-Tiere beobachtet werden konnte, sollte durch die hochdosierte intraperitoneale Injektion von bovinem Albumin eine Überlaufproteinurie bei intakten glomerulären Filtern induziert werden.

#### 3.4.1 Plasma-Albumin

Plasmaalbuminbestimmungen wurden durchgeführt, um Konzentrationsunterschiede als Ursache unterschiedlicher Urinausscheidungen auszuschließen. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Albuminbelastung lagen keine relevanten Unterschiede zwischen den Genotypen vor. Einen Tag nach Albuminbelastung konnte bei allen Versuchstieren ein Anstieg des Plasmaalbumins auf etwas mehr als die doppelte Konzentration verzeichnet werden.



**Abbildung 3.25 - Plasmaalbumin vor und nach Albuminbelastung:** Mittelwerte der Plasmaalbuminkonzentrationen der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen und an Tag 1 nach Albuminbelastung in g / dl.

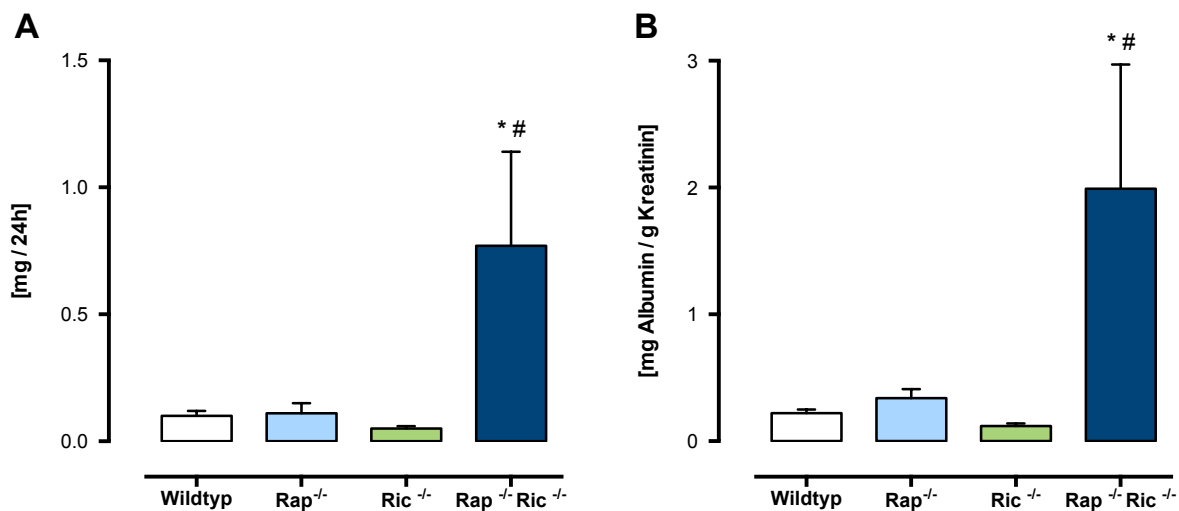
(n [Wildtyp] = 14, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01, # = p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen < 0,05

### 3.4.2 Albuminurie nach Albuminbelastung

Nach der gewichtsadaptierten, intraperitonealen Injektion von bovinem Albumin wurde die Albuminausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Die Ausscheidung wurde sowohl absolut als auch anhand des gleichzeitig ausgeschiedenen Kreatinins relativiert betrachtet. In diesem Belastungstest konnten bei den Tieren mit Rap<sup>-/-</sup>Ric<sup>-/-</sup>-Genotyp deutlich und signifikant erhöhte Werte festgestellt werden (p-Wert 0,01). Tiere mit einfachem mTORC1-KO wiesen bereits eine tendenziell erhöhte Albuminausscheidung auf (p-Wert 0,08). Der Genotyp Ric<sup>-/-</sup> unterschied sich nicht von den Tieren mit Wildtyp-Genom.

#### Albuminurie nach Albuminbelastung



**Abbildung 3.26 - Albuminausscheidung nach Albuminbelastung:** Mittelwerte der Urin-Albuminausscheidung der untersuchten Genotypen nach Albuminbelastung in mg / 24h (A) und als Albumin-Kreatinin-Ratio in mg Albumin / g Kreatinin (B).

(n [Wildtyp] = 14, n [Rap<sup>-/-</sup>] = 6, n [Ric<sup>-/-</sup>] = 6, n [RapRic<sup>-/-</sup>] = 5)

Fehlerbalken entspricht SEM, \*=p-Wert vs Wildtyp <0,05, \*\*=p-Wert vs Wildtyp <0,01, #=p-Wert vs eigener Genotyp unter Kontrollbedingungen <0,05

## 4 Diskussion

Obwohl die Bedeutung mTORs als einer der zentralen Regulatoren des Zellmetabolismus bekannt ist und mit mTOR interagierende Pharmaka unter anderem in der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eine weitreichende Verbreitung haben, ist über dessen Funktion in der Aufrechterhaltung der renalen Homöostase noch wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Phänotypisierung eines Modellorganismus mit induzierbarer tubulärer Deletion für Raptor und Rictor Rückschlüsse auf die Funktionen der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 im Tubulusepithel zu erhalten.

### 4.1 Proximal-tubuläre Dysfunktion

Die tubulär-segmentale Zuordnung einer Reihe der erhobenen Befunde auf Seiten der Versuchstiere mit mTORC1-Deletion deuten auf das Vorliegen einer proximal-tubulären Dysfunktion im Sinne eines (partiellen) Fanconi-Syndroms hin. Hier sind die zu beobachtende Steigerung der Ausscheidungsparameter für Phosphat, Aminosäuren, Glucose sowie Albumin zu nennen. Eine simultane mTORC2-Deletion verstärkte hierbei jeweils die phänotypische Ausprägung, während einige Befunde gar erst durch diese manifest wurden.

#### *Phosphaturie*

Die Versuchstiere mit kombinierter mTORC1/mTORC2-Deletion wiesen bereits unter Kontrollbedingungen eine signifikant gesteigerte Phosphatausscheidung auf. Dieser Befund ließ sich in den Einzel-KO-Modellen nicht beobachten (Abb. 3.6). Eine gestörte Phosphatresorption mit gesteigerter Phosphatausscheidung ist klinisch mit der Bildung von Nierensteinen [131] und Störungen des Knochenstoffwechsels assoziiert [132].

Der Tubulusapparat trägt über die Phosphatresorption, die vor allem eine proximal-tubuläre Leistung darstellt, zu einem ausgeglichenen Phosphathaushalt bei und wird dabei als Bestandteil mehrerer Regelkreisläufe hormonell reguliert. Das glomerulär frei filtrierte Phosphat wird dabei

physiologischerweise zu circa 70% im proximalen Tubulus rückresorbiert, wobei der sekundär-aktiv angetriebene  $\text{Na}^+$ - $\text{P}_i$ -Symporter IIa den wichtigsten Transporter darstellt [11, 12]. Die gesteigerte Ausscheidung von Phosphat legt eine Dysfunktion in diesem Subsystem mit gestörter Phosphatresorption im proximalen Tubulus bei diesen Tiere nahe.

Als Ursache der verminderten Phosphatresorption sind zum einen eine Störung auf Transporterebene, zum anderen ein zellulärer Energiemangel denkbar (siehe ‚*Pathophysiologische Überlegungen*‘ unten). Auch eine Störung des zellulären Insulinsignalings kommt als (Mit-) Ursache in Frage. Insulin und weitere Wachstumsfaktoren stimulieren die tubuläre Phosphatresorption [132] und aktivieren bekanntermaßen auch die mTOR-Komplexe. Im Falle einer Beteiligung mTORs an der Vermittlung dieser Insulinwirkung könnte eine Deletion so zu einer ‚Signalling-Blockade‘ führen.

### *Aminoazidurie*

Die mTORC1-Deletion führte im untersuchten Modell zu einer globalen Aminoazidurie. Während eine alleinige mTORC2-Deletion zu keinem signifikanten Resorptionsdefizit führte, war eine Phänotypverstärkung bei simultaner mTORC2-Deletion zusätzlich zur mTORC1-Deletion im Doppel-KO auffällig (Abb. 3.8).

Erhöhte Aminosäureausscheidungen kommen im Rahmen genetischer Erkrankungen durch diverse Transporterdefekte vor und können Ausdruck einer unspezifischen tubulären Schädigung sein [133]. Aminosäuren werden unter physiologischen Bedingungen glomerulär frei filtriert und durch eine Vielzahl parallel arbeitender Transporter bereits im proximalen Tubulus fast vollständig rückresorbiert [18, 134, 135]. Auch hierbei handelt sich um sekundär-aktive Transportprozesse, bei denen die Aminosäuren teils im Kotransport mit Natrium oder Protonen, teils durch Aminosäureaustauscher in die Tubuluszellen aufgenommen werden [135].

Erneut lässt sich hier die Störung einer proximal-tubulären Funktion bedingt durch die mTORC1-Deletion feststellen. Zudem ist die Phänotypverstärkung durch die simultane mTORC2-Deletion als deutlicher Hinweis einer Interaktion

zwischen den mTOR-Komplexen zu sehen. Am ehesten ist hier von einer (teilweisen) Kompensation des mTORC1-Verlustes durch mTORC2 mit partieller Funktionsübernahme auszugehen.

### *Glucosurie*

Im Modell des mTORC1/mTORC2-Doppel-KOs konnte eine Glucosurie festgestellt werden, die bei einfacher Deletion nicht auftrat (Abb.3.7). Glucose wird unter physiologischen Bedingungen glomerulär frei filtriert und im proximalen Tubulus schwellenabhängig nahezu vollständig über SGLT1 und SGLT2 rückresorbiert. Auch diese Resorptionsleistung ist als sekundär-aktiver Prozess abhängig vom nach intrazellulär gerichtet Natriumgradienten [134, 136].

Auch hier scheint eine proximal-tubuläre Aufgabe gestört zu sein. Wie schon bei der Phosphaturie zu beobachten, wird diese Störung erst bei kombinierter mTORC1/mTORC2-Deletion manifest. Das Fehlen eines Phänotyps in den Einzel-KO-Modellen spricht dabei für eine funktionelle Überschneidung und Interaktion zwischen beiden Komplexen.

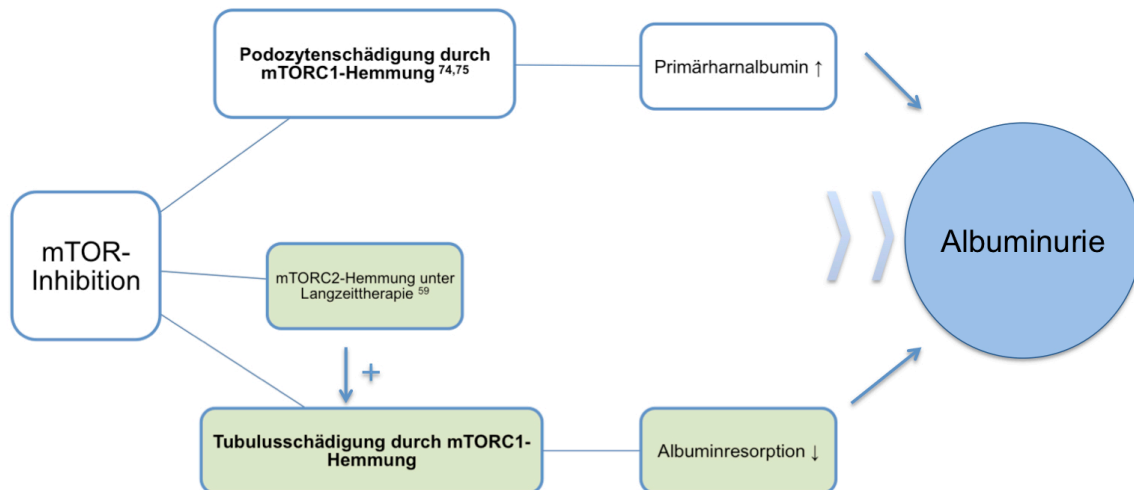
### *Albuminurie*

Unter Kontrollbedingungen konnte bei keinem der untersuchten Genotypen eine signifikante Albuminurie beobachtet werden (Abb. 3.9). Die aus der klinischen Verwendung von mTOR-Inhibitoren bekannte Induktion einer Proteinurie als unerwünschte Wirkung wird passend hierzu weitestgehend einer podozytären Schädigung als zugrundeliegendem Mechanismus zugeschrieben [137]. Das Fehlen einer Albuminurie bei den untersuchten, tubulusspezifischen mTOR-Knockouts bestätigte zunächst diese Annahme. Unklar war jedoch bis dato, ob zudem eine Schädigung des Tubulussystems bei der Entstehung einer Albuminurie unter Verwendung dieser Pharmaka von Relevanz sein könnte. Zunächst ist zu beachten, dass das plasmatische Albumin den glomerulären Filter prinzipiell nicht passiert und auf der Blutseite verbleibt. Es findet jedoch eine sehr geringgradige glomeruläre Filtration von etwa 0,0006% statt [138], die zu einer geschätzten Primärharnkonzentration von 1-50 µg/ml führt [139, 140].



Diese geringen Mengen filtrierten Albumins werden im proximalen Tubulus durch Endozytose zurückgewonnen, die durch die Rezeptoren Megalin, Cubilin und Amnionless (AMN) vermittelt wird [13]. Durch die Induktion einer Überlaufproteinurie im Albuminbelastungsversuch sollte daher die tubuläre Albuminresorption unter intensivierten Bedingungen überprüft werden.

Hier konnte gezeigt werden, dass eine tubuläre mTOR-Deletion unter solchen Bedingungen zu einer zusätzlich tubulär bedingten Albuminurie führt (Abb. 3.4.2). Der deutlichste Befund ließ sich hier erneut im mTORC1/mTORC2-Doppel-KO nachweisen. Im einfachen mTORC1-KO, der am genauesten die tubuläre Beeinflussung durch gängige mTOR-Inhibitoren widerspiegelt, konnte die Tendenz einer gesteigerten Albuminurie festgestellt werden. Inwieweit eine Störung von proximalen Tubuluszellen durch mTOR-Inhibitoren neben der podozytären Schädigung für die Entstehung der Proteinurie klinisch relevant ist, lässt sich hieraus nur bedingt ableiten. Gezeigt werden konnte jedoch, dass ein solcher Mechanismus als zweiter Faktor anzunehmen ist, insbesondere wenn die durch Rapamycin induzierte Podozytenschädigung zu einer gesteigerten Filtration mit tubulärer Albuminbelastung führt (vgl. Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1 - Albuminurie durch mTOR-Inhibitoren:** Entstehung der Proteinurie unter mTOR-Inhibitoren. Die weiß hinterlegten Kästchen stellen den bekannten Mechanismus der Podozytenschädigung [79, 80], die grün hinterlegten Kästchen die hier diskutierte tubuläre Beteiligung am Pathomechanismus dar.

### *Pathophysiologische Überlegungen*

Die mTORC1-Deletion führte im hier untersuchten Modell zu einer proximal-tubulären Dysfunktion im Sinne eines (partiellen) *De-Toni-Debré-Fanconi-Syndroms*. Dieses Syndrom ist als proximale Tubulusfunktionsstörung mit Hyperaminoazidurie, Glucosurie und Hyperphosphaturie definiert [141]. Phänotypisch ließen sich diese Befunde bei tubulärer mTORC1-Deletion (verstärkt oder gar erst manifestiert durch simultane mTORC2-Deletion im Doppel-KO) beobachten. Zudem konnte unter tubulärer Belastung eine Albuminurie als weitere proximal-tubuläre Störung aufgezeigt werden.

Verschiedene Ursachen lassen sich als zugrundeliegende zelluläre Mechanismen dieser vielschichtigen Dysfunktion vermuten. Als zentraler Proteinbiosynthesevermittler könnte eine Deletion von mTORC1 zu einer Verringerung der Anzahl der Bürstensaumenzyme und Kanalproteine in der luminalen Membran führen und mit einer verminderten Resorption einhergehen. Als betreffende Proteine wären hier der genannte  $\text{Na}^+\text{P}_i$ -IIa-Symporter als wichtigstes Membranprotein der Phosphatresorption, die AMN-Rezeptoren der Albuminresorption, sowie die diversen luminalen Transporter der tubulären Aminosäureresorption und die SGLT1/2-Symporter der Glucoseresorption zu nennen. Eine Untersuchung der Expression der Proteine dieser spezifischen Transportsysteme könnte hier weiterführende Erkenntnisse liefern.

Als weiterer Mechanismus wäre auch ein zellulärer Energiemangel als zugrundeliegende Ursache gut vorstellbar. Die hier dargestellten Funktionsstörungen stellen überwiegend sekundär-aktiv angetriebene Prozesse dar, die einen hohen Energiebedarf haben. Eine funktionierende zelluläre Energiegewinnung, die nötig ist um die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase als „Motor“ dieser sekundär-aktiven Transporte antreiben zu können, stellt somit eine Voraussetzung suffizienter Rückresorptionsvorgänge dar. mTORC1 spielt sowohl in der Regulation der mitochondrialen Energiegewinnung, als auch für die Biosynthese mitochondrialer Proteine eine zentrale Rolle [46, 142, 143]. Eine zelluläre ATP-Depletion im proximalen Tubulus könnte daher ebenso Ursache einer Störung dieser stark energieabhängigen Prozesse darstellen.

Diese Hypothese wird durch (hier nicht dargestellte) histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der entnommenen Nierenpräparate (durchgeführt von Kooperationspartner Dr. med. Florian Grahammer, Universität Freiburg) bestärkt. Hier konnte eine verminderte Anzahl der Mitochondrien sowie ultrastrukturellen Veränderungen dieser festgestellt werden.

### **4.2 Elektrolyt- und Wasserhaushalt**

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass die Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 im Tubulussystem essenziell für den Erhalt eines ausgeglichenen Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sind.

#### *mTORC1*

Die tubuläre Deletion von mTORC1 führte im untersuchten Modell zu einer gestörten Harnkonzentrierung mit resultierender Polyurie und kompensatorischer Polydipsie. Die zusätzliche Deletion von mTORC2 im Doppel-KO-Modell führte zu einer verstärkten Ausprägung dieses Phänotyps. Gleichzeitig konnte eine komplexe Störung der Elektrolytausscheidung mit erhöhter Urinexkretion der Elektrolyte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  festgestellt werden. Diese Befunde bestärkten die von Grahammer et al. [45] nach Untersuchung eines konstitutionellen, selektiv distal-tubulären Modells einer mTORC1-Deletion vorgeschlagene Hypothese eines Konzentrierungsdefektes im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL).

Die Beobachtung erhöhter Urin-Elektrolytausscheidungen und die durchgeführten Untersuchungen mit Tubulussegment-spezifischen Diuretika ermöglichten, den vorliegenden Konzentrierungsdefekt einer verminderten Resorption in diesem Nephronabschnitt zuzuschreiben. Das Gegenstromprinzip stellt die treibende Kraft der Harnkonzentrierung in der Henle'schen Schleife dar und basiert auf dem Transport von Elektrolyten aus dem Primärharn ins Interstitium, wobei der NKCC2-Transporter den wichtigsten Resorptionsmechanismus darstellt [144]. Entsprechend des Vorliegens einer Funktionsstörung in diesem Tubulusabschnitt war die Polyurie der Tiere mit

## Diskussion

mTORC1-Deletion partiell resistent gegenüber der Resorptionsblockade durch Furosemid. Hier wurde dementsprechend ein geringerer Gewichtsverlust als beim Wildtyp beobachtet, während die Blockade anderer Tubulusabschnitte durch Acetazolamid, HCT und Triamteren (bedingt durch die bereits ausgeschöpfte Resorptionsreserve) zu jeweils höheren Gewichtsverlusten führte (Abb. 3.13).

Zudem konnten bereits unter Kontrollbedingungen eine zu solch einem Defekt passende Steigerung der Elektrolytausscheidungen beobachtet werden. Entsprechend einer Resorptionsstörung im TAL wurde neben einer gesteigerten Natrium- und Kaliumausscheidung auch eine erhöhte Ausscheidung von Calcium und Magnesium beobachtet - also jenen Elektrolyten, die überwiegend in diesem Tubulusabschnitt resorbiert werden [5]. Der erhöhte renale Flüssigkeitsverlust könnte zudem über erhöhte Aldosteronspiegel zu einer gesteigerten Kaliumsekretion im distalen Tubulus und Sammelrohr führen und die Kaliumausscheidung nochmals steigern [145]. Weiter bekräftigt wird die Vermutung einer Störung im TAL durch Alexandre et al. [146], die zeigen konnten, dass Rapamycin zu einer verminderten Expression des NKCC2-Transporters im TAL führt. Wenngleich die Ursache dieser Mindereexpression unter Rapamycin noch ungeklärt ist, stellt sie sehr wahrscheinlich das pathophysiologische Korrelat der beschriebenen Störung dar.

Trotz dieser erhöhten Elektrolytausscheidungen wurden unter Kontrollbedingungen kompensierte, weitestgehend normale Plasmaelektrolytwerte festgestellt. Lediglich eine Hypokaliämie auf Seiten des mTORC1-KOs war auffällig und kann gut durch die erhöhte Kaliumausscheidung erklärt werden. Das Fehlen einer Hypokaliämie im mTORC1/mTORC2-KO könnte in einer Störung der Kaliumsekretion im distalen Tubulus begründet liegen (siehe unten).

Als weiteres Anzeichen eines gestörten Wasserhaushaltes konnten bei  $\text{Rap}^{-/-}\text{Ric}^{-/-}$  erhöhte Plasma-Harnstoff-Werte gemessen werden.  $\text{Rap}^{-/-}$  wies unter Kontrollbedingungen zunächst nur leicht erhöhte Werte auf, eine Dekompensation konnte jedoch im Diabetes-Stressmodell beobachtet werden.

Die Plasmakonzentration von Harnstoff ist unter anderem abhängig vom Ausmaß der Rezirkulation und Rückdiffusion im Tubulussystem und Sammelrohr als Mechanismus der Harnkonzentrierung. Erhöhte Plasmakonzentrationen können dabei Folge des Versuchs einer gesteigerten Harnkonzentrierung darstellen und sind häufig Zeichen einer eingeschränkten Nierenfunktion [5, 147].

Im Diabetes-Stressmodell konnten weitestgehend die unter Kontrollbedingungen erhobenen Befunde bestätigt werden. Nicht außer acht gelassen werden sollte hier, dass die entsprechenden Daten der KO-Tiere bedingt durch deren hohe Mortalität (Abb. 3.16) eine gewisse Negativselektion repräsentieren. Die hohe Mortalität der Genotypen mit mTORC1-Deletion ist neben der erhöhten Sensibilität gegenüber STZ sicherlich auch auf eine Dekompensation der durch den Resorptionsdefekt resultierenden Polyurie und auf die exzessiv gesteigerte Elektrolytausscheidung zurückzuführen. Zudem konnten im Gegensatz zu dem unter Kontrollbedingungen vorgefundenen Bild erhöhte Plasma - Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Werte gemessen werden. Dies ist am ehesten auf eine Exsikkose mit intravasaler Plasmakonzentrierung durch die zusätzlich entstehende osmotische Polyurie zurückzuführen.

### *mTORC2*

Nachdem die Tiere mit einfacher mTORC2-Deletion unter Kontrollbedingungen keinerlei phänotypische Auffälligkeiten aufgewiesen hatten, konnte in den Diuretikauntersuchungen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Triamteren beobachtet werden (Abb. 3.13).

Triamteren blockiert die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr, was gegenregulatorisch zu einer gesteigerten Expression der hier beteiligten Kanalproteine führt.

Artunc und Lang [148, 149] konnten in vitro zeigen, dass mTORC2 durch Phosphorylierung der SGK1 relevant für diese distal-tubuläre Natriumresorption ist. Ahmed [150] konnte dies auch in vivo anhand der Untersuchung eines Mausmodells mit konstitutiver, selektiv distal-tubulärer mTORC2-Deletion bestätigen. mTORC2 vermittelt dabei die Steigerung der Natriumresorption

(durch Aktivierung von ENaC [151, 152]) und der Kaliumsekretion (durch Aktivierung von ROMK [153]) im distalen Tubulus.

In dem von Ahmed [150] untersuchten in-vivo Modell führte die mTORC2-Deletion unter Belastungsbedingungen (Triamterentherapie sowie Hoch-K<sup>+</sup>-Diäten) zu einer gesteigerten Diurese und hohen Mortalität. In Analogie zu diesen Befunden wurde bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren mit gesamt tubulärer mTORC2-Deletion ein erhöhter Gewichtsverlust unter Triamteren (Abb. 3.13) beobachtet, wenngleich die Versuche im Vergleich zum konstitutionellen Modell von Ahmed [150] nicht letal verliefen. Zusätzlich konnte bei diesen Tieren nach der Triamterentherapie ein signifikant erhöhter Plasmaharnstoff gemessen werden (Abb. 3.14).

Diese Befunde deuten auf einen analogen Mechanismus mit Insuffizienz der mTORC2-vermittelten Expressionssteigerung der Kanalproteine ENaC und ROMK auch in diesem Modell hin. Unter Kontrollbedingungen scheint dieser Funktionsverlust jedoch zu geringfügig, um einen Phänotyp hervorzurufen.

Auch im diabetischen Stressmodell nach STZ-Applikation verhielt sich Ric<sup>-/-</sup> hinsichtlich jeglicher untersuchter Parameter identisch zum Wildtyp, sodass davon auszugehen ist, dass mTORC2 für die tubuläre Adaptation in diesem Stressmodell keine Rolle spielt.

### **4.3 Tubulärer Nährstoffverlust und Wachstum**

Die tubuläre Deletion von mTORC1 führte im untersuchten Modell zu einer signifikant erhöhten Nahrungsaufnahme (Abb. 3.2) und einem geringeren mittleren Körpergewicht (Abb. 3.1) der betroffenen Versuchstiere. Dies könnte als Hinweis auf einen Nährstoffverlust oder einen gesteigerten Energieverbrauch gedeutet werden. Der proximale Tubulus trägt durch die Reabsorption nahezu aller filtrierter Nährstoffe entscheidend zu einem physiologischen Nährstoffhaushalt bei [154]. Bei den mTORC1-deletierten Tieren konnte im Rahmen der beschriebenen proximal-tubulären Funktionsstörung ein Verlust von Nährstoffen (Aminosäuren, Glucose und Albumin) mit dem Urin nachgewiesen werden. Die gesteigerte

Nahrungsaufnahme dieser Tiere ließe sich somit als Versuch interpretieren, dieses Energiedefizit kompensieren zu wollen.

Eine weitere Erklärung für das verminderte Körpergewicht und die gesteigerte Nahrungsaufnahme bei tubulärer mTORC1-Deletion könnte eine Einschränkung der proximal-tubulären Gluconeogenese im Kontext der hier vorliegenden Dysfunktion und des gestörten zellulären Energiemetabolismus darstellen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der proximale Tubulus eine weit wichtigere Rolle in der Gluconeogenese des Körpers einnimmt als bisher angenommen [155, 156]. Durch Störungen dieser Funktion könnte es unter katabolen Bedingungen zu einer systemischen Glucosemangelsituation mit beeinträchtigtem Wachstum kommen.

#### **4.4 Nierenwachstum**

Da mTOR am besten für seine Funktion im Zellwachstum bekannt ist, wurde vermutet, dass insbesondere Tiere mit mTORC1-Deletion hypotrophe Nieren aufweisen könnten. Hierzu passend konnte beim mTORC1/mTORC2-Doppel-KO-Modell ein erniedrigtes Nierengewicht festgestellt werden (Abb. 3.11).

Bei der Interpretation dieser Daten blieb zunächst zu bedenken, dass die tubuläre Exzision der entsprechenden Gene erst postnatal induziert wurde, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Nierenentwicklung weitestgehend abgeschlossen war. Die durchgeführte Diabetesinduktion sollte daher durch die induzierte Hyperfiltration einen renalen Wachstumsreiz [101] darstellen, um eine mögliche Beeinträchtigung der kompensatorischen renalen Hypertrophie durch die Deletionen zu prüfen. Verschiedene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass eine mTOR-Inhibition durch Rapamycin die kompensatorische renale Hypertrophie in solchen Diabetesmodellen einschränken kann [100, 102, 157].

In den hier untersuchten Mausmodellen mit mTORC1-Deletion konnte ein den Wildtyp-Tieren gleichwertiges Nierenwachstum beobachtet werden (Abb. 3.25). Erschwert wird die Interpretation dieser Daten durch die unterschiedliche Sensibilität (vgl. Kapitel 4.7) gegenüber der STZ-Diabetesinduktion mit den resultierenden Ausprägungsunterschieden zwischen KO- und Wildtyp-Tieren (Abb. 3.15). Dies schränkte die Rolle des Wildtyps als Kontrollgruppe der KO-

Tiere in diesem Fall deutlich ein. Auffällig war jedoch, dass die Tiere mit einfacher mTORC2-Deletion bei vergleichbarer Diabetesausprägung ein signifikant stärkeres Nierenwachstum aufwiesen als der mTORC1 - und Doppel-KO. Bei gleichwertigem Wachstumsreiz scheint die kompensatorische Hypertrophie durch die mTORC1-Deletion in diesem Vergleich somit gebremst. Dass diese Tiere trotzdem einen signifikanten Nierengewichtszuwachs (in Höhe des weniger stark betroffenen Wildtyps) zeigten, ist dadurch erklärbar, dass die kompensatorische Hypertrophie nicht nur in tubulären Strukturen begründet ist, sondern auch von nicht-tubulären Strukturen ausgeht [158], die durch den verwendeten tubulusspezifischen Promotor nicht in die Gendeletion inbegriffen waren.

Unter Berücksichtigung dieser Hintergründe lässt sich trotz erschwelter Interpretation annehmen, dass die tubuläre mTORC1-Deletion in diesem Modell die kompensatorische Hypertrophie des Tubulussystems bremst, während eine einfache mTORC2-Deletion keine Auswirkung mit sich bringt.

### **4.5 Gesteigerte Toxinsensibilität**

Auffällig und überraschend war die Beobachtung, dass die STZ-Verabreichung vor allem bei den Tieren mit mTORC1-Deletion zu einer sehr hohen Mortalität und stärkeren Ausprägung des Diabetes führte (Abb. 3.15 und 3.16). Wie bereits beschrieben führt das Zytostatikum STZ nach zellulärer Aufnahme über GLUT2 durch DNA-Alkylierung zur Zerstörung der Zelle [126, 127] und wird nahezu vollständig über den Urin ausgeschieden [159].

GLUT2 ist neben den pankreatischen Inselzellen auch in der basolateralen Membran im proximalen Tubulus anzutreffen [160], sodass eine Anreicherung auch hier denkbar ist.

Verschiedene Mechanismen sind als Ursache der erhöhten Sensitivität gegenüber STZ denkbar. Zum einen wäre sie durch eine teilweise Pax 8 - Expression der pankreatischen Inselzellen - wie sie in vitro von Ozcan et al. [161] beschrieben wurde - erklärbar. Eine partielle mTORC1-Deletion könnte in diese Zellen zu einer Störung der Regeneration nach der Schädigung durch STZ führen und so eine verstärkte Diabetesausprägung bedingen.



Zudem ist eine eingeschränkte proximal-tubuläre Sekretion mit verzögerter Eliminierung des Toxins als Erklärung denkbar. Über höhere Plasmaspiegel würde eine verzögerte Toxinelimination dabei zu einer Wirkverstärkung führen. Eine durch die mTORC1-Deletion bedingte verzögerte Toxinelimination könnte hier wiederum auf zwei verschiedenen Ursachen beruhen. Zum einen könnte eine generelle Störung der Sekretion von Giftstoffen im proximalen Tubulus vorliegen. Andererseits könnte eine Störung der Regeneration nach der Schädigung durch STZ im proximalen Tubulus mit einer vorübergehenden Einschränkung der Sekretion vorliegen. Dies ist insbesondere durch die basolateralen GLUT2-Kanäle mit der wahrscheinlichen Anreicherung von STZ im proximalen Tubulusepithel gut vorstellbar. Dass eine mTORC1-Deletion zu einer verzögerten und gestörten Regeneration nach Verletzungen des proximalen Tubulus führt, konnte bereits von Grahammer et al. (hier in Form einer ischämischen Schädigung) demonstriert werden [45].

### **4.6 Interaktionen zwischen den Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2**

Der Aufbau der durchgeführten Studie mit Untersuchung der mTORC1 und mTORC2 Einzel-KO-Modelle und den Doppel-KO-Tieren ermöglichte es, Hinweise auf Interaktionen zwischen den beiden mTOR-Komplexen zu erhalten.

Sowohl bezüglich der proximal-tubulären Dysfunktion (vgl. Kapitel 4.1) als auch hinsichtlich des Elektrolythaushaltes (vgl. Kapitel 4.2) führte eine simultane mTORC2-Deletion zu einer Verstärkung (und teilweise erst zur Ausprägung) nahezu aller der mTORC1-Deletion zugeschriebenen phänotypischen Merkmale. Abgesehen von geringfügigen Überschneidungen auf zellulärer Signallingebene [162] waren Interaktionen zwischen beiden Komplexen bisher nicht bekannt. Die vorliegenden Befunde machen eine weiterreichende Interaktion, vor allem in Form einer teilweisen Kompensation eines mTORC1-Verlustes durch mTORC2 sehr wahrscheinlich. Wie diese Übernahme zellulärer Funktionen und Aufgaben abläuft ist alleine auf Grund der phänotypischen Beobachtungen nicht auswertbar und erfordert weiterführende Untersuchungen.

### **4.7 Vergleich mit therapeutischen mTOR-Inhibitoren**

Die Charakterisierung der tubulären Funktionen von mTOR ist insbesondere auf Grund der therapeutischen Hemmung durch verschiedene Pharmaka interessant. Die vorliegende Arbeit ermöglichte hier den Vergleich eines gewebsspezifischen Ausschaltens von mTORC1 und mTORC2 mit der systemischen Inhibition, wie sie in der therapeutischen Verwendung von mTOR-Inhibitoren stattfindet.

Rapamycin (Syn. Sirolimus) als bekannter mTOR-Inhibitor weist in seinem Nebenwirkungsprofil unter anderem die mögliche Entstehung einer Proteinurie [163] und von Elektrolytstörungen [91] auf. Durch die Phänotypisierung war es möglich, die entstehende Proteinurie neben der bekannten glomerulären Podozytenschädigung auch auf eine tubuläre Schädigung zurückzuführen (vgl. Kapitel 4.1). Bekannte Elektrolytstörungen unter Rapamycin stellen Hypokaliämien, Hypophosphatämien und Hypomagnesiämien dar [91]. In den hier untersuchten Modellen konnten passend hierzu signifikant erhöhte Ausscheidungen von Kalium, Phosphat und Magnesium bei mTORC1-Deletion (teilweise erst im Doppel-KO) festgestellt werden. Die weitestgehend normalen Plasmaelektrolytkonzentrationen lassen auf extrarenale Kompensationsmechanismen schließen, die unter systemischer mTOR-Inhibition möglicherweise ebenfalls gestört werden.

Die klinisch bedeutsamsten Nebenwirkungen der mTOR-Inhibitortherapie konnten somit anhand der gewebsspezifischen Deletionen nachvollzogen werden. Die zu beobachtende extrarenale Kompensation lässt zudem auf eine Beteiligung extrarenaler Strukturen an der Entstehung dieser Nebenwirkungen unter Systemtherapie schließen.

### 4.8 Ausblick

Die Analyse und Einordnung der erhobenen Befunde bringt gleichzeitig weiterführende Fragestellungen mit sich. Die hier aufgezeigten phänotypischen Auffälligkeiten werfen automatisch die Frage nach dem zugrundeliegenden zellulären Pathomechanismus auf. Da eine Phänotypisierung diesen zwar häufig gut einordnen, jedoch letztlich nicht abschließend zu klären vermag, wären weiterführende Untersuchungen auf (sub-) zellulärer Ebene interessant. Insbesondere die Befunde der proximal-tubulären Dysfunktion mit der aufgezeigten Albuminurie unter Belastungsbedingungen sind ebenfalls von sehr hohem klinischen Interesse.

Auch die weitere Abklärung einer eventuellen Störung der Sekretion und Toxinelimination können klinisch relevant sein um Arzneimittelinteraktionen durch mTOR-Inhibitoren erklären zu können. Hier wären zunächst Plasmaspiegelmessungen nach der Applikation sinnvoll um eine verzögerte Ausscheidung aufzuzeigen. Die Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen der gestörten Tubulusfunktion könnte dadurch ermöglichen, den unerwünschten Nebenwirkungen aktiv vorzubeugen bzw. entgegenzusteuern. Spannend bleibt hier beispielsweise die Frage des Einsatzes von Co-Therapeutika zur Minderung von mTOR-Inhibitor-assoziierten Nebenwirkungen. Weiterhin bleibt die wahrscheinliche Interaktion und gegenseitige Kompensation zwischen den beiden Komplexen mTORC1 und mTORC2 ein interessantes und bisher kaum beschriebenes Gebiet. Weitere Untersuchungen könnten hier insbesondere auch dazu beitragen, das noch wenig bekannte mTORC2 besser zu charakterisieren.

Nicht zuletzt bleibt abzuwarten, in welchen weiteren Bereichen mTOR mit seiner zentralen Rolle im zellulären Metabolismus in Zukunft als Therapie-Target Einzug halten wird.

## 5 Zusammenfassung

Die Proteinkinase mTOR ist im Zytosol durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen in den zwei funktionell und strukturell distinkten Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2 organisiert [31], über deren Funktion insbesondere im tubulären Epithel der Niere trotz breiter klinischer Anwendung von mTOR-Inhibitoren noch wenig bekannt ist [47]. Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen diese Funktionen zu charakterisieren, indem der Phänotyp einer tubulusspezifischen Deletion dieser beiden Komplexe - als Einzel- und Doppel-Knockout - anhand eines Mausmodells untersucht wurde.

Die tubuläre mTORC1-Deletion führte zu einer proximal-tubulären Dysfunktion im Sinne eines Fanconi-Syndroms, einer Harnkonzentrierungsstörung im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife sowie einem eingeschränkten renalen Proliferationsvermögen. Phänotypisch konnten dabei eine Polyurie und Polydipsie mit erhöhten Elektrolytausscheidungen, Glucosurie, globaler Aminoazidurie und ein eingeschränktes regeneratives Nierenwachstum beobachtet werden. Unter Belastungsbedingungen ließ sich zudem eine tubulär bedingte Albuminurie nachweisen. Während eine simultane mTORC2-Deletion einige dieser phänotypischen Merkmale verstärkte, wurden weitere erst durch diese manifest. Nachdem Interaktionen zwischen mTORC1 und mTORC2 zuvor nahezu unbekannt waren, macht diese festgestellte Phänotypverstärkung- bzw. Aufdeckung bei zusätzlicher mTORC2-Deletion funktionelle Überschneidungen und Interaktionen der mTOR-Komplexe sehr wahrscheinlich.

Die alleinige tubuläre Deletion von mTORC2 führte zu einem weit weniger auffälligen Phänotyp. Erst unter Belastungsbedingungen konnte hier eine Störung der distal-tubulären Natriumresorption aufgezeigt werden.

Die Phänotypisierung der tubulären Deletion der Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 machte deren zentrale Bedeutung für die Tubulusfunktion - von der Nährstoffreabsorption, über die Harnkonzentrierung bis hin zur tubulären Regeneration - deutlich.

## Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010: Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seite 630-633.
2. Fisher, J.W., *Prostaglandins and Kidney Erythropoietin Production*. *Nephron*, 1980. 25(2): p. 53-56.
3. BayerVitalGmbH, *Aufbau des Nephrons*, URL: [http://www.tierfreunde.bayer.de/static/media/images/upload/katze/katze\\_gross/Aufbau\\_Nephron\\_1000.jpg](http://www.tierfreunde.bayer.de/static/media/images/upload/katze/katze_gross/Aufbau_Nephron_1000.jpg) , [Zugriff: 26.08.2015].
4. ComMarketingAG, *Schaller's Gesundheitsbriefe - Die Niere und ihre Bedeutung*, URL: <http://www.schallers-gesundheitsbriefe.de/typo3temp/pics/1673427aad.jpg> , [Zugriff: 26.8.2015].
5. Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010: Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seite 639-650.
6. Lüllmann-Rauch, R. and Paulsen, F., *Taschenbuch Histologie*, 13. Auflage. 2006: Thieme Verlag, Stuttgart. Seite 456-461.
7. McKinney, T.D. and Burg, M.B., *Bicarbonate and fluid absorption by renal proximal straight tubules*. *Kidney Int*, 1977. 12(1): p. 1-8.
8. Ullrich, K.J., *Sugar, Amino Acid, and NA<sup>+</sup> Cotransport in the Proximal Tubule*. *Annual Review of Physiology*, 1979. 41(1): p. 181-195.
9. Rector, F., *Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1983. 244(5): p. F461-F471.
10. Wright, E.M., *Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2001. 280(1): p. F10-F18.
11. Murer, H., Hernando, N., Forster, I., and Biber, J., *Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms*. *Physiological Reviews*, 2000. 80(4): p. 1373-1409.
12. Murer, H., Forster, I., Hernando, N., Lambert, G., Traebert, M., and Biber, J., *Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary Pi*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1999. 277(5): p. F676-F684.
13. Amsellem, S., Gburek, J., Hamard, G., Nielsen, R., Willnow, T.E., Devuyst, O., Nexø, E., Verroust, P.J., Christensen, E.I., and Kozyraki, R., *Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010. 21(11): p. 1859-1867.
14. Saito, A., Iino, N., Takeda, T., and Gejyo, F., *Role of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, in calcium and phosphate homeostasis*. *Ther Apher Dial*, 2007. 11 Suppl 1: p. S23-6.
15. Christensen, E.I., Verroust, P.J., and Nielsen, R., *Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule*. *Pflügers Arch*, 2009. 458(6): p. 1039-48.
16. Ganapathy, V. and Leibach, F., *Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1986. 251(6): p. F945-F953.

## Literaturverzeichnis

17. Barfuss, D.W. and Schafer, J.A., *Active amino acid absorption by proximal convoluted and proximal straight tubules*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1979. 236(2): p. F149-F162.
18. Gonska, T., Hirsch, J., and Schlatter, E., *Amino acid transport in the renal proximal tubule*. Amino acids, 2000. 19(2): p. 395-407.
19. Tune, B.M. and Burg, M.B., *Glucose transport by proximal renal tubules*. American Journal of Physiology--Legacy Content, 1971. 221(2): p. 580-585.
20. Ellison, D.H., Velazquez, H., and Wright, F.S., *Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1987. 253(3): p. F546-F554.
21. Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Hartog, A., van Os, C.H., Willems, P.H., and Bindels, R.J., *The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium*. Biochemical and biophysical research communications, 1999. 261(2): p. 488-492.
22. Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Droogmans, G., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G., *TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(1): p. 19-25.
23. Lin, D., Sterling, H., Lerea, K.M., Giebisch, G., and Wang, W.-H., *Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(46): p. 44278-44284.
24. Pitts, R., Ayer, J., Schiess, W., and Miner, P., *The renal regulation of acid-base balance in man. III. The reabsorption and excretion of bicarbonate*. Journal of Clinical Investigation, 1949. 28(1): p. 35.
25. Casellas, D. and Moore, L.C., *Autoregulation and tubuloglomerular feedback in juxtamedullary glomerular arterioles*. Am. J. Physiol, 1990. 258(3 Pt 2): p. F660-F669.
26. Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010: Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seite 637-639.
27. Laragh, J.H. and Sealey, J.E., *Renin-angiotensin-aldosterone system and the renal regulation of sodium, potassium, and blood pressure homeostasis*. Comprehensive Physiology, 1992.
28. Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010: Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seite 458-460.
29. Frindt, G. and Burg, M.B., *Effect of vasopressin on sodium transport in renal cortical collecting tubules*. Kidney Int, 1972. 1(4): p. 224-231.
30. Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N., *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. 124(3): p. 471-484.
31. Weber, J.D. and Gutmann, D.H., *Deconvoluting mTOR biology*. Cell Cycle, 2012. 11(2): p. 236-248.
32. Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N., *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*. Science, 1991. 253(5022): p. 905-909.

## Literaturverzeichnis

33. Faivre, S., Kroemer, G., and Raymond, E., *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(8): p. 671-88.
34. Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M., *mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery*. Cell, 2002. 110(2): p. 163-75.
35. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K.-i., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. Cell, 2002. 110(2): p. 177-189.
36. Laplante, M. and Sabatini, D.M., *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 20): p. 3589-94.
37. Ruvinsky, I. and Meyuhas, O., *Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size*. Trends Biochem Sci, 2006. 31(6): p. 342-8.
38. Peng, T., Golub, T.R., and Sabatini, D.M., *The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation*. Molecular and cellular biology, 2002. 22(15): p. 5575-5584.
39. Edinger, A.L. and Thompson, C.B., *Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake*. Mol Biol Cell, 2002. 13(7): p. 2276-88.
40. Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M.G., MacKeigan, J.P., Finan, P.M., Clish, C.B., Murphy, L.O., and Manning, B.D., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Mol Cell, 2010. 39(2): p. 171-83.
41. Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., and Schulze, A., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. Cell metabolism, 2008. 8(3): p. 224-236.
42. Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., and Sabatini, D.M., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. 146(3): p. 408-20.
43. Ben-Sahra, I., Howell, J.J., Asara, J.M., and Manning, B.D., *Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1*. Science, 2013. 339(6125): p. 1323-8.
44. Robitaille, A.M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L.L., Moes, S., Prescianotto-Baschong, C., Sauer, U., Jenoe, P., and Hall, M.N., *Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis*. Science, 2013. 339(6125): p. 1320-3.
45. Grahammer, F., Haenisch, N., Steinhardt, F., Sander, L., Roerden, M., Arnold, F., Cordts, T., Wanner, N., Reichardt, W., Kerjaschki, D., Ruegg, M.A., Hall, M.N., Moulin, P., Busch, H., Boerries, M., Walz, G., Artunc, F., and Huber, T.B., *mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is*

- essential in response to ischemic stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(27): p. E2817-26.
46. Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.-F., Balaban, R.S., and Finkel, T., *The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(37): p. 27643-27652.
  47. Hall, M.N., *mTOR-what does it do?* Transplant Proc, 2008. 40(10 Suppl): p. S5-8.
  48. Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., and Thompson, C.B., *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. 6(6): p. 439-448.
  49. Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H., *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. Mol Biol Cell, 2009. 20(7): p. 1992-2003.
  50. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. 13(2): p. 132-41.
  51. Dibble, C.C. and Manning, B.D., *Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output*. Nat Cell Biol, 2013. 15(6): p. 555-64.
  52. Beugnet, A., Wang, X., and Proud, C.G., *Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(42): p. 40717-40722.
  53. Vander Haar, E., Lee, S.-i., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40*. Nature cell biology, 2007. 9(3): p. 316-323.
  54. Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M., *PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase*. Molecular cell, 2007. 25(6): p. 903-915.
  55. Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., and Lawrence, J.C., Jr., *PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding*. J Biol Chem, 2007. 282(27): p. 20036-44.
  56. Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. Cell, 2009. 137(5): p. 873-886.
  57. Laplante, M. and Sabatini, D.M., *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. 149(2): p. 274-93.
  58. Hay, N. and Sonenberg, N., *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & development, 2004. 18(16): p. 1926-1945.
  59. Sebbagh, M., Olschwang, S., Santoni, M.J., and Borg, J.P., *The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest*. Fam Cancer, 2011. 10(3): p. 415-24.



## Literaturverzeichnis

60. Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. 30(2): p. 214-26.
61. Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P., and Lamb, R.F., *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. J Cell Biol, 2004. 166(2): p. 213-23.
62. Shah, O.J. and Hunter, T., *Critical role of T-loop and H-motif phosphorylation in the regulation of S6 kinase 1 by the tuberous sclerosis complex*. J Biol Chem, 2004. 279(20): p. 20816-23.
63. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L., *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response*. Nat Cell Biol, 2008. 10(8): p. 935-945.
64. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Curr Biol, 2004. 14(14): p. 1296-302.
65. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M., *Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB*. Molecular Cell, 2006. 22(2): p. 159-168.
66. Lu, M., Wang, J., Jones, K.T., Ives, H.E., Feldman, M.E., Yao, L.-j., Shokat, K.M., Ashrafi, K., and Pearce, D., *mTOR Complex-2 Activates ENaC by Phosphorylating SGK1*. Journal of the American Society of Nephrology, 2010. 21(5): p. 811-818.
67. Oh, W.J., Wu, C.C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., and Jacinto, E., *mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide*. EMBO J, 2010. 29(23): p. 3939-51.
68. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. 307(5712): p. 1098-101.
69. Angliker, N. and Ruedg, M.A., *In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons*. Bioarchitecture, 2013. 3(4): p. 113-8.
70. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruedg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. 6(11): p. 1122-8.
71. Song, G., Ouyang, G., and Bao, S., *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. Journal of cellular and molecular medicine, 2005. 9(1): p. 59-71.
72. Nakashima, S., *Protein kinase Ca (PKCa): regulation and biological function*. Journal of biochemistry, 2002. 132(5): p. 669-675.
73. Lang, F., Böhmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., and Vallon, V., *(Patho) physiological significance of the serum-and*

- glucocorticoid-inducible kinase isoforms*. *Physiological Reviews*, 2006. 86(4): p. 1151-1178.
74. Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., and Sabatini, D.M., *mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s*. *Curr Biol*, 2006. 16(18): p. 1865-70.
  75. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N., *Activation of mTORC2 by association with the ribosome*. *Cell*, 2011. 144(5): p. 757-768.
  76. Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., and Guan, K.-L., *Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity*. *Genes & development*, 2006. 20(20): p. 2820-2832.
  77. Garcia-Martinez, J. and Alessi, D., *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)*. *Biochem. J*, 2008. 416: p. 375-385.
  78. Huber, T.B., Walz, G., and Kuehn, E.W., *mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression*. *Kidney international*, 2010. 79(5): p. 502-511.
  79. Gödel, M., Hartleben, B., Herbach, N., Liu, S., Zschiedrich, S., Lu, S., Debreczeni-Mór, A., Lindenmeyer, M.T., Rastaldi, M.-P., and Hartleben, G., *Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. 121(6): p. 2197.
  80. Torras, J., Herrero-Fresneda, I., Gulias, O., Flaquer, M., Vidal, A., Cruzado, J.M., Lloberas, N., and Grinyó, J.M., *Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage?* *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009. 24(12): p. 3632-3640.
  81. Canaud, G., Bienaimé, F., Viau, A., Treins, C., Baron, W., Nguyen, C., Burtin, M., Berissi, S., Giannakakis, K., and Muda, A.O., *AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease*. *Nature medicine*, 2013. 19(10): p. 1288-1296.
  82. Inoki, K., *Role of TSC–mTOR pathway in diabetic nephropathy*. *Diabetes research and clinical practice*, 2008. 82: p. S59-S62.
  83. Wiggins, J.E., Goyal, M., Sanden, S.K., Wharram, B.L., Shedden, K.A., Misek, D.E., Kuick, R.D., and Wiggins, R.C., *Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(10): p. 2953-66.
  84. Lee, M.-J., Feliers, D., Mariappan, M.M., Sataranatarajan, K., Mahimainathan, L., Musi, N., Foretz, M., Viollet, B., Weinberg, J.M., and Choudhury, G.G., *A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2007. 292(2): p. F617-F627.
  85. Chen, J.-K., Chen, J., Neilson, E.G., and Harris, R.C., *Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal*

- hypertrophy*. Journal of the American Society of Nephrology, 2005. 16(5): p. 1384-1391.
86. Lieberthal, W. and Levine, J.S., *The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease*. Journal of the American Society of Nephrology, 2009. 20(12): p. 2493-2502.
87. Ito, N., Nishibori, Y., Ito, Y., Takagi, H., Akimoto, Y., Kudo, A., Asanuma, K., Sai, Y., Miyamoto, K.-i., and Takenaka, H., *mTORC1 activation triggers the unfolded protein response in podocytes and leads to nephrotic syndrome*. Laboratory Investigation, 2011. 91(11): p. 1584-1595.
88. Rangan, G.K. and Coombes, J.D., *Renoprotective effects of sirolimus in non-immune initiated focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2007. 22(8): p. 2175-2182.
89. Bonegio, R.G., Fuhro, R., Wang, Z., Valeri, C.R., Andry, C., Salant, D.J., and Lieberthal, W., *Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 2005. 16(7): p. 2063-2072.
90. Morales, J.M., Wramner, L., Kreis, H., Durand, D., Campistol, J.M., Andres, A., Arenas, J., Nègre, E., Burke, J.T., and Groth, C.G., *Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients*. American Journal of Transplantation, 2002. 2(5): p. 436-442.
91. Morales, J., Andres, A., Dominguez-Gil, B., Sierra, M., Arenas, J., Delgado, M., Casal, M., and Rodicio, L. *Tubular function in patients with hypokalemia induced by sirolimus after renal transplantation*. in *Transplantation proceedings*. 2003. Elsevier.
92. Kempe, D.S., Dërmaku-Sopjani, M., Fröhlich, H., Sopjani, M., Umbach, A., Puchchakayala, G., Capasso, A., Weiss, F., Stübs, M., and Föller, M., *Rapamycin-induced phosphaturia*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2010: p. gfg172.
93. Haller, M., Amatschek, S., Wilflingseder, J., Kainz, A., Bielesz, B., Pavik, I., Serra, A., Mohebbi, N., Biber, J., and Wagner, C.A., *Sirolimus induced phosphaturia is not caused by inhibition of renal apical sodium phosphate cotransporters*. PloS one, 2012. 7(7): p. e39229.
94. Lu, M., Wang, J., Ives, H.E., and Pearce, D., *mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel*. Journal of Biological Chemistry, 2011. 286(35): p. 30647-30654.
95. Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.L., *Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling*. The EMBO journal, 2008. 27(14): p. 1919-1931.
96. Smith, K.D., Wrenshall, L.E., Nicosia, R.F., Pichler, R., Marsh, C.L., Alpers, C.E., Polissar, N., and Davis, C.L., *Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use*. Journal of the American Society of Nephrology, 2003. 14(4): p. 1037-1045.
97. Lieberthal, W., Fuhro, R., Andry, C., Patel, V., and Levine, J.S., *Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal*

- failure: role of acquired tubular resistance*. Transplantation, 2006. 82(1): p. 17-22.
98. Chen, J.K., Chen, J., Neilson, E.G., and Harris, R.C., *Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(5): p. 1384-91.
  99. Chen, J.K., Chen, J., Thomas, G., Kozma, S.C., and Harris, R.C., *S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 297(3): p. F585-93.
  100. Sakaguchi, M., Isono, M., Isshiki, K., Sugimoto, T., Koya, D., and Kashiwagi, A., *Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340(1): p. 296-301.
  101. Seyer-Hansen, K., *Renal hypertrophy in experimental diabetes: a comparison to compensatory hypertrophy*. Diabetologia, 1978. 14(5): p. 325-8.
  102. Yang, Y., Wang, J., Qin, L., Shou, Z., Zhao, J., Wang, H., Chen, Y., and Chen, J., *Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats*. Am J Nephrol, 2007. 27(5): p. 495-502.
  103. Pantuck, A.J., Seligson, D.B., Klatte, T., Yu, H., Leppert, J.T., Moore, L., O'Toole, T., Gibbons, J., Belldegrün, A.S., and Figlin, R.A., *Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma*. Cancer, 2007. 109(11): p. 2257-2267.
  104. Lock, H.R., Sacks, S.H., and Robson, M.G., *Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007. 292(1): p. F76-F81.
  105. Shegogue, D. and Trojanowska, M., *Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(22): p. 23166-23175.
  106. Harris, R.C. and Neilson, E.G., *Toward a unified theory of renal progression*. Annu. Rev. Med., 2006. 57: p. 365-380.
  107. Liu, Y., *Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. 15(1): p. 1-12.
  108. Lamouille, S. and Derynck, R., *Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway*. The Journal of cell biology, 2007. 178(3): p. 437-451.
  109. Lloberas, N., Cruzado, J.M., Franquesa, M., Herrero-Fresneda, I., Torras, J., Alperovich, G., Rama, I., Vidal, A., and Grinyó, J.M., *Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats*. Journal of the American Society of Nephrology, 2006. 17(5): p. 1395-1404.
  110. Sauer, B. and Henderson, N., *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. 85(14): p. 5166-5170.

## Literaturverzeichnis

111. Doyle, A., McGarry, M.P., Lee, N.A., and Lee, J.J., *The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease*. Transgenic Res, 2012. 21(2): p. 327-49.
112. Gossen, M. and Bujard, H., *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. 89(12): p. 5547-5551.
113. St-Onge, L., Furth, P.A., and Gruss, P., *Temporal Control of the Cre Recombinase in Transgenic Mice by a Tetracycline Responsive Promoter*. Nucleic Acids Research, 1996. 24(19): p. 3875-3877.
114. Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., and Das, A.T., *Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution*. Gene Ther, 2006. 13(19): p. 1382-1390.
115. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. Nat Rev Genet, 2001. 2(10): p. 743-755.
116. Exner, C. and Deutsche Forschungsgemeinschaft, *Tierversuche in der Forschung*. 2004: Senatskommission für tierexperimentelle Forschung, Lemmens Verlags- und Mediengesellschaft, Bonn.
117. Gesellschaft Versuchstierkunde, *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT, 2009.
118. Hoff, T. and Gurr, G., *Elektrolytbestimmungen mit Hilfe des Flammenatomemissionspektrometers EFUX 5057 in Kombination mit dem Vielkanalanalysator Hitachi 717*. GIT Labormedizin 18. GIT-Verlag, Darmstadt (1995).
119. Keller, H., *Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis, 2. Auflage*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1991). Seite 222.
120. Thomas, L., *Clinical Laboratory Diagnostics, 1. Ausgabe*. 1998: TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt (1998). Seite 241-7.
121. Trinder, P., *Glucose GOD-PAP method enzymatic colorimetric method*. Ann Clin Biochem, 1969. 6(24): p. 12481676.
122. Bergmeyer, H.-U., *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier, München (2012). Seite 401.
123. Husdan, H. and Rapoport, A., *Estimation of creatinine by the jaffe reaction a comparison of three methods*. Clinical Chemistry, 1968. 14(3): p. 222-238.
124. Kessler, M., Meinitzer, A., and Wolfbeis, O.S., *Albumin blue 580 fluorescence assay for albumin*. Analytical biochemistry, 1997. 248(1): p. 180-182.
125. Brunton, L.L., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Vol. 12. 2011: McGraw-Hill Medical New York. Kapitel 25a, Seite 671-721.
126. Wilson, G.L. and Leiter, E.H., *Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 156: p. 27-54.
127. Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A.A., Mofidian, S.M.A., and Rad, B.L., *Induction of diabetes by*

## Literaturverzeichnis

- Streptozotocin in rats*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2007. 22(2): p. 60-64.
128. Brosius, F., *Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse)*. Animal Models of Diabetic Complications Consortium, 2003.
  129. de la Garza-Rodea, A.S., Knaän-Shanzer, S., den Hartigh, J.D., Verhaegen, A.P., and van Bekkum, D.W., *Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (Mus musculus)*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS, 2010. 49(1): p. 40.
  130. Bundesministerium für Ernährung, L.u.V., *Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006*. 2006.
  131. Coe, F.L., Parks, J.H., and Asplin, J.R., *The pathogenesis and treatment of kidney stones*. New England Journal of Medicine, 1992. 327(16): p. 1141-1152.
  132. Laroche, M. and Boyer, J.-F., *Phosphate diabetes, tubular phosphate reabsorption and phosphatonins*. Joint Bone Spine, 2005. 72(5): p. 376-381.
  133. Chisolm, J.J. and Leahy, N.B., *Aminoaciduria as a manifestation of renal tubular injury in lead intoxication and a comparison with patterns of aminoaciduria seen in other diseases*. The Journal of pediatrics, 1962. 60(1): p. 1-17.
  134. Ullrich, K., *Sugar, amino acid, and Na<sup>+</sup> cotransport in the proximal tubule*. Annual review of physiology, 1979. 41(1): p. 181-195.
  135. Silbernagl, S., *The renal handling of amino acids and oligopeptides*. Physiol Rev, 1988. 68(3): p. 911-1007.
  136. Wood, I.S. and Trayhurn, P., *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. British Journal of Nutrition, 2003. 89(01): p. 3-9.
  137. Letavernier, E. and Legendre, C., *mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management*. Transplant Rev (Orlando), 2008. 22(2): p. 125-30.
  138. Tojo, A. and Endou, H., *Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1992. 263(4): p. F601-F606.
  139. Maack, T., Park, C.H., and Camargo, M., *Renal filtration, transport, and metabolism of proteins*. The kidney: physiology and pathophysiology, 1985. 3: p. 3005-3038.
  140. Christensen, E.I., Nielsen, R., and Birn, H., *Chapter 73 - Renal Filtration, Transport, and Metabolism of Albumin and Albuminuria*, in *Seldin and Giebisch's The Kidney (Fifth Edition)*, R.J.A.W.M. Caplan, Editor. 2013, Academic Press. p. 2457-2474.
  141. Kirschstein, M., *Fanconi-Syndrom*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 1998. 146(1): p. 59-64.
  142. Ramanathan, A. and Schreiber, S.L., *Direct control of mitochondrial function by mTOR*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(52): p. 22229-22232.
  143. Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P., *mTOR controls mitochondrial oxidative function*

- through a YY1–PGC-1 transcriptional complex. *Nature*, 2007. 450(7170): p. 736-740.
144. Mount, D.B., *Membrane trafficking and the regulation of NKCC2*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2006. 290(3): p. F606-F607.
  145. Palmer, L.G. and Frindt, G., *Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct*. *Kidney international*, 2000. 57(4): p. 1324-1328.
  146. da Silva Alexandre, C., de Bragança, A.C., Shimizu, M.H.M., Sanches, T.R., Fortes, M.A.Z., Giorgi, R.R., Andrade, L., and Seguro, A.C., *Rosiglitazone prevents sirolimus-induced hypomagnesemia, hypokalemia, and downregulation of NKCC2 protein expression*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2009. 297(4): p. F916-F922.
  147. Armsen, T. and Reinhardt, H., *Transtubular movement of urea at different degrees of water diuresis*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 1971. 326(3): p. 270-280.
  148. Lang, F., Artunc, F., and Vallon, V., *The Physiological Impact of the Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase SGK1*. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2009. 18(5): p. 439-448.
  149. Artunc, F., Ebrahim, A., Siraskar, B., Nasir, O., Rexhepaj, R., Amann, K., Friedrich, B., Risler, T., and Lang, F., *Responses to diuretic treatment in gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1*. *Kidney Blood Press Res*, 2009. 32(2): p. 119-27.
  150. Ahmed, A., *Die Rolle des mTOR2-Komplexes bei der Regulation der Natrium-und Kaliumausscheidung im distalen Tubulus der Niere*, 2014, Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
  151. Gleason, C.E., Frindt, G., Cheng, C.-J., Ng, M., Kidwai, A., Lang, F., Baum, M., Palmer, L.G., Pearce, D., and Rashmi, P., *mTORC2 regulates renal tubule sodium uptake by promoting ENaC activity*. *The Journal of clinical investigation*, 2015. 125(1): p. 117.
  152. Lang, F. and Pearce, D., *Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by the mTORC2/SGK1 pathway*. *Nephrol Dial Transplant*, 2015.
  153. Grahammer, F., Wanner, N., and Huber, T.B., *mTOR controls kidney epithelia in health and disease*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2014. 29(suppl 1): p. i9-i18.
  154. Curthoys, N.P. and Moe, O.W., *Proximal tubule function and response to acidosis*. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014. 9(9): p. 1627-1638.
  155. Mitrakou, A., *Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation*. *Diabetes research and clinical practice*, 2011. 93: p. S66-S72.
  156. Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., and Stumvoll, M., *Renal Gluconeogenesis Its importance in human glucose homeostasis*. *Diabetes care*, 2001. 24(2): p. 382-391.
  157. Godel, M., Hartleben, B., Herbach, N., Liu, S., Zschiedrich, S., Lu, S., Debreczeni-Mor, A., Lindenmeyer, M.T., Rastaldi, M.P., Hartleben, G., Wiech, T., Fornoni, A., Nelson, R.G., Kretzler, M., Wanke, R., Pavenstadt, H., Kerjaschki, D., Cohen, C.D., Hall, M.N., Ruegg, M.A., Inoki, K., Walz, G., and Huber, T.B., *Role of mTOR in podocyte function*

## Literaturverzeichnis

- and diabetic nephropathy in humans and mice.* J Clin Invest, 2011. 121(6): p. 2197-209.
158. Seyer-Hansen, K., *Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus.* Kidney Int, 1983. 23(4): p. 643-646.
159. Karunanayake, E., Hearse, D., and Mellows, G., *Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat.* Diabetologia, 1976. 12(5): p. 483-488.
160. Wang, Z. and Gleichmann, H., *GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice.* Diabetes, 1998. 47(1): p. 50-56.
161. Ozcan, A., Shen, S.S., Hamilton, C., Anjana, K., Coffey, D., Krishnan, B., and Truong, L.D., *PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study.* Mod Pathol, 2011. 24(6): p. 751-64.
162. Huber, T.B., Walz, G., and Kuehn, E.W., *mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression.* Kidney Int, 2011. 79(5): p. 502-11.
163. Rangan, G.K., *Sirolimus-associated proteinuria and renal dysfunction.* Drug safety, 2006. 29(12): p. 1153-1161.



## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Konzeption der durchgeführten Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Professor Artunc.

Die Anzucht der genetisch veränderten Versuchstiere, die Induktion sowie die Expressionsanalysen wurden von Dr. med. Grahammer (Universitätsklinikum Freiburg) durchgeführt, der mir die Versuchstiere zur Untersuchung überlies.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Professor Artunc von mir eigenständig durchgeführt.

Die histologische Aufarbeitung und elektronenmikroskopische Untersuchung der Nierenpräparate erfolgte durch Kooperationspartner Dr. med. Grahammer am Universitätsklinikum Freiburg.

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Urin wurde von Herrn Professor Sass am Universitäts-Kinderspital Zürich durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten führte ich eigenständig durch.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## Veröffentlichungen

### Posterpräsentation

*“Renaler Phänotyp von Mäusen mit induzierbarer Deletion von mTORC1 und mTORC2 im Tubulusepithel”*

Malte Rörden, Hazim Khatib, Florian Grahammer, Jörn O. Sass, Franziska Theilig, Michael Hall, Markus Rüegg, Tobias B. Huber, Ferruh Artunc

auf dem

Kongress für Nephrologie 2014; 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; 6. – 9. September 2014, Berlin

### Wissenschaftliche Paper

*„mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is essential in response to ischemic stress“*

Florian Grahammer, Nora Haenisch, Frederic Steinhardt, Lukas Sander, Malte Roerden, Frederic Arnold, Tomke Cordts, Nicola Wanner, Wilfried Reichardt, Donscho Kerjaschki, Markus A. Ruegg, Michael N. Hall, Pierre Moulin, Hauke Busch, Melanie Boerries, Gerd Walz, Ferruh Artunc and Tobias B. Huber.

in

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111. Jg., Nr. 27, S. E2817-E2826

In Vorbereitung:

*“mTOR regulates endocytosis and nutrient transport in renal tubular epithelial cells”*

Florian Grahammer, Suresh Ramakrishnan, Markus M. Rinschen, Alexey Larionov, Hazim Khatib, Malte Roerden, Jörn O. Sass, Nicola Wanner, Melanie Bousquenaud, Francois Jourret, Thomas Benzing, Ferruh Artunc, Tobias B. Huber and Franziska Theilig

## Danksagung

### **Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Artunc für die Überlassung dieser außerordentlich interessanten und spannenden Arbeit und die umfassende Betreuung und Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit bedanken.

Lieber Ferruh, ich konnte in der Zeit unserer gemeinsamen Arbeit nicht nur außerordentlich viel lernen und meine ersten wissenschaftlichen Schritte gehen, sondern hatte während der gesamten Arbeit auch sehr viel Spaß, wofür ich dir ganz herzlich danken möchte! Dein Engagement und deine Begeisterung für das wissenschaftliche und klinische Arbeiten haben sich von Anfang an auf mich übertragen und mich immer wieder aufs Neue motiviert.

Darüber hinaus möchte ich gerne den Kooperationspartnern in Freiburg, besonders Herrn Dr. med. Grahammer und Herrn Prof. Sass vom Universitäts-Kinderspital Zürich für die Zusammenarbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Mit-DoktorandInnen danken, mit denen ich viele gemeinsame Stunden im Labor verbracht habe und die mich bei der Versorgung der Versuchstiere in den Ferien unterstützt haben.

## Malte Carl Rörden

geb. am 07.02.1989 in Herrenberg

### Schulbildung

09/1995 - 08/1999

Grundschule Gäufelden

09/1999 - 08/2008

Schickhard-Gymnasium Herrenberg (Abitur 2008)

### Zivildienst

09/2008 - 07/2009

Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart

### Studium

WS 08/09 bis  
07. Juni 2016

Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Ärztliche Prüfung:

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 06.09.2011 (Note: 1,0)

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 16.04.2015 (Note: 1,0)

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 07.06.2016 (Note: 1,0)

Praktisches Jahr

Mai 2015 bis April 2016 am Universitätsklinikum Tübingen

- Chirurgie, Innere Medizin und Pädiatrie

Extracurriculäre Aktivitäten

Studentischer Tutor in der Neonatologie

Studentische Hilfskraft in der Hämatologie/Onkologie

Auslandsstudium an der University of Queensland, Brisbane,

Australien im Sommersemester 2014

### Promotion

09/2012 - 06/2016

„Phänotypisierung der tubulären Deletion von *mTORC1* und *mTORC2*“

Medizinische Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen

Sektion für Nieren und Hochdruckkrankheiten

AG Nierenphysiologie - Leiter Prof. Dr. med. F. Artunc

Anhang

Anhang

## Anhang 1 - Physiologische Parameter

	Wildtyp (n = 32)	Rap <sup>-/-</sup> (n = 12)	Ric <sup>-/-</sup> (n = 12)	Rap <sup>-/-</sup> Ric <sup>-/-</sup> (n = 6)
<b>Nahrungsaufnahme [mg/g KG]</b>				
Nahrungsaufnahme [mg/g KG]	95,5±5	118,3±7 *	108,9±5	137,9±12 **
<b>Trinkmenge [µl/g KG]</b>				
Trinkmenge [µl/g KG]	186,3±19	674,7±98 **	190,9±16	532,4±30 **
<b>Urinmenge [µl/g KG]</b>				
Urinmenge [µl/g KG]	48,8±5	386,8±82 **	58,4±13	164,0±24 **
<b>Urinausscheidungsparameter</b>				
Na <sup>+</sup> [µmol/mg Kreatinin/g Futter]	146,2±9	195,3±31 *	152,7±17	264,2±23 **
K <sup>+</sup> [µmol/mg Kreatinin/g Futter]	242,5±13	290,9±36	311,2±7	399,9±34 **
Ca <sup>2+</sup> [µmol/mg Kreatinin/g Futter]	1,4±0,2	2,52±0,5 *	1,02±0,2	2,56±0,4 *
Mg <sup>2+</sup> [µmol/mg Kreatinin/g Futter]	8,8±2,0	24,1±7,4 *	2,8±0,7	36,7±5,1 **
P <sub>i</sub> [µmol/mg Kreatinin/g Futter]	10,1±1,3	13,8±2,4	15,3±2,8	27,5±6,4 **
Glucose [µmol/mg Kreatinin]	11,8±3	9,8±8	6,4±0,9	97,6±28 **
Albumin [mg / g creatinine]	0,28±0,05	0,42±0,10	0,23±0,05	0,20±0,07
<b>Plasmakonzentrationen</b>				
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	153,7±0,8	156,6±1,6	154,8±2,2	152,8±0,7
K <sup>+</sup> [mmol/l]	3,8±0,1	3,34±0,1 *	3,8±0,1	3,7±0,1
Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]	2,0±0,04	2,4±0,1 **	2,0±0,04	1,9±0,04
Mg <sup>2+</sup> [mmol/l]	0,75±0,03	0,65±0,03	0,64±0,04	0,83±0,06
P <sub>i</sub> [mmol/l]	1,79±0,1	1,67±0,1	1,70±0,06	1,64±0,1
Albumin [mg/dl]	2,21±0,04	2,11±0,06	2,15±0,12	2,07±0,09
Harnstoff [mg/dl]	53,1±5	62,3±6	60,6±8	105,3±8 **
<b>Hämatokrit [%]</b>				
Hämatokrit [%]	0,51±0,01	0,49±0,01	0,51±0,01	0,51±0,03
<b>Nierengewicht [% des KG/Niere]</b>				
Nierengewicht [% des KG/Niere]	0,58±0,01	0,64±0,02	0,46±0,02	0,46±0,01 **

**Anhang 1 - Tabelle „Physiologische Parameter“:** Daten zu den physiologischen Parametern der untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen. Alle Werte als Mittelwert±SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp <0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp <0,01

## Anhang 2 - Physiologische Parameter nach STZ-Diabetesinduktion

	Wildtyp (n = 23)	Rap <sup>-/-</sup> (n = 6)	Ric <sup>-/-</sup> (n = 6)	Rap <sup>-/-</sup> Ric <sup>-/-</sup> (n = 5)
<b>Nahrungsaufnahme [mg/g KG]</b>				
Trinkmenge [ $\mu$ l/g KG]	212 $\pm$ 14 <sup>#</sup>	227 $\pm$ 38 <sup>#</sup>	227 $\pm$ 28 <sup>#</sup>	231 $\pm$ 7 <sup>#</sup>
Urinmenge [ $\mu$ l/g KG]	1397 $\pm$ 104 <sup>#</sup>	1962 $\pm$ 383 <sup>* #</sup>	1505 $\pm$ 247 <sup>#</sup>	1992 $\pm$ 58 <sup>* #</sup>
	1219 $\pm$ 119 <sup>#</sup>	1985 $\pm$ 377 <sup>* #</sup>	1259 $\pm$ 230 <sup>#</sup>	1798 $\pm$ 83 <sup>* #</sup>
<b>Urinausscheidungsparameter</b>				
Na <sup>+</sup> [ $\mu$ mol/mg Kreatinin/g Futter]	109 $\pm$ 12 <sup>#</sup>	156 $\pm$ 45	102 $\pm$ 6	208 $\pm$ 53 <sup>**</sup>
K <sup>+</sup> [ $\mu$ mol/mg Kreatinin/g Futter]	174 $\pm$ 18 <sup>#</sup>	238 $\pm$ 78	166 $\pm$ 12 <sup>#</sup>	356 $\pm$ 100 <sup>**</sup>
Ca <sup>2+</sup> [ $\mu$ mol/mg Kreatinin/g Futter]	1,6 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 3,8 <sup>**</sup>	1,4 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 2,2 <sup>*</sup>
Mg <sup>2+</sup> [ $\mu$ mol/mg Kreatinin/g Futter]	6,9 $\pm$ 2,0	7,5 $\pm$ 2,7	4,2 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 1,0 <sup>#</sup>
Albumin [mg/g Kreatinin]	0,11 $\pm$ 0,06 <sup>#</sup>	0,44 $\pm$ 0,2	0,15 $\pm$ 0,15	0,13 $\pm$ 0,1
<b>Plasmakonzentrationen</b>				
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	145,4 $\pm$ 1 <sup>#</sup>	154,7 $\pm$ 6 <sup>*</sup>	143,1 $\pm$ 1 <sup>#</sup>	164,5 $\pm$ 3 <sup>** #</sup>
K <sup>+</sup> [mmol/l]	3,7 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup>	3,9 $\pm$ 0,2
Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>*</sup>	2,0 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>
Mg <sup>2+</sup> [mmol/l]	1,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>
P <sub>i</sub> [mmol/l]	2,4 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>	3,0 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup>
Harnstoff [mg/dl]	88 $\pm$ 8	146 $\pm$ 28	91 $\pm$ 11	257 $\pm$ 53
Hämatokrit [%]	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,0
Nierengewicht [% des KG/Niere]	0,78 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,07 <sup>**</sup>	0,73 $\pm$ 0,03

**Anhang 2 - Tabelle „Physiologische Parameter nach STZ-Diabetesinduktion“:** Übersicht über die erhobenen Daten der untersuchten Genotypen nach STZ-Diabetesinduktion.

Alle Werte als Mittelwert $\pm$ SEM, \* = p-Wert vs Wildtyp < 0,05, \*\* = p-Wert vs Wildtyp < 0,01, # = p-Wert vs Kontrolle < 0,05