

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

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**Vorgelegt von
Khatib, Hazim**

**Promotionsjahr
2016**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

Professor Dr. F. Artunc

Professor Dr. O. Garaschuck

Professor Dr. C. Harteneck

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MTOR	1
1.1.1	<i>Grundlagen, Pathway, Funktion und Regulation</i>	1
1.1.1.1	mTOR reguliert Zellprozesse	2
1.1.1.2	mTOR-Regulation durch extrazelluläre Signale	4
1.1.2	<i>mTOR in der Niere</i>	6
1.1.2.1	mTOR im Glomerulus	7
1.1.2.2	mTOR im Tubulus	8
1.2	DER PROXIMALE TUBULUS	12
1.2.1	<i>Elektrolyt und Wasserhaushalt</i>	12
1.2.2	<i>Glucose-Haushalt</i>	15
1.2.3	<i>Eiweiß- und Aminosäurehaushalt</i>	15
1.3	FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT	16
2	MATERIAL & METHODEN	18
2.1	MATERIALIENLISTE	18
2.2	VERSUCHSAUFBAU	20
2.2.1	<i>Mausmodell und Doppelknockout</i>	20
2.2.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	22
2.2.2.1	Normalbedingungen	22
2.2.2.2	Versuchsbedingungen	22
2.2.2.3	Urinsammlung	22
2.2.2.4	Blutentnahme	23
2.2.2.5	Futter	23
2.2.2.6	Narkose	24
2.2.2.7	Opferung	24
2.2.3	<i>Induktionsserie und Wachstumsverlauf</i>	24
2.2.4	<i>Versuchsablauf der Insulinserien</i>	25
2.2.5	<i>Versuchsablauf der Diuretika-Serien</i>	26
2.2.6	<i>Versuchsablauf der Hungerversuche</i>	27
2.2.7	<i>Versuchsablauf der Durstversuche</i>	27
2.3	GERÄTE UND MESSPRINZIPIEN	28
2.3.1	<i>Photometer</i>	28
2.3.2	<i>Flammenphotometer: Natrium-, Kalium- und Kalziummessung</i>	28
2.3.3	<i>Fluoreszenzmessung</i>	29
2.3.4	<i>ELISA</i>	30

2.4	VERWENDETE KITS.....	30
2.4.1	<i>Phosphat</i>	30
2.4.2	<i>Magnesium</i>	31
2.4.3	<i>Harnstoff</i>	32
2.4.4	<i>Kreatinin</i>	33
2.4.5	<i>Eiweiss</i>	34
2.4.6	<i>Glucose</i>	35
2.5	ALBUMIN-BESTIMMUNG.....	36
2.6	PARATHORMON-BESTIMMUNG.....	37
2.7	ALDOSTERON-BESTIMMUNG.....	38
2.8	AMINOSÄUREN-BESTIMMUNG.....	38
2.9	GFR-BESTIMMUNG DURCH FITC-INULIN.....	38
2.10	GLUCOSE-TOLERANZTEST.....	40
2.11	INSULIN-TOLERANZTEST.....	40
2.12	OSMOLALITÄTSMESSUNG.....	41
3	ERGEBNISSE.....	43
3.1	KÖRPERGEWICHT UND ESSENAUFNAHME.....	43
3.1.1	<i>Kontrollbedingungen vor und nach Induktion</i>	43
3.1.2	<i>Diuretikaserien</i>	46
3.1.3	<i>Hungerserien</i>	48
3.1.4	<i>Durstserien</i>	49
3.1.5	<i>Nierengewicht</i>	50
3.2	URINAUSSCHIEDUNG UND FLÜSSIGKEITSAUFNAHME.....	51
3.2.1	<i>Kontrollserien</i>	51
3.2.2	<i>Diuretikaserien</i>	53
3.2.3	<i>Durstserien</i>	54
3.3	ELEKTROLYT-HAUSHALT.....	56
3.3.1	<i>Natrium</i>	56
3.3.2	<i>Kalium</i>	57
3.3.3	<i>Phosphat</i>	58
3.3.4	<i>Magnesium</i>	59
3.4	GLUCOSESTOFFWECHSEL.....	60
3.4.1	<i>Glucosurie</i>	60
3.4.2	<i>Glucosetoleranztest (IP-GTT)</i>	61
3.4.3	<i>Insulintoleranztest</i>	62

3.5	EIWEIßSTOFFWECHSEL	62
3.5.1	<i>Aminosäuren im Blut</i>	62
3.5.2	<i>Aminosäurenausscheidung</i>	64
3.5.3	<i>Plasma-Eiweiß</i>	65
3.5.4	<i>Proteinurie</i>	65
3.5.5	<i>Albuminausscheidung</i>	66
3.6	HORMON-HAUSHALT	67
3.6.1	<i>Parathormon</i>	67
3.6.2	<i>Aldosteron</i>	68
3.7	SÄURE-BASEN-HAUSHALT	68
3.8	OSMOLALITÄT	69
3.9	HARNSTOFF	70
3.10	GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE (GFR)	70
4	DISKUSSION	72
4.1.1	<i>Niereninsuffizienz bei verminderter GFR</i>	75
4.1.2	<i>Glucosehaushalt</i>	76
4.1.3	<i>Eiweiß- und Aminosäurehaushalt</i>	77
4.1.4	<i>Ausblick</i>	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENTEIL	87
8	VERÖFFENTLICHUNG	88
9	DANKSAGUNG	89
10	LEBENS LAUF	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht des mTOR-Pathways	5
Abbildung 2: mTOR und die diabetische Nephropathie	8
Abbildung 3: Rolle von mTOR bei der Elektrolytregulation in der distal-tubulären Zelle	10
Abbildung 4: mTORC1-Aktivierung bei chronischer Niereninsuffizienz	12
Abbildung 5: Transportprozesse im proximalen Tubulus	14
Abbildung 6: das Cre/loxP-System	21
Abbildung 7: Körpergewicht in Gramm vor und nach Knockoutinduktion	43
Abbildung 8: Nahrungsaufnahme Gramm pro Tag	44
Abbildung 9: Nahrungsaufnahme in mg/g Körpergewicht	44
Abbildung 10: Gewicht und Nahrungsaufnahme im Verlauf	45
Abbildung 11: Gewichtsverlauf der verschiedenen Genotypen	46
Abbildung 12: Gewichtsverlust nach Diuretikagabe	47
Abbildung 13: Gewichtsverlust nach doppel-dosierter Diuretikagabe	47
Abbildung 14: Körpergewicht beim Hungerversuch	48
Abbildung 15: Gewichtsverlust beim Hungerversuch	49
Abbildung 16: Gewichtsverlust beim Durstversuch	49
Abbildung 17: Nierengewicht	50
Abbildung 18: Nierengewicht	50
Abbildung 19: Urinausscheidung	51
Abbildung 20: Urinausscheidung	52
Abbildung 21: Flüssigkeitsaufnahme	52
Abbildung 22: Flüssigkeitsaufnahme	53
Abbildung 23: Urinausscheidung nach Diuretikagabe	54
Abbildung 24: Urinausscheidung nach doppel-dosierter Diuretikagabe	54
Abbildung 25: Urinausscheidung bei Durstserien	55
Abbildung 26: Urinausscheidung bei Durstserien	55
Abbildung 27: Natrium-Ausscheidung	56
Abbildung 28: Natrium-Ausscheidung	57
Abbildung 29: Kalium-Ausscheidung	57
Abbildung 30: Kalium-Ausscheidung	58

Abbildung 31: Phosphat-Ausscheidung -----	59
Abbildung 32: Phosphat-Ausscheidung -----	59
Abbildung 33: Glucosurie-----	60
Abbildung 34: Glucose im Hungerversuch-----	61
Abbildung 35: Intraperitonealer Glucosetoleranztest (IP-GTT)-----	61
Abbildung 36: Intraperitonealer Insulintoleranztest -----	62
Abbildung 37: Aminosäuren im Plasma -----	63
Abbildung 38: Aminosäuren im Plasma -----	63
Abbildung 39: Aminosäuren-Ausscheidung -----	64
Abbildung 40: Aminosäuren-Ausscheidung -----	64
Abbildung 41: Plasma-Eiweiß -----	65
Abbildung 42: Proteinurie -----	65
Abbildung 43: Proteinurie -----	66
Abbildung 44: Albuminurie -----	66
Abbildung 45: Albuminurie -----	67
Abbildung 46: Parathormon-----	67
Abbildung 47: Aldosteron-----	68
Abbildung 48: Kapilläre Blutgasanalyse -----	69
Abbildung 49: Plasma-Osmolalität-----	69
Abbildung 50: Harnstoff im Plasma-----	70
Abbildung 51: Glomeruläre Filtrationsrate(GFR) -----	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialienliste -----	18
Tabelle 2: Diäten-----	23
Tabelle 3: Versuchsaufbau der Insulinserien-----	25
Tabelle 4: Versuchsaufbau der Diuretikaserien -----	26
Tabelle 5: Diuretika-Injektionslösungen -----	26
Tabelle 6: Versuchsaufbau der Hungerserien -----	27
Tabelle 7: Versuchsaufbau der Durstserien -----	28
Tabelle 8: Pipettierschema der Phosphatmessung-----	31
Tabelle 9: Pipettierschema der Magnesiummessung -----	32
Tabelle 10: Pipettierschema der Harnstoffmessung-----	33
Tabelle 11: Pipettierschema der Kreatininmessung -----	34
Tabelle 12: Pipettierschema der Eiweißmessung-----	35
Tabelle 13: Pipettierschema der Glucosemessung-----	35
Tabelle 14: Pipettierschema der Albuminmessung-----	36

Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1
Abs	Absorption
AKT	Proteinkinase B
Akt2	Subtyp der AKT-Familie
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
Deptor	domain-containing mTOR-interacting protein
DF	Verdünnungsfaktor
eIF4A	Eukaryotic initiation factor 4A
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
ENaC	Epithelial natrium Channel
GTP	Guanosintrisphosphat
IGF	Insulin-like growth factor
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
kDa	Kilo Dalton
LKB1	Serin Threonin Kinase 11 (STK11)
mLST8	mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
PAX8	Paired-Box-Protein 8
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK	Phosphatidylinositol kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren γ
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rheb	Ras-homolog-enriched-in-brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROMK1	Renal Outer Medullary Potassium (K) channel 1
rtTA	reverse tetracycline-controlled transactivator
S6k1	protein S6 kinase 1
SEM	Standard error of the mean
SGK1	Serine/threonine-protein kinase
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
ULK1	Serine/threonine-protein kinase ULK1

1 Einleitung

1.1 mTOR

1.1.1 Grundlagen, Pathway, Funktion und Regulation

Bei mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) handelt es sich um einen großen Proteinkomplex, der als eine intrazelluläre Proteinkinase fungiert. Diese steht im Zentrum des zellulären Stoffwechsels und der Regulation des Zellwachstums¹. Die Erstentdeckung dieser Kinase in den 70er Jahren geschah eher zufällig, nachdem eine antifungale Wirkung eines im Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* isolierten Stoffes festgestellt wurde. Dieser Stoff wurde später nach dem Entdeckungsort Rapamycin benannt. Bei der Erforschung seiner Funktionsweise wurde sein Zielprotein mTOR entdeckt².

Die TOR-Kinase ist bei allen eukaryotischen Zellen zu finden und gehört zur Familie der PIK-Kinasen (Phosphatidylinositol-Kinasen), die Proteine an deren Serin/Threonin-Domänen phosphorylieren³. Die TOR-Kinase findet sich in zwei Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2: Der erste bildet mit dem Protein RAPTOR (*regulatory associated protein of mTOR*), der zweite mit dem Protein RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) jeweils eine Einheit, die mit den Proteinen Deptor und mLST8 assoziieren; wobei mTORC2 zusätzlich mit mSIN und PRR5L assoziiert^{4,5}.

mTOR hat vielfältige Funktionen und steht im Zentrum der Pathogenese vieler Erkrankungen wie beispielsweise:

- In verschiedenen Tumorerkrankungen: Kolorektales Karzinom⁶, Endometrium-Karzinom⁷, Prostata-Karzinom⁸, Mamma- und Ovarial-Karzinom⁹.
- Neurologische Erkrankungen: Epilepsien¹⁰, Tuberöse-Sklerose-assoziierte Epilepsie¹¹.
- Kardiale Erkrankungen: Kardiale Hypertrophie und familiäre hypertrophe Kardiomyopathie¹².
- Nierenerkrankungen: diese werden unten ausführlich besprochen.

1.1.1.1 mTOR reguliert Zellprozesse

mTOR steuert mehrere Zellmechanismen und -funktionen. Neben der Translation und der Transkription reguliert mTOR auch die Proteinstabilität, das Zytoskelett und die Autophagie¹³.

Zellwachstum und Proteinsynthese: Rapamycin, ein Inhibitor von mTOR inhibiert das Zellwachstum¹⁴. Da dieser Befund neue Therapieansätze bei verschiedenen proliferativen Erkrankungen liefert, haben sich seitdem unterschiedlichste Arbeiten und Studien mit diesem Thema befasst. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine S6-Kinase1 (S6K1) und eIF-4E-binding-protein-1 (4EBP1) im Mittelpunkt dieser Regulation stehen. Nach Phosphorylierung durch mTOR greifen diese Proteine in die Translation ein und stimulieren sie. Während die S6-Kinase1 die Translation insgesamt durch Stimulation der Helicaseaktivität von Translationsinitiationsfaktor eIF4A beschleunigt, aktiviert das phosphorylierte 4EBP1 die Translation direkt, indem es seine Bindung mit eIF4E verliert und diese somit für die Bindung an die mRNA freigibt. Hierdurch wird darüber hinaus die Regulation der Zellgröße gesteuert. Durch seine Fähigkeit, die Proteinsynthese zu stimulieren, kann mTOR ein hohes Zellwachstum und eine hohe Zellproliferationsrate bewirken^{2,15-18}.

Zytoskelett: mTOR konnte eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts und daher möglicherweise auch bei der Regulation der Zellmorphologie und Zelladhäsion nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass für diese Funktion nicht mTORC1, sondern mTORC2 verantwortlich ist. Für den bislang nicht vollständig verstandenen Mechanismus gibt es inzwischen Hinweise auf die Aktivierung der Proteinkinase-C α (PKC α) nach Phosphorylierung durch mTORC2. PKC α spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation und Organisation des Aktin-Zytoskeletts¹⁹⁻²¹.

Autophagie: Autophagie bezeichnet die Fähigkeit der Zelle, ihre eigenen nicht notwendigen oder dysfunktionalen Bestandteile wie Proteine und Zellorganellen mit Hilfe von Lysosomen in sogenannten Autophagosomen abzubauen. Die Autophagie dient insbesondere zur Energieeinsparung²². Da ihr zunehmend eine wichtigere Rolle bei der Entstehung vieler Erkrankungen wie beispielsweise neoplastische, kardiovaskuläre, infektiöse, neurodegenerative und metabolische Erkrankungen zugeschrieben wird, steht die Autophagie aktuell im Mittelpunkt der Forschung²³. mTORC1 konnte eine zentrale Rolle bei der Autophagieregulation zugeschrieben werden. mTORC1 inhibiert durch Phosphorylierung einen Kinasekomplex namens ULK1, der unter anderem für die Initiierung und Regulation der Autophagie verantwortlich ist²⁴.

Mitochondrialer Metabolismus: Als ein zentraler Schlüssel in der Regulation von zellulären Prozessen in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot und Energiehaushalt spielt mTOR eine zentrale Rolle beim mitochondrialen Stoffwechsel und dessen multiplen oxidativen Funktionen. Dies erfolgt, indem mTOR die Transkription mitochondrialer Gene aktiviert, wodurch der mitochondriale Stoffwechsel stimuliert wird²⁵.

Lipidsynthese: Da die Fettzellendifferenzierung unter Rapamycintherapie blockiert wird, scheint mTORC1 eine wichtige Rolle beim Lipidstoffwechsel zu spielen. Dabei konnte einen Zusammenhang zwischen mTORC1 und den Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR γ) gefunden werden, der diesen Befund erklären könnte²⁶. PPAR γ ist ein intrazellulärer Rezeptor, der nach Aktivierung die Genexpression im Zellkern reguliert und zur Steigerung der Fettsäureaufnahme und Fettzellendifferenzierung führt²⁷. Zusätzlich zu PPAR γ wird ein anderer Mechanismus für die Stimulation der Lipidsynthese durch mTORC1 verantwortlich gemacht: Es konnte gezeigt werden, dass mTORC1 die Phosphatase Lipin-1 aktiviert, die wiederum ein Protein namens SREBP stimuliert. SREBP steht im Mittelpunkt des Lipidstoffwechsels und stimuliert seinerseits die Transkription der für die Lipidsynthese zuständigen Gene. Dieser Ablauf wird auch als mTORC1-SREBP-Pathway bezeichnet^{28,29}.

1.1.1.2 mTOR-Regulation durch extrazelluläre Signale

Weil mTOR intrazellulär eine zentrale Rolle in der Initiierung und Regulierung verschiedener Zellprozesse spielt, ist es sinnvoll, dass es an extrazelluläre Signale gekoppelt wird, sodass dadurch ein vollständig zellregulierender Apparat entsteht. So konnte festgestellt werden, dass mTOR im Mittelpunkt einer Rezeptorkaskade steht, die durch Wachstumsfaktoren wie TNF- α ³⁰ oder PDGF³¹ und Wachstumshormone wie Insulin aktiviert wird. Das Signal wird dabei über den PI3K-Proteinkinase B (Akt)-Weg vermittelt, an dessen Ende mTOR aktiviert wird und über den oben beschriebenen Mechanismus das Zellwachstum reguliert. Eine genauere Untersuchung hat gezeigt, dass nach Anbinden von Insulin (oder anderen Wachstumsfaktoren) an seinen Rezeptor das IRS (Insulin-Rezeptor-substrat) an Tyrosindomänen phosphoryliert und aktiviert wird, woraufhin die PI3-Kinase stimuliert wird, was schließlich zur Aktivierung von Akt führt.

Die aktivierte Proteinkinase B (Akt) phosphoryliert daraufhin den Tuberöse-Sklerose-Komplex 2 (TSC2) und inhibiert ihn. Der TSC1/TSC2-Komplex steht im Zentrum der mTOR-Regulation, indem er das mTOR-aktivierende GTP-bindende Protein Rheb_{GTP} inhibiert. Außerdem reagiert der TSC1/TSC2-Komplex auf verschiedene Stoffwechselsignale und vermittelt diese an mTOR^{1,2,5,32,33}.

Neben Insulin und Wachstumsfaktoren gelten Aminosäuren als Hauptstimulatoren von mTORC1; über den dafür verantwortlichen Mechanismus ist jedoch weiterhin nicht viel bekannt^{1,34}. Es konnte nachgewiesen werden, dass die in die Zelle aufgenommenen Aminosäuren den mTOR-inhibierende TSC1/TSC2-Komplex hemmen. Außerdem wird vermutet, dass die Aminosäuren das für mTOR essentielle GTP-bindende Protein Rheb stimulieren³⁵.

Die Glucose als zentraler Energielieferant im Organismus zählt ebenfalls zu den wichtigen mTOR-Regulatoren. Es hat sich gezeigt, dass Energie- oder Glucosemangel zu einem Mangel an ATP führt, der seinerseits zur Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase AMPK1 und schließlich zur Hemmung von mTORC1 führt³⁶. Dieser Mechanismus ist sinnvoll, weil die durch mTOR

aktivierten Zellprozesse wie das Zellwachstum und die Proteinsynthese viel Energie benötigen. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass die Tumor-Suppressor-Kinase LKB1 die AMPK bei Energiemangel stimuliert und dadurch zu einer erniedrigten mTORC1-Aktivität führt³⁷. Die Hypoxie führt, ebenso wie der Energiemangel, zu einer Aktivierung des TSC1/TSC2-Proteins, was wiederum die mTORC1-Aktivität hemmt².

Bei den intensiven molekularen Untersuchungen von Rapamycin wurde außerdem gezeigt, dass Rapamycin seine Wirkung ausschließlich auf die Rapamycin-sensiblen Einheit von mTOR -mTORC1- entfaltet. Die Hemmung von mTORC1 läuft über die Komplexbildung von Rapamycin mit FKBP12³.

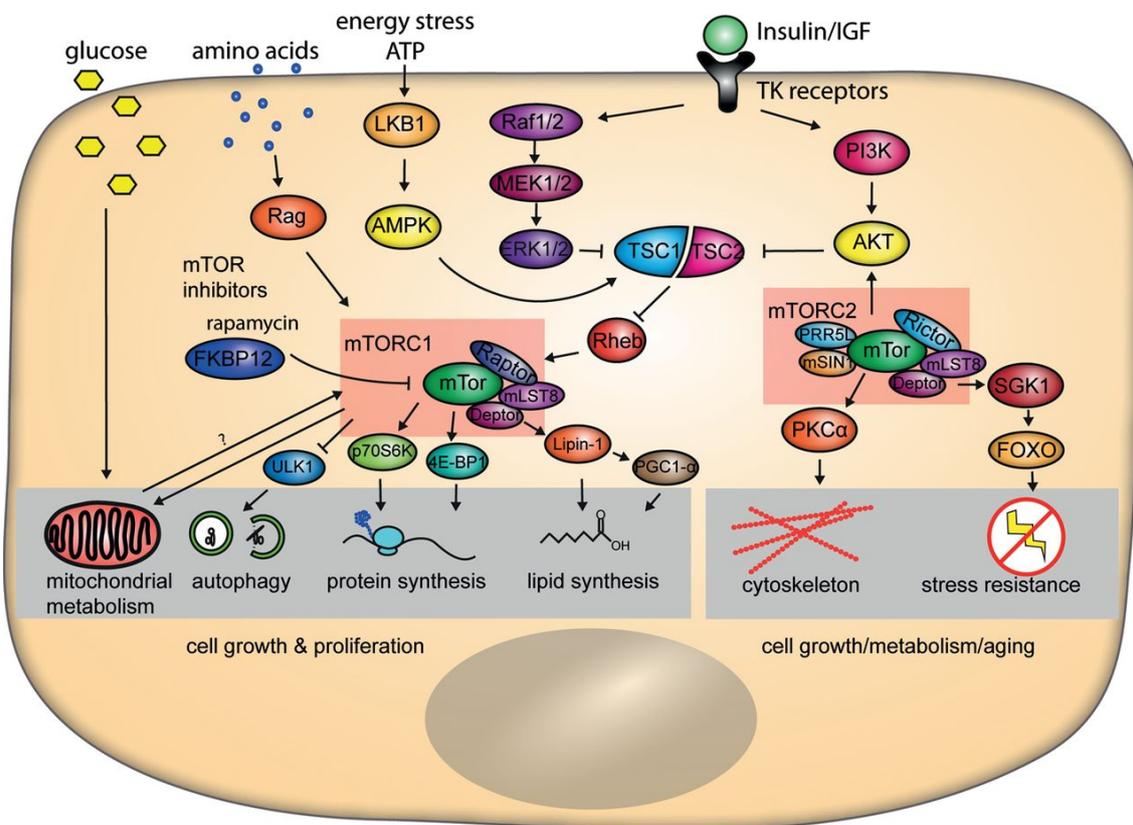


Abbildung 1: Übersicht des mTOR-Pathways⁴

mTOR besteht aus 2 Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2, diese werden durch unterschiedliche Signale wie Insulin, Aminosäuren oder Glucose reguliert. mTOR reguliert seinerseits essentielle zelluläre Prozesse wie die Proteinsynthese, das Zellwachstum, das Zytoskelett und die Autophagie. AKT, protein kinase B; AMPK, AMP-activated protein kinase; Deptor, DEP domain-containing mTOR-interacting protein; 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FKBP12, FK506-binding protein of 12 kDa; FOXO, forkhead box O1; IGF, insulin growth factor; LKB1, serine threonine kinase 11; MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase mLST8, mammalian lethal with Sec 13 protein 8; mSIN1, mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein; mTOR, mammalian target of rapamycin complex; p70S6K, p 70 ribosomal

S6 kinase; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PGC1- α , PPAR γ coactivator 1- α ; PKC α , protein kinase C α ; PRR5L, proline rich protein 5 like; Rag, Ras-related GTP-binding protein; Raptor, regulatory-associated protein of TOR; Rheb, Ras homologue enriched in brain; Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR; SGK-1, serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1; TK, tyrosine kinase; TSC, tuberous sclerosis complex; TSC1, hamartin, TSC2, tuberin; ULK1, unc-51-like kinase 1.

1.1.2 mTOR in der Niere

Trotz intensiver Forschung an mTOR und seinen multiplen Funktionen in der Zelle und in den verschiedenen Organsystemen ist das Wissen über seine Rolle in der Niere lückenhaft. Mit zunehmendem Einsatz von mTOR-Inhibitoren im klinischen Alltag wie beispielsweise nach Nierentransplantation und bei verschiedenen Neoplasien wird ein genaueres Verständnis der Funktionen von mTOR immer wichtiger. Bislang konnte ein Zusammenhang von mTOR und mehreren Nierenerkrankungen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass mTOR beispielsweise nicht nur bei der Entstehung von Glomerulopathien eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei der Entstehung von vaskulären Nierenerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie⁴. Außerdem zählt mTOR inzwischen zu den wichtigsten gut untersuchten Faktoren bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms, wodurch mTOR-Inhibitoren zu einer unentbehrlichen Therapiealternative beim metastasierten Nierenzellkarzinom wurden³⁸. Des Weiteren hat man herausgefunden, dass mTOR eine zentrale Rolle bei den genetisch bedingten zystischen Nierenerkrankungen wie der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenkrankheit (ADPKD)³⁹ und der tuberösen Sklerose¹² spielt. So haben mTOR-Inhibitoren zwar im Tiermodell die Krankheitsprogression von ADPKD verzögert³⁹, die klinische Datenlage ist diesbezüglich jedoch noch unklar, da gezeigt werden konnte, dass eine langfristige Therapie mit mTOR-Inhibitoren keinen Nutzen birgt⁴⁰.

Darüber hinaus konnte in mehreren Tiermodellen nachgewiesen werden, dass mTOR zur Regeneration nach einem vorübergehenden akuten Nierenversagen beiträgt. Hier wurde gezeigt, dass die mTOR-Aktivität nach Reperfusion eindeutig ansteigt. Daher scheint eine sehr frühzeitige immunsupprimierende

Therapie mit Rapamycin nach einer Nierentransplantation eher kontraproduktiv für die Regeneration der Niere nach Ischämie^{36,41-43}.

Außerdem liegt aufgrund des hohen Energiebedarfs der Niere bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes eine zentrale Rolle von mTOR bei diesen physiologischen Prozessen nahe.

1.1.2.1 mTOR im Glomerulus

Viele Nierenerkrankungen spielen sich hauptsächlich im Glomerulus ab, z.B. die Glomerulonephritiden und andere Nephropathien. Bei dem Pathomechanismus dieser Erkrankungen spielen sowohl die Podozyten als auch die Basalmembran eine zentrale Rolle. mTOR erfüllt im Glomerulus zentrale Aufgaben; mTOR reguliert die Größe der Podozyten. Ein Knockout von mTORC1 führt zu einer Proteinurie mit dem Bild einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS)⁴⁴. Dieser Befund erklärt auch, weshalb es unter Therapie mit Rapamycin zu einer Proteinurie kommt. Auf zellulärer Ebene bestätigte sich dieser Befund. Nach einer mTORC1-Hemmung ist die kompensatorische Hypertrophie eines Podozyten bei gleichzeitiger Störung anderer benachbarten Podozyten aufgehoben⁴⁵. Zusätzlich zu diesem wichtigen Einfluss von mTORC1 auf die Podozyten soll mTORC2 über die Aktivierung von Akt2 eine protektive Wirkung auf die Podozyten haben, insbesondere bei einer Nephropenie im Rahmen einer bereits bestehender chronischer Niereninsuffizienz^{4,46}.

Zahlreiche Arbeiten haben außerdem gezeigt, dass mTOR bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie eine zentrale Rolle spielt⁴⁷, welche in westlichen Ländern die führende Ursache für die terminale Niereninsuffizienz darstellt⁴⁸. Durch die bei Diabetes mellitus vorherrschender Hyperglykämie wird mTOR aktiviert. Dies erfolgt über die Hemmung von AMPK und Aktivierung von AKT durch die Hyperglykämie⁴⁹. Es hat sich gezeigt, dass die Aktivierung von mTOR über Zellwachstum und -proliferation zu einer glomerulären Hypertrophie führt, die charakteristischerweise der Hypertrophie bei der diabetischen Nephropathie ähnelt⁵⁰. Zudem führt mTOR zu anderen, der diabetischen Nephropathie ähnelnden, Veränderungen im Glomerulus wie Verdickung der Basalmembran und Akkumulation von mesangialer Matrix³⁶.

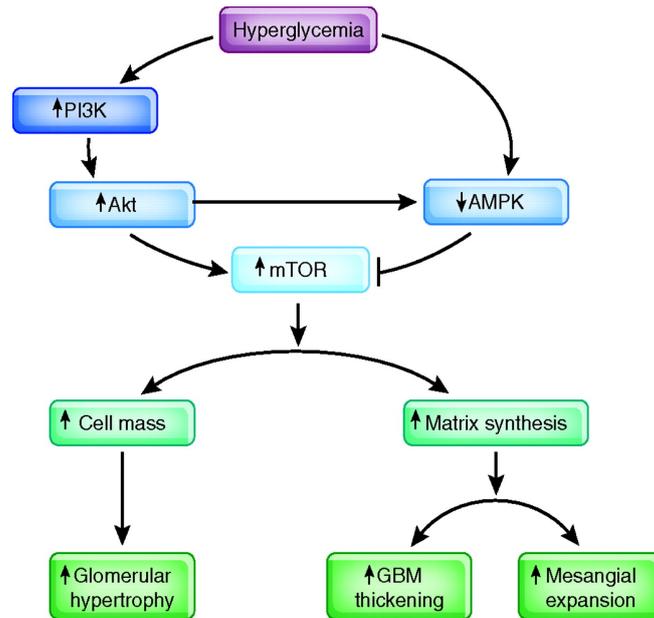


Abbildung 2: mTOR und die diabetische Nephropathie³⁶

Die Hyperglykämie aktiviert mTOR und führt dadurch zu Veränderungen, die für die diabetische Nephropathie typisch sind. GBM=Glomerular basement membrane

Neben seiner Rolle bei der diabetischen Nephropathie hat mTOR eine wichtige Bedeutung bei anderen Glomerulopathien. So konnte man beobachten, dass eine Therapie mit Rapamycin zu einer Verbesserung des pathologischen Phänotyps der minimal-change-Glomerulopathie⁵¹, Fokal-segmentalen Glomerulosklerose⁵², membranösen Nephropathie⁵³ und der Rapid-Progressive-Glomerulonephritis⁵⁴ führt⁴.

1.1.2.2 mTOR im Tubulus

Im Gegensatz zur mTOR-Funktion im Glomerulus ist über mTOR im Tubulssystem relativ wenig bekannt. Viele Erkenntnisse über die Wirkung von mTOR im Tubulus basieren auf klinischen Befunden und Beobachtungen im Rahmen einer mTOR-inhibierenden Therapie mit Rapamycin.

Unter dieser Therapie sind wiederholt eine Hypophosphatämie und eine Hypokaliämie beschrieben worden, deren pathophysiologischer Hintergrund jedoch noch nicht vollständig klar ist⁵⁵. Am ehesten ist die Hypokaliämie auf eine erhöhte Kaliumsekretion im Tubulus zurückzuführen ist⁵⁶. Die Hypophosphatämie ist hingegen nicht vollständig nachzuvollziehen. Während nachgewiesen werden konnte, dass mTOR den intestinalen Phosphatrezeptor

NaPi-IIb und den renalen Phosphatrezeptor NaPi-IIa *in vitro* stimuliert, konnte eine solche Regulation *in vivo* nicht reproduziert werden. Aktuell wird deshalb davon ausgegangen, dass hinter dieser Hypophosphatämie am ehesten nicht eine einfache Störung auf Rezeptorebene auf der luminalen Seite des Tubulus steht, sondern eher eine komplexe Störung der hormonellen Regulation auf der basolateralen Seite des Tubulus vorliegt^{4,57,58}.

Außerdem induziert Rapamycin ein mildes Fanconi-Syndrom nicht nur mit Phosphatverlust, sondern auch mit Glucosurie und Aminoazidurie der meisten Aminosäuren⁵⁷. Deshalb kann man davon ausgehen, dass mTOR eine zentrale Rolle im Transport im proximalen Tubulus spielt; entweder direkt durch Regulation der jeweiligen Transporter oder durch andere bislang unbekanntenen Wege⁵⁷.

Ein anderer wichtiger Parameter, der durch mTOR im Tubulus reguliert wird und eine zentrale Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und arterieller Hypertonie spielt, ist Natrium. Diese Regulation wird über das mTORC2-Substrat, die Serin-Threonin-Proteinkinase SGK1, vermittelt. mTORC2 phosphoryliert die SGK1 nach Interaktion von SGK1 mit seiner Komponente mSIN1 und aktiviert sie. Die aktivierte SGK1 aktiviert ihrerseits den epithelialen Natriumkanal (ENaC) im distalen Tubulus und hat eine große Bedeutung bei seiner Regulation⁵⁹. Außerdem kommt mTORC2 auch eine Bedeutung bei der Regulation von Kaliumkanälen im distalen Tubulus zu, indem mTORC2 die Proteinkinase C phosphoryliert und aktiviert⁶⁰. Die aktivierte PKC phosphoryliert die sogenannten ROMK1-Kanäle und induziert deren Expression auf der Zellmembran der distal-tubulären Epithelzelle⁶¹. Wenn man diese beiden Befunde zusammen betrachtet, wird deutlich, dass mTOR eine bedeutende Rolle bei der Elektrolytregulation im distalen Tubulus spielt und dass diese Regulation unterschiedliche pathophysiologische Aspekte mit sich bringen kann.

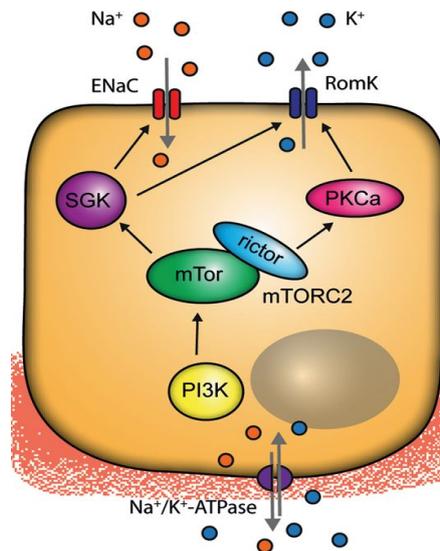


Abbildung 3: Rolle von mTOR bei der Elektrolytregulation in der distal-tubulären Zelle⁴

SGK, Serin/threonin-Proteinkinase; PKCa, Proteinkinase Ca; PI3K,

Phosphatidylinositol-3-Kinase; Rictor, Rapamycin-insensitive companion of mTOR.

Bei einem Knockout vom Raptor im distalen Tubulus und im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife durch Kopplung an den Kidney-specific-Promotor (KSP) wurden zahlreiche Auswirkungen von mTORC1 auf das Nierenepithel entdeckt⁶². Als erstes war in diesem Modell eine Polyurie mit gestörter Harnkonzentrierung auffällig, zu deren Pathophysiologie eine in Westernblots festgestellte reduzierte Dichte des apikalen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transporters (NKCC2) und des Thiazid-sensiblen $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Transporters (NCC) gut passt. Außerdem bestand in diesem Monoknockoutmodell eine erhöhte Kalzium- und Magnesiumausscheidung. Diese Befunde weisen somit auf einen Defekt im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im distalen Tubulus hin, infolge dessen sowohl das Gegenstromprinzip zur Harnkonzentrierung als auch die Kationen-Resorption dort gestört sein könnte. Histologisch konnte darüber hinaus ein schwerer Defekt der Mitochondrien in den Epithelzellen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr gesehen werden, der von einer Reduktion des mitochondrialen Biosynthese-Regulators PGC1- α begleitet war. Darüber hinaus war die mTORC2-Aktivität kompensatorisch erhöht, sodass man zur Schlussfolgerung kam, dass mTORC2 und mTORC1 beim Haushalt der Epithelzellen im distalen Tubulus eine gemeinsame

funktionelle Einheit bilden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass mTORC1 nach einer tubulären Schädigung für die Reparatur und Regeneration essentiell ist⁶². Außerdem wurde beobachtet, dass die mTORC1-Aktivität sowohl bei der diabetisch (siehe oben) als auch der nicht diabetisch bedingten Niereninsuffizienz erhöht ist. Neben den typischen histologischen Veränderungen im Glomerulus, konnten unterschiedliche Aspekte im Tubulus und Interstitium festgestellt werden. Es war zu sehen, dass die erhöhte mTORC1-Aktivität bei chronischer Niereninsuffizienz zur Proliferation von B- und T-Lymphozyten³⁶ und von Fibroblasten mit einer erhöhten Kollagensynthese führte^{36,63,64}. Außerdem führte sie zu vermehrter Ausschüttung von proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen³⁶. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wurde durch aktivierte Tubuluszellen verstärkt, die bereits durch die nach glomerulärer Hypertrophie entstandene Proteinurie aktiviert wurden³⁶. Diese Effekte lösten gemeinsam eine interstitielle Entzündungsreaktion aus, die in eine tubuläre Schädigung und eine interstitielle Fibrose mündete, wobei letztere ein typisches Merkmal der diabetischen Nephropathie ist³⁶. Zudem ist aus dieser Entzündungskonstellation die Theorie der sogenannten EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) entstanden. Die Theorie postuliert die Umwandlung der tubulären Epithelzellen in Fibroblasten, welche dann durch die Basalmembran ins Interstitium wandern und dort zur Fibrose beitragen⁶⁵. Da Rapamycin die EMT im Tiermodell inhibieren konnte, scheint mTOR eine Rolle bei der Entstehung der EMT zu spielen⁶⁶⁻⁶⁸.

Zusammenfassend kann man deshalb sagen, dass die erhöhte mTORC1-Aktivität bei chronischer Niereninsuffizienz über die tubuläre Schädigung und die interstitielle Fibrose zu einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion führt.

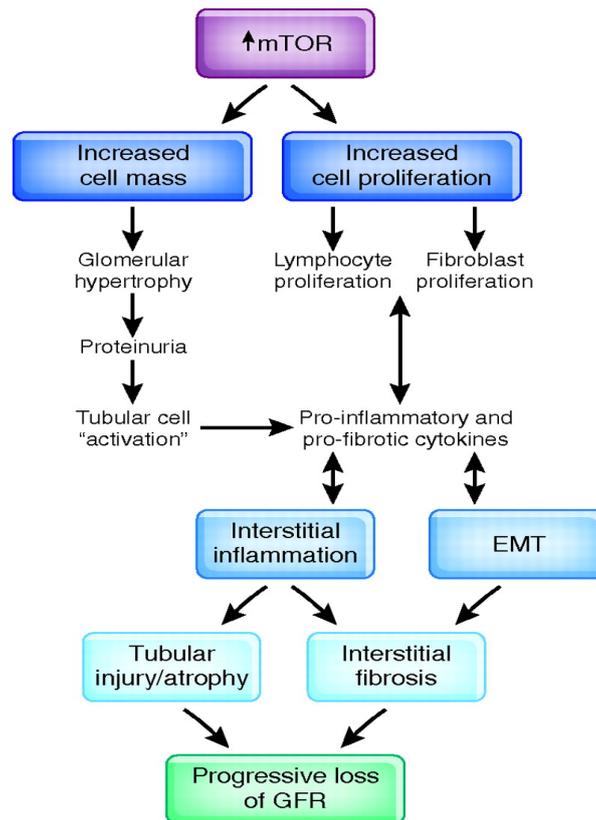


Abbildung 4: mTORC1-Aktivierung bei chronischer Niereninsuffizienz³⁶

Die mTOR-Aktivierung führt nicht nur zur glomerulären Hypertrophie mit Proteinurie, sondern auch zu einer Entzündungsreaktion mit einer interstitiellen Fibrose und tubulären Schädigung, was in einem fortschreitenden Funktionsverlust mündet. EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; GFR, glomeruläre Filtrationsrate.

1.2 Der proximale Tubulus

1.2.1 Elektrolyt und Wasserhaushalt

Der proximale Tubulus ist der Teil des Tubulussystems mit der höchsten Resorptionskapazität. Hier wird nicht nur der größte Anteil an Wasser und Natrium resorbiert, sondern hier findet auch die Resorption der meisten anderen Elektrolyte und Stoffwechselprodukte statt. Die Resorption erfolgt auf der einen Seite durch sekundär aktiven Transport, auf der anderen Seite durch den solvent-drag-Mechanismus (siehe unten). Manche Elektrolyte werden darüber hinaus abhängig vom Lumenpotential resorbiert. Während im frühen proximalen Tubulus durch die Natrium-Resorption ein negatives Potential herrscht, ist im spätproximalen Tubulus durch die Chlorid-Diffusion ein positives

Potential zu finden⁶⁹. Hier sind die Transportprozesse mit der größten Relevanz aufgeführt:

- Natrium und Wasser: Durch die Na⁺-K⁺-ATPase auf der basolateralen Seite wird ein hoher Natriumgradient aufgebaut, der für die Resorption von Natrium verantwortlich ist. Die Natrium-Resorption ist teilweise mit der Resorption anderer Bestandteilen im Urin (Elektrolyte, Glucose, Aminosäuren, Säuren, Phosphat, Sulfat) gekoppelt. Da Natrium osmotisch stark wirksam ist, sorgt seine Resorption für die Entstehung eines osmotischen Gradienten, der die Wasserresorption durch Diffusion ermöglicht. Diese Diffusion erfolgt sowohl durch Aquaporin1-Kanäle als auch durch wasserdurchlässige tight junctions. Ein nicht unerheblicher Teil des resorbierten Natriums gelangt durch den sogenannten solvent-drag-Mechanismus in die Zelle: Durch die Wasserdiffusion werden kleine Teilchen wie Natrium, Kalium, Kalzium und Chlorid mechanisch in den Interzellularraum mitgerissen. Die Natrium- und Wasserresorption wird zudem in den weiteren Tubulusabschnitten osmotisch und hormonell gesteuert. Generell ist anzunehmen, dass sich eine Funktionsstörung des proximalen Tubulus auf den Natrium-Wasserhaushalt auswirken wird^{69,70}.
- Kalium: Im proximalen Tubulus und im absteigenden Teil der Henle-Schleife werden 85%-90% des filtrierten Kaliums überwiegend parazellulär durch das positive Lumenpotential oder durch solvent-drag resorbiert. Die übriggebliebene Menge verbleibt bis zum distalen Tubulus und Sammelrohr im Tubuluslumen und wird dort abhängig vom gesamten Kaliumhaushalt resorbiert oder ausgeschieden. Bei einem Defekt im proximalen Tubulus ist deswegen davon auszugehen, dass die Kaliumresorption so gestört wird, dass die Resorptionskapazität in den anderen Tubulusabschnitten kompensatorisch nicht ausreicht, was zu einem Kaliumverlust führt⁷¹.
- Phosphat: Das frei filtrierte Phosphat wird im proximalen Tubulus zu ca. 70% rückresorbiert. Dies erfolgt auf der luminalen Seite durch einen 3Na⁺-HPO₄⁻Symporter, auf der basolateralen Seite gelangt Phosphat durch einen Uniporter in die Blutbahn. Der Nachweis von Phosphatveränderungen im Plasma oder im Urin kann Rückschlüsse auf viele Erkrankungen geben;

eine Erhöhung im Plasma kann beispielsweise bei Niereninsuffizienz oder Hypoparathyreoidismus, eine Erniedrigung hingegen bei Hyperparathyreoidismus oder Vitamin-D-Mangel vorliegen⁶⁹.

- Kalzium: In der Niere wird Kalzium vor allem in der Henle-Schleife resorbiert. Dies erfolgt durch das dort herrschende positive Lumenpotential, das durch die Resorption von Chlorid-Ionen verursacht wird. Deswegen hat eine Störung des proximalen Tubulus wahrscheinlich keine Auswirkung auf die Kalziumresorption oder –ausscheidung⁶⁹.
- Magnesium: Die Resorption von Magnesium findet (genauso wie bei Kalzium) hauptsächlich in der Henle-Schleife statt. Daher kann man hier auch postulieren, dass sich eine Funktionsstörung des proximalen Tubulus nur geringfügig auf die Magnesiumausscheidung auswirken wird⁶⁹.

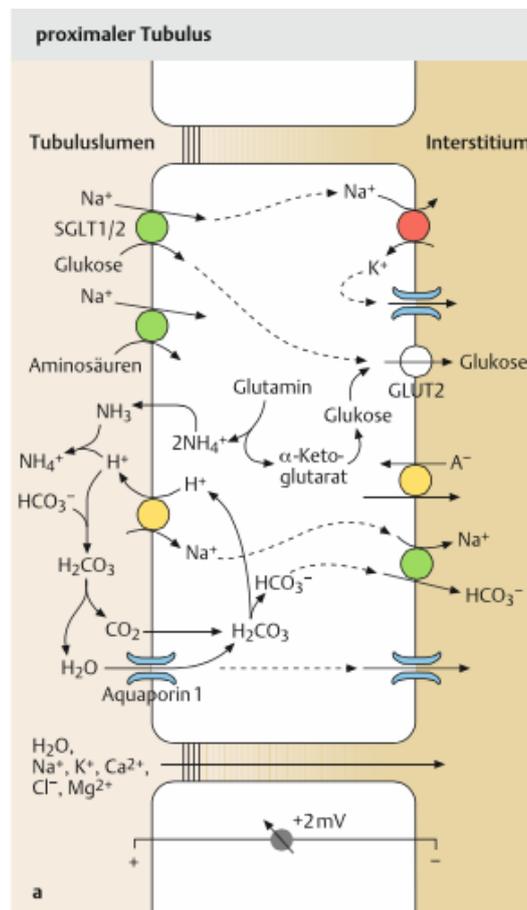


Abbildung 5: Transportprozesse im proximalen Tubulus⁷⁰

SGLT, sodium-glucose linked transporter; GLUT2, Glucosetransporter 2.

1.2.2 Glucose-Haushalt

Glucose ist die Hauptkomponente des Kohlenhydrat-Stoffwechsels. Sie wird im Glomerulus frei filtriert, und im proximalen Tubulus rückresorbiert. Auf der luminalen Seite der tubulären Zellen befinden sich sogenannte Natrium-glucose linked transporter (SGLT); diese sind Natrium-Glucose-Symporter, welche die Glucose in die Zelle transportieren. Diese Transporter werden in SGLT1 und SGLT2 unterteilt. Während SGLT1 Glucose und Natrium im Verhältnis eins zu eins transportiert und für den größten Teil der Resorption verantwortlich ist, transportiert der für Glucose hochaffine SGLT2 Glucose und Natrium im Verhältnis eins zu zwei und ist somit energieaufwendiger. Der dafür notwendige Natriumgradient wird durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ auf der basolateralen Seite aufgebaut. Nach Resorption in die Zelle diffundiert Glucose durch GLUT2-Uniporter in die Blutbahn. Normalerweise schafft es die Niere, die frei filtrierte Glucose vollständig zu resorbieren. Es gibt jedoch bestimmte Fälle oder Erkrankungen, bei denen dies nicht der Fall ist, sodass Glucose im Urin nachweisbar wird. Aus diesem Grund wurde der Begriff ‚Nierenschwelle‘ eingeführt. Die Nierenschwelle definiert die Grenze, ab der die oben genannten Rezeptoren mit Glucose gesättigt sind. Sie liegt normalerweise bei 180 mg/dl. Es ist daher zu erwarten, dass Defekte in den Glucoserezeptoren oder Schädigungen des proximalen Tubulus eine Glucosurie verursachen⁶⁹.

1.2.3 Eiweiß- und Aminosäurehaushalt

Ebenso wie Glucose werden die Aminosäuren im Glomerulus frei filtriert und überwiegend im proximalen Tubulus rückresorbiert. Die Rückresorption erfolgt durch unterschiedliche Transporter, die sich auf der luminalen Seite befinden. Während z.B. die anionischen Aminosäuren Natrium-gekoppelt transportiert werden, erfolgt die Resorption anderer Aminosäuren wie Zystein durch Aminosäuren-Austauscher. Weil diese Rezeptoren gesättigt werden können, gibt es auch für die Aminosäuren eine Nierenschwelle, ab der die Aminosäuren nicht mehr resorbiert und mit dem Urin ausgeschieden werden. Eine solche Aminoazidurie ist somit auch nicht physiologisch und kann unter anderem auf

eine Schädigung der Transporter oder der proximal-tubulären Zelle zurückgeführt werden.

Die Proteinresorption findet vor allem im proximalen Tubulus statt. Wegen des besonderen Aufbaus des Glomerulus werden alle Proteine, die kleiner als das Albumin sind (Molekulargewicht 69 kDa) frei filtriert. Deshalb können nur kleinere Proteine wie β_2 -Mikroglobulin oder Insulin in kleinen Mengen filtriert werden, während größere Proteine wie Albumin und Immunglobuline die Blut-Harn-Schranke nicht passieren können. Die filtrierten Proteine werden nicht direkt durch Transporter resorbiert, sondern werden zuerst über Endozytose nach Bindung an Rezeptoren (Megalin und Cubilin) in Vesikel aufgenommen, die mit Lysosomen fusionieren. Hier werden die Proteine in einzelne Aminosäuren abgebaut. Diese Aminosäuren gelangen in das Zytosol und verlassen die Zelle über Austauscher oder Uniporter in die Blutbahn.

Eine großmolekulare Proteinurie kann auf eine Schädigung der Podozyten oder der Basalmembran im Glomerulus zurückgeführt werden. Der Nachweis kleinerer Proteine wie β_2 -Mikroglobulin oder α_1 -Mikroglobulin im Urin ist hingegen oft durch eine Schädigung im proximalen Tubulus zu erklären. Falls mTOR bei der Proteinresorption im proximalen Tubulus eine Rolle spielen sollte, würde man dementsprechend vor allem kleinere Proteine wie β_2 -Mikroglobulin im Urin nachweisen können⁶⁹.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Im Gegensatz zum zunehmenden Verständnis von mTOR bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und im Gegensatz zum breiten klinischen Einsatz von mTOR-Inhibitoren, ist über die Funktion von mTOR im Tubulussystem der Niere relativ wenig bekannt.

Diese Arbeit versucht deswegen zu klären, ob mTOR im Nierentubulus eine Rolle spielt und welchen Einfluss mTOR gegebenenfalls auf die dortigen Prozesse nimmt.

Während sich andere Arbeiten mit der Rolle der mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 in Einzelknockout-Modellen befasst haben, widmet sich diese Arbeit der Untersuchung der Funktion von mTOR in einem induzierbaren Doppelknockoutmodell mit synchroner Deletion der beiden mTOR-Komplexe im Nierentubulus bei der adulten Maus.

2 Material & Methoden

2.1 Materialienliste

Hier sind die Materialien, Tests und Geräte aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Materialienliste

Allgemeine Messmaterialien	
UV-Küvetten mikro	70 µl. Zentrumhöhe: 8,5 mm. Dimension:12,5x12,5x45 mm. Brand GmbH, Germany.
Pipettenspitzen	1-200 µl, gelb. ratiolab, Germany.
	0,1-10 µl, weiß. Carl Roth GmbH, Karlsruhe.
	1 ml, blau. Greiner bio-one GmbH
Reaktionsgefäße	1,5 ml. Eppendorf/ greiner bio-one GmbH
Eppendorf-Multipetten	2,5 ml. Compitips plus Eppendorf
Pipetten, Eppendorf	Je bis 2,5 µl / 10 µl / 20 µl / 100 µl / 200 µl / 1 ml
Stripette- serological Pipette	5 ml
Osmolalitätsmessgefäße	0,15 ml. Knauer, Berlin
Urinsammelröhrchen	3,5 ml, 55x12 mm. SARSTEDT
Injektionskanülen	0,9x40 mm, 20G. Sterican BBraun
	0,30x8 mm, 30G. U-40 Insulin, BD Micro-Fine
	1 ml Heparinspritzen. Omnifex-H BBraun
Blutentnahme-Kapillaren	Na-heparin, Einmal-Kapillarpipetten. Hirschmann Laborgeräte
	Hämatokrit-Kapillaren, Na-heparin 3,75 IU.Hirschmann Laborgeräte
Versiegelungswachsplatten	für Hämatokrit-Kapillaren

Injektionslösungen, Lösungsmittel, Medikamente etc.	
Injektionswasser	Ampuwa
Natriumchlorid	Natriumchlorid-Lösungen 0,9%
Glucose-Lösungen	20 und 40% Glucose-Lösungen
DMSO	Dimethylsulfoxid Hybri max 99+%, SIGMA-ALDRICH GmbH
Furosemid	Pulver, SIGMA Life Science GmbH
Hydrochlorothiazid	Pulver, SIGMA-ALDRICH GmbH
Isofluran	Isofluran CP 1 ml/ml, cp-pharma
Doxycyclin	Doxycyclinhyclat als Pulver, Fagron GmbH
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS Dulbecco, BIOCHROM AG.
Öl für die Urinröhren gegen die Urinverdampfung	Paraffin flüssig. Merck KGaA, Germany
Geräte	
Photometer	BioMate3, Thermo Electron Corporation,
Flammenphotometer	EFUX 5057, Eppendorf
Osmometer	Osmometer Automatic. Knauer, Berlin
Zentrifuge	Thermo Electron Corporation
Elektrische Waage	OHAUS CORPORATION, USA
Vortexmischer	VORTEX-GENIE-2. Scientific Industries, USA
Aminosäureanalysator	Biochrom 30 Plus
Kits	
Glucose GOD-PAP	Labor Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
Gesamt-Eiweiß im Liquor/Urin	
Phosphor, anorganisch	
Magnesium, Xylidylblau	
Creatinin Jaffe, kinetisch	
Harnstoff UV, kinetisch	

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Mausmodell und Doppelknockout

Die Studie war durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer M9/11 und M4/13 genehmigt worden. Eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten lag für meine Person vor.

Für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit wurde ein Mausmodell mit einem gewebespezifischen induzierbaren Doppelknockout gewählt. Dabei wurden die beiden Gene Raptor und Rictor deletiert, so dass sowohl der mTORC1 und mTORC2 bei den betreffenden Mäusen nicht vorhanden war. Die Mäuse wurden in 2 Gruppen untersucht: Wildtyp- und Doppelknockoutgruppe. Vor Induktion des Knockouts unterschieden sich die beiden Gruppen phänotypisch nicht. Erst nach Induktion des Knockouts kam es zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen.

Das verwendete Mausmodell basiert auf das Prinzip des inzwischen ubiquitär angewendeten Cre/loxP-Systems. Dabei handelt es sich um ein Rekombinationssystem, durch das bestimmte Gene gewebespezifisch und zeitlich induzierbar ausgeschaltet werden können, während andere Gewebe unberührt bleiben⁷². Zunächst werden zwei Mauslinien miteinander verpaart, wobei die erste Linie die Cre-Rekombinase mit dem zugehörigen gewebespezifischen, durch rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) aktivierbaren Promotor enthält, während die zweite Linie über das auszuknockende Gene verfügt, die an ihren beiden Enden mit von Cre-Rekombinase erkennbaren sogenannten loxP-Stellen markiert sind. Nach der Verpaarung erhält man die Reportermaus mit dem Zielgen. Durch die Gabe von Doxycyclin kann das rtTA an den Promotor binden und diesen stimulieren, sodass die Expression der Cre-Rekombinase in Gang gesetzt wird, was zum Ausknocken des Zielgenes führt. Der größte Vorteil dieses Systems besteht darin, die Manifestation des Knockouts nicht nur gewebespezifisch sondern auch zeitlich kontrollieren zu können.

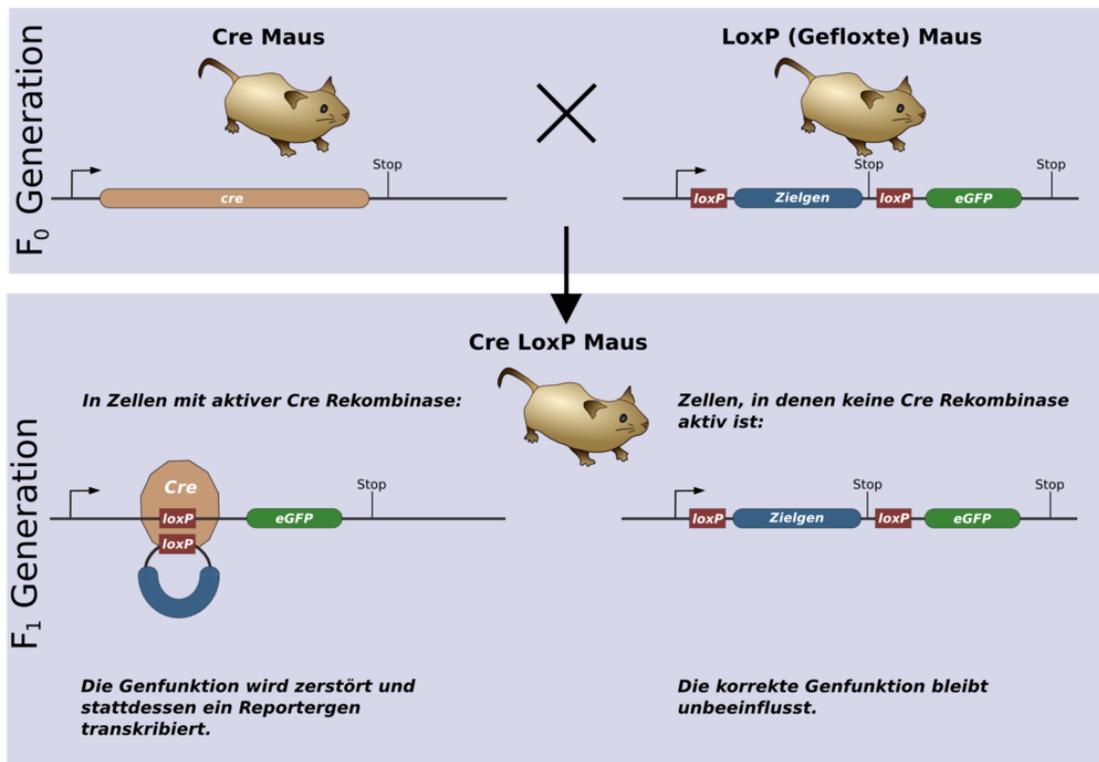


Abbildung 6: das Cre/loxP-System⁷³

Nach der Verpaarung der Cre-tragenden Maus mit der Maus, die das gefloخته Zielgen trägt, erhält man die Knockoutmaus, bei der die Cre-Rekombinase zur Knockoutmanifestation noch aktiviert werden muss. Cre, Cre(Causes Rekombination) Rekombinase; loxP, Locus of crossing (x) over (P); eGFP: hier nur ein Beispiel eines benachbarten Gens.

Für diese Arbeit wurden Knockout-Mäuse mit dem Genotyp *Raptor^{fl/fl}*Rictor^{fl/fl}*Pax8rtTa*TetOCre* verwendet, bei denen das oben beschriebene Knockoutsystem mit Pax8rtTA-Transgen als Promotor vorliegt und ein Knockout mithilfe des Transgens TetOCre der beiden markierten Allele Raptor und Rictor erzielt werden kann. Von größter Bedeutung ist hierbei, dass der verwendete Promotor Pax8 bis auf die Schilddrüse und den Müller-Gang in keinem anderen Gewebe außer dem Nierentubulus zu finden ist⁷⁴. Färbungsuntersuchungen haben außerdem gezeigt, dass der Knockout mit Pax8 als Promotor im proximalen Tubulus am ausgeprägten ist. Bei den verwendeten Knockoutmäusen kann daher von einer isolierten Manifestation des Raptor-Rictor-Knockouts im proximalen Tubulus ausgegangen werden.

2.2.2 Versuchsdurchführung

2.2.2.1 Normalbedingungen

Die Tiere wurden in Typ II long-Käfigen bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und bei 21-23 °C gehalten. Futter und Trinkwasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.2.2.2 Versuchsbedingungen

Während nahezu allen durchgeführten Versuchen wurden die Tiere in metabolischen Käfigen gehalten. Diese Käfige ermöglichen eine kontinuierliche Urinsammlung über die Versuchszeit, die je nach Versuchsart 6,12 oder 24 Stunden betrug. Die Maus wurde in den oberen Teil des Käfigs hineingebracht, dessen Boden aus Metallgitter besteht. Im unteren Teil des Käfigs wurden der Urin und der Kot in zwei verschiedenen Behältern gesammelt; hierfür ist ein Trichtersystem aus Kunststoff zwischen dem oberen und unteren Käfigteil vorhanden.

Darüber hinaus kann während den Interventionen die aufgenommene Futter- und Wassermenge gemessen und das Körpergewicht der Tiere kontrolliert werden. Sowohl die Interventionen mit den begleitenden Messungen als auch die Urinsammlung fanden täglich zum selben Zeitpunkt statt, sodass während des gesamten Versuchsablaufs die gleichen Bedingungen bei allen Tieren herrschten. Bei Durst- bzw. Hungerversuch musste eine Flüssigkeits- bzw. Futterrestriktion herrschen. Um einen stressbedingten Einfluss auf die Messungen und Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Tiere bereits 12 Stunden vor Versuchsbeginn in die metabolischen Käfige verbracht, um sich an die neuen Bedingungen anzupassen.

2.2.2.3 Urinsammlung

Die Urinsammlung fand bei den meisten Serien über 24 Stunden statt. Bei manchen Versuchen, z.B. bei Diuretikaserien, musste sie bereits 6 Stunden nach der Intervention erfolgen. Um eine exakte Urinsammlung zu erreichen, wurde vor Versuchsbeginn die Blase durch eine transabdominelle Blasenmassage geleert. Selbiges geschah bei Versuchsende. Die Blasenmassage war nach einer kurzen Sedierung mit Isofluran möglich. Um

das Verdunsten des Urins aus den Sammelbehältern zu verhindern, wurden ca. 150 µl Paraffinöl in jeden Behälter zu Beginn jeder Sammlung pipettiert. Nach Versuchsende wurde der Urin für 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert, um von kontaminierenden Stoffen wie festen Futterteilchen befreit zu werden. Der so gereinigte Urin wurde danach in Eppendorfgefäßen bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.4 Blutentnahme

Die Abnahme kleinerer Blutmengen beispielsweise zur Blutzucker- oder Inulinbestimmung erfolgte über die Schwanzspitze. Größere Blutmengen z.B. zum Ende einer Serie wurden unter Narkose aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen.

Das Blut wurde in heparinbeschichtete Glaskapillaren abgenommen und dann ebenso für 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde in Eppendorfgefäßen bei -20 °C aufbewahrt. Nach jeder Blutabnahme von mehr als 200 µl wurden die Mäuse zur Erholung für 14 Tage in den normalen Käfigen unter Normalbedingungen zurückgebracht.

2.2.2.5 Futter

Abhängig vom Versuch wurden verschiedene Futtertypen verwendet. Hier folgt eine Tabelle mit den verwendeten Futtertypen:

Tabelle 2: Diäten

Diät	Eigenschaften
Standardfutter	Standarddiät unter Normalbedingungen (ssniff-Spezialdiäten V1534-703)
C1000	Standard-Kontrolldiät, enthält alle notwendigen physiologischen Nährstoffe (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, C1000)
C1314	Standard-Kontrolldiät, enthält alle notwendigen physiologischen Nährstoffe. Total pathogenfrei (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, C1314)

2.2.2.6 Narkose

Die Narkose wurde mit Isofluran durchgeführt. Sie fand ausschließlich für kurze Eingriffe wie retrobulbäre Blutentnahme, intravenöse / intraperitoneale / subkutane Injektion und Blasenmassage statt.

Durchführung:

1. Verdampfer mit Isofluran füllen
2. Maus in den Narkosebehälter hineinbringen
3. Sauerstoff auf 2 l/min und den Verdampfer auf 5% stellen
4. Narkosebehälter abdecken, Narkosedauer abhängig von der gewollten Narkosetiefe wählen, dann Intervention durchführen.

Wichtig war darauf zu achten, dass die Atemwege der Maus während des Narkoseprozesses frei blieben und der Kopf zusammen mit dem Nacken gerade steht.

2.2.2.7 Opferung

Es war oft erforderlich, das Plasma gleichzeitig auf mehrere Parameter zu untersuchen, wofür viel Plasma benötigt wurde. Dazu erfolgte die Opferung der Tiere unter Gewinnung des meisten Blutes der Tiere. Zudem war die Nierenentnahme zur Gewichtsmessung und histologischen Aufarbeitung nur durch eine Opferung möglich; hierfür wurden beide Nieren entnommen, vom umgebenden Fettgewebe befreit und dann gewogen.

2.2.3 Induktionsserie und Wachstumsverlauf

Allgemein: Der zeitlich induzierbare Knockout ermöglichte es, die Knockouttiere vor und nach Manifestation des Knockouts zu beobachten, sodass Auffälligkeit, die sich erst nach Induktion des Knockouts manifestierten, sicher auf den Knockout zurückgeführt werden konnten und somit ein kausaler Zusammenhang zwischen der mTOR-Deletion und dem neu entstandenen Phänotyp hergestellt war.

Durchführung: Aus Freiburg kamen die Mäuse von unserem Kooperationspartner Dr. Florian Grahammer im Alter von 4-8 Wochen in unser Labor in Tübingen an. Die Mäuse waren auf dem C57BL/6-Hintergrund.

Zunächst wurde den Mäusen eine Akklimatisationsphase von circa einer Woche gewährt.

Die Induktion des Knockouts erfolgte durch Doxycyclin-Gabe über 14 Tage im Trinkwasser. Es wurden 2 g Doxycyclin mit 50 g Saccharose in 1 l normales Leitungswasser gelöst, um die Lösung möglichst trinkbar für die Tiere zu machen. Da Doxycyclin nicht lichtstabil ist, wurden die Trinkflaschen über die ganze Zeit mit Alufolien bedeckt. Um die Qualität der Induktionslösung bei allen Tieren gleich zu halten, wurden die Lösungen alle 3 Tage erneuert. Um Nebenwirkungen von Doxycyclin auf die Tiere nicht zu übersehen, erhielten auch die Wildtypiere die Induktions-Trinklösung.

2.2.4 Versuchsablauf der Insulinserien

Das Ziel dieser Serien war es, die Auswirkung von Insulin als mTOR-Stimulator auf das vorhandene Knockoutmodell zu untersuchen.

Tabelle 3: Versuchsaufbau der Insulinserien

Bedingungen	Metabolische Käfige	
Futter	C1314	
Trinken	Trinkwasser mit einem 1,5% Saccharose-Anteil	
Zahl der Tiere	Insgesamt 9 Wildtyp- und 9 Knockoutmäuse	
Dauer	8 Tage	
Intervention	Tag 1	Keine
	Tag 2-3	s.c. NaCl-Injektion
	Tag 4-8	s.c. Insulininjektion
Urinsammlung	Pro 24 Stunden, Beginn ab Intervention	
Blutentnahme	Nach Versuchsende an Tag 8	
Insulin	herkömmliches Lantus (insulin glargin)	
Insulindosis	2 mU/g Körpergewicht	

Die Injektion einer äquivalenten Dosis an NaCl war vor Beginn der Insulininjektion als Kontrolle notwendig, um Placeboeffekte auszuschließen.

2.2.5 Versuchsablauf der Diuretika-Serien

Dieser Versuch wurde über 4 Tage durchgeführt: Am ersten Tag wurde ein Vehikel als Kontrolle, an den restlichen 3 Tagen jeweils ein Diuretikum verabreicht. Verwendet wurden die Diuretika Furosemid, Hydrochlorothiazid und Triamteren. Nach jedem Versuchstag blieben die Mäuse für den nächsten Versuchstag in den metabolischen Käfigen. Die Herstellung der Diuretika-Injektionslösungen erfolgte direkt vor Versuchsbeginn.

Tabelle 4: Versuchsaufbau der Diuretikaserien

Bedingungen	Metabolische Käfige	
Futter	C1314	
Trinken	Leitungswasser	
Zahl der Tiere	Insgesamt 9 Wildtyp- und 9 Knockoutmäuse	
Dauer	6 Stunden	
Intervention	Beginn	<ul style="list-style-type: none"> • Blase entleeren, Trinkwasser- und Futter wiegen • Intraperitoneale Diuretika-Injektion
	Nach 6 Stunden	Blase entleeren und Urin sammeln, Trinkwasser und Futter wiegen
Urinsammlung	Über 6 Stunden ab Intervention	
Blutentnahme	nicht erforderlich	

Herstellung der Injektionslösungen:

Tabelle 5: Diuretika-Injektionslösungen

	Effektive Einzeldosis	Gewählte Dosis	Lösungsmittel
Vehikel			Ampuwa + DMSO (2,5% v/v)
Furosemid	10 µg/g KG	20 µg/g KG	Ampuwa + DMSO (2,5% v/v)
Hydrochlorothiazid	12,5 µg/g KG	20 µg/g KG	Ampuwa + DMSO (2,5% v/v)
Triamteren	3-30 µg/g KG	20 µg/g KG	Ampuwa + DMSO (5% v/v) + 40 µl 1 M HCl-Lösung

Am zweiten Versuchsdurchlauf mit doppelter Diuretika-Dosis von 40 µg/g KG wurde die doppelte Menge der Diuretika-Stammlösung verwendet. Die Diuretika-Stammlösung wurden immer zum nächsten Gebrauch bei 4-7 °C

aufbewahrt. Als Lösungsmittel wurden Ampuwa und Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Dimethylsulfoxid ist ein häufig verwendetes Lösungsmittel, das hierbei zur besseren Löslichkeit der Diuretika führt. Für eine bessere Löslichkeit des schlecht löslichen Triamteren wird zusätzlich Salzsäure verwendet.

2.2.6 Versuchsablauf der Hungerversuche

Bei den Hungerversuchen ging es darum, die Glucose-Plasmakonzentration nach 24 Stunden Futterrestriktion zu untersuchen. Hierfür wurde nicht nur der Blutzucker sondern auch das Körpergewicht und die Urinmenge gemessen. Es wurden insgesamt 2 Hungerserien durchgeführt.

Tabelle 6: Versuchsaufbau der Hungerserien

Bedingungen	Metabolische Käfige	
Futter	C1000 an Kontrolltagen	
Trinken	Trinkwasser ohne Saccharose	
Zahl der Tiere	Insgesamt 11 Wildtyp- und 12 Knockoutmäuse	
Dauer	2 Tage	
Intervention	Tag 1	Kontrolltag mit Blutzuckermessung
	Tag 2	Hungertag mit Futterrestriktion über 24 Stunden und Messung vom Blutzucker und Körpergewicht
Urinsammlung	Ende jedes Versuchstags	
Blutentnahme	An der Schwanzvene zur Blutzuckermessung	

2.2.7 Versuchsablauf der Durstversuche

Bei den Durstversuchen wurden die ausgeschiedene Urinmenge, der Elektrolythaushalt und andere Parameter untersucht. Es wurden insgesamt 5 Durstserien durchgeführt. Am Ende jeder Durstphase wurden die Tiere für mindestens 14 Tage unter Normalbedingungen gehalten, um sich ausreichend erholen zu können.

Tabelle 7: Versuchsaufbau der Durstserien

Bedingungen	Metabolische Käfige	
Futter	C1314 oder C1000	
Trinken	Trinkwasser mit/ohne Saccharose	
Dauer	Durst über 12 Stunden	
Intervention	Tag 1	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrolltag ohne Durst • Nach 24 Stunden Wasser und Futter wegnehmen und Durstversuch beginnen
	Durstversuch	Urinsammlung nach 12 Stunden Durst
Urinsammlung	Jeweils am Kontrolltag und Durstende mit der Durchführung einer Blasenmassage beim Durstversuch	
Blutentnahme	Serienabhängig	

2.3 Geräte und Messprinzipien

2.3.1 Photometer

Das photometrische Messprinzip beruht darauf, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge konstant auf eine Küvette mit Messlösung trifft, das abhängig von der zu messenden Lösung zum Teil hier absorbiert wird, während der Teil, der die Lösung durchdringt, in einer Zelle gemessen wird. Anhand der Absorption kann auf die Konzentration des Lösungsinhaltes geschlossen werden⁷⁵. In der Arbeit das ‚Thermo Bio Mate3‘ (ThermoScientific) als Photometer verwendet.

2.3.2 Flammenphotometer: Natrium-, Kalium- und Kalziummessung

Allgemein: Durch dieses Gerät (Eppendorf EFOX 5057) können die verschiedenen Elektrolyte Natrium, Kalium und Kalzium einfach, schnell und präzise gemessen werden. Zudem gilt diese Methode als nicht aufwendig.

Messprinzip: Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass unterschiedliche Atome unterschiedlich angeregt werden, und somit sendet jedes verschiedene Atom bei Erregung eine charakteristische Lichtfarbe, dessen Intensität auch mit

der Zahl der vorhandenen Atome korreliert; d.h. je mehr Element vorhanden ist, desto stärker ist die Farbe. Dieses Prinzip macht sich das Flammenphotometer zunutze, indem es eine nicht leuchtende Flamme produziert, die auf die zu messende Lösung trifft und sie erregt, woraufhin ein Lichtgemisch unterschiedlicher Wellenlängen entsteht, das durch ein Filter in die einzelnen Wellenlängen filtriert wird. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man oft die Proben hoch und runter verdünnen muss, bis man in den sensibelsten Messbereich kommt. Dieses Verdünnen kann deshalb sehr aufwendig sein, insbesondere bei sehr konzentrierten Urinproben⁷⁶.

Durchführung:

1. Gerät einschalten, abwarten bis es Messungsbereit ist und Art der Probe (Urin oder Plasma) auswählen.
2. Standard und Leerwert abhängig von der Art der Probe in das Gerät stellen. (Mischprozedere ist ausführlichen Gerätprotokollen zu entnehmen)
3. Proben in Eppendorfgefäßen vorlegen.

Auswertung: Bei der Auswertung ist zuerst zu beachten, ob die Ergebnisse im Messbereich liegen. Ist das nicht der Fall, muss die Messung mit einer anderen Verdünnung wiederholt werden. Die einzelnen gemessenen Werte müssen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Die Normalwerte im Mäusenplasma lauten: Na^+ 145 ± 5 mmol/l, K^+ $4,5 \pm 1$ mmol/l, Ca^{2+} $2,2 \pm 0,2$ mmol/l.

2.3.3 Fluoreszenzmessung

Allgemein und Messprinzip:

Fluoreszierende Stoffe sind Stoffe, die bei Lichteinfall durch Lichtabsorption angeregt werden, woraufhin sie Licht mit einer niedrigeren Energie aussenden. Dieses emittierte Licht kann abgefangen und detektiert werden. Seine gemessene Intensität ist direkt proportional zur Konzentration der Fluoreszenzsubstanz. Wichtig beim Fluorometer ist, dass das emittierte Licht senkrecht zum einfallenden Licht steht, damit nur dieses und nicht das einfallende Licht detektiert wird. In dieser Arbeit wurden zwei Fluoreszenzsubstanzen verwendet: Zum einen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

gekoppelt an Inulin zur der GFR-Messung, zum anderen AB580 bei der Albuminurienmessung^{77,78}.

2.3.4 ELISA

Allgemein und Testprinzip: ELISA ist ein Testverfahren, das heutzutage ubiquitär Forschungs- oder Kliniklaboratorien angewendet wird. Der Test dient dazu, Proteine (Albumin, Antikörper, Hormone etc.) sehr sensitiv und spezifisch nachzuweisen. Das Prinzip basiert auf den Nachweis durch antikörpergekoppelte Enzymreaktion. Dabei (bei der direkten Methode) bindet ein enzymgekoppelter Antikörper an das Antigen. Nach Gabe von dem Substrat löst sich eine Reaktion aus, durch die ein Farbumschlag entsteht, dessen Intensität photometrisch gemessen werden kann und Rückschluss auf die Konzentration des nachgewiesenen Antigens gibt⁷⁹.

Sandwich-ELISA: Diese ELISA-Methode weist das Antigen sensitiver als die einfache direkte Methode nach. Es werden zwei antigenspezifische Antikörper benötigt, die an zwei unterschiedliche Epitopen binden, sodass das Antigen von zwei Seiten, wie ein Sandwich, von Antikörpern umgeben wird. Der erste Antikörper ist auf der Mikrotiterplatte gebunden und hat die Aufgabe, das Antigen zu binden (capture antibody). Der zweite Antikörper ist dagegen der Antikörper, der enzymgekoppelt ist und zum eigentlichen Antigennachweis dient (detection antibody)⁷⁹.

2.4 Verwendete Kits

2.4.1 Phosphat

Messprinzip: Anorganisches Phosphat kann bei Vorhandensein von Ammoniummolybdat in schwefelsaurer Lösung einen Komplex bilden, der photometrisch gemessen werden kann und dessen Absorptionsmaximum bei 340 nm liegt. Diese Reaktion lautet:

Phosphat + Ammoniummolybdat + Schwefelsäure → Phosphormolybdat-Komplex.

Durchführung: Nach vorbereiten und mischen von je Probe, Standard und Blank mit dem Arbeitsreagenz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach erfolgte die photometrische Messung bei 340 nm. Abhängig vom Versuch und der Urinkonzentration wurden die Urinproben unterschiedlich verdünnt gemessen.

Tabelle 8: Pipettierschema der Phosphatmessung

Probe	Urin (DF 1/10/15/20/30) Plasma (unverdünnt)	300 µl Reagenz + 3 µl Probe
Standard	1.29 mmol/l	300 µl Reagenz + 3 µl Standard
Blank	Ampuwa	300 µl Reagenz + 3 µl ddH ₂ O
Reagenz	Ammoniummolybdat: 12.2 mmol/l; Schwefelsäure: 2.2 mmol/l	

Auswertung:

$$C_{\text{Phosphat}}[\text{mmol/l}] = ((\text{Abs}_{\text{Probe}} - \text{Abs}_{\text{Blank}}) / (\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})) \times 1,29 [\text{mmol/l}] \times \text{DF}$$

Der Bereich, in dem die Messung im linearen Bereich der Extinktionskurve liegt, lag bei Werten unter 0,6. Proben einer Extinktion über 0,6 mussten daher herunterverdünnt werden.

2.4.2 Magnesium

Messprinzip: In alkalischer Lösung bilden die Magnesiumionen mit Xylidylblau einen roten Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 520 nm liegt. Die Intensität dieser Farbe korreliert mit der Konzentration der Magnesiumionen. Um Kreuzreaktionen mit Kalzium zu verhindern enthält diese alkalische Lösung zudem EGTA, das mit Kalzium Komplexe bildet.

Durchführung:

Die Probe, der Standard und der Blank wurden mit dem Reagenz gemischt und danach 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Extinktionsmessung im Photometer gegen den Leerwert. Abhängig von der Konzentration der Urinprobe wurden die Proben unterschiedlich verdünnt.

Tabelle 9: Pipettierschema der Magnesiummessung

Probe	Urin (Primär DF 10/30) Plasma(unverdünnt)	300 µl Reagenz + 3 µl Probe
Standard	0,82 mmol/l	300 µl Reagenz + 3 µl Standard
Blank	Ampuwa	300 µl Reagenz + 3 µl ddH ₂ O
Reagenz	Xylidylblau 1 mmol/l + Trispuffer, pH=11, 250 mmol/l	

Auswertung: Zur Datenauswertung war bei der Magnesiummessung eine Standardkurve notwendig, durch die der lineare Messbereich dieses Tests ermittelt wurde. Die Standardkurve wurde durch eine Standardreihe (Standardkonzentrationen: 0,82/1,64/2,46/3,28 mmol/l) ermittelt. Die Standardreihe wurde parallel zu jeder Magnesiummessung durchgeführt.

2.4.3 Harnstoff

Allgemein: Der stickstoffhaltige Harnstoff ist das Abbauprodukt der Aminosäuren in unserem Körper. Ein erhöhter Harnstoffspiegel im Blut wird Hyperurämie oder Azotämie genannt und tritt beispielsweise bei Niereninsuffizienz auf. Harnstoff ist neben Natrium der Hauptbestandteil des Urins, der für die Urinkonzentrierung verantwortlich ist. Der proximale Tubulus ist für Harnstoff durchlässig und es werden hier etwa 50% des filtrierten Harnstoffes resorbiert. Hingegen ist der aufsteigende Teil der Henle-Schleife bis zum Beginn des Sammelrohrs für Harnstoff undurchlässig. Harnstoff zirkuliert nach Resorption wieder ins Tubulumen, entweder durch aktive Sekretion im proximalen Tubulus oder durch Diffusion im absteigenden Teil der Henle Schleife bei hohem Harnstoffgradienten im Interstitium. Dies kann das Vorhandensein von 100% des Harnstoffs im distalen Tubulus erklären. Durch diese Zirkulation und die daraus ergebene hohe Harnstoffkonzentration im distalen Tubulus ist Harnstoff hier die hauptsächliche Osmolalitätskomponente, die für die Harnkonzentrierung durch Wasserentzug sorgt. Harnstoff ist infolgedessen einer der wichtigsten Indikatoren für Nierenschädigung im Sinne eines akuten Funktionsversagens oder einer chronischen Insuffizienz^{69,71}.

Testprinzip: Der Test beruht auf der vollenzymatischen Umwandlung von Harnstoff. Diese Reaktion besteht aus zwei Schritten, der erste wird durch das Enzym Urease, der zweite durch Glutamatdehydrogenase (GLDH) katalysiert.



Durchführung:

Nach dem Mischen von Probe, Blank und Standard wurde eine sofortige Extinktionsmessung (A1) bei 340 nm und eine weitere Messung (A2) nach 8 Minuten durchgeführt; wobei A1>A2 war.

Tabelle 10: Pipettierschema der Harnstoffmessung

Probe	Plasma(unverdünnt)	300 µl Arbeitsreagenz + 3 µl Probe
Standard	6,65 mmol/l, 40 mg/dl	300µl Arbeitsreagenz +3 µl Standard
Blank	Ampuwa	300 µl Arbeitsreagenz + 3 µl ddH ₂ O
Arbeitsreagenz	lösen von 16 ml Pufferlösung (aus Ketoglutarat, NADH, ADP und EDTA) in eine Enzymflasche (mit Urease und GLDH als Pulver)	

Auswertung: Der lineare Bereich der gemessenen Absorptionen lag bei Extinktionswerten zwischen 0,25 und 0,8. Dementsprechend mussten alle Proben mit Extinktionswerten > 0,8 verdünnt werden, bis die Absorption im linearen Bereich lag.

Die endgültige Harnstoffkonzentration ist wie folgt zu berechnen:

$$\Delta = (A2) - (A1)$$

$$C_{\text{Harnstoff}} [\text{mg/dl}] = ((\Delta_{\text{Probe}} - \Delta_{\text{Blank}}) / (\Delta_{\text{Standard}} - \Delta_{\text{Blank}})) \times C_{\text{Standard}} \times \text{DF}$$

2.4.4 Kreatinin

Allgemein: Kreatinin ist ein Stoff, der im Körper endogen im Rahmen des Muskelstoffwechsels entsteht. Es entsteht als Abbauprodukt aus Kreatin und Kreatinphosphat. Kreatinin wird im Glomerulus frei filtriert, im Tubulus nur bei hohen Plasmakonzentrationen sezerniert, jedoch nicht rückresorbiert. Deshalb eignet sich Kreatinin als Parameter zur Abschätzung der Nierenfunktion. Es kann sowohl zur Diagnostik als auch zur Verlaufskontrolle der akuten oder chronischen Niereninsuffizienz verwendet werden. Wichtig ist zu beachten,

dass Kreatinin von der Muskelmasse und vom Alter abhängig ist. Da die Konzentration harnpflichtiger Substanzen im Urin stark volumenabhängig ist, wird die Kreatininkonzentration im Urin häufig als Bezugsgröße verwendet^{69,80}.

Testprinzip: In alkalischer Lösung bildet Kreatinin mit Pikrinsäure einen gelben Komplex. Die Farbintensität dieses Komplexes ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration und kann photometrisch gemessen werden. Die Reaktion lautet:



Durchführung: Nach dem Mischen der Reagenzien mit der jeweiligen Probe erfolgte eine sofortige Absorptionsmessung (A1) bei 492 nm und eine weitere Messung nach exakt 8 min (A2). Der lineare Bereich der gemessenen Absorptionen lag bei Werten von < 0,6. Demnach mussten alle Proben mit Extinktionswerten über 0,6 verdünnt werden, bis die Absorption im linearen Bereich lag. Umgekehrt mussten alle Proben mit Extinktionswerten unter dem Blankwert konzentriert werden.

Tabelle 11: Pipettierschema der Kreatininmessung

Probe	Urin (DF 10/15/20/30)	200 µl Arbeitsreagenz + 10 µl Probe
Standard	177 µmol/l, 2 mg/dl	200 µl Arbeitsreagenz + 10µl Standard
Blank	Ampuwa	200 µl Arbeitsreagenz + 10 µl ddH ₂ O
Arbeitsreagenz	Mischen von Pikrinsäure und Natronlauge (als alkalische Lösung) im Verhältnis 1:1 nach Bedarf.	

Auswertung: Die Berechnung der Kreatininkonzentration lief wie folgt ab:

$$\Delta = A1 - A2$$

$$C_{\text{kreatinin}}[\text{mg/dl}] = ((\Delta_{\text{Probe}} - \Delta_{\text{blank}}) / (\Delta_{\text{standard}} - \Delta_{\text{blank}})) \times C_{\text{Standard}} \times \text{DF}$$

2.4.5 Eiweiss

Testprinzip: Proteine bilden mit Pyrogallolrot in saurer Lösung und beim Vorhandensein von Molybdat-Ionen einen blauen Komplex, dessen Farbintensität photometrisch bei 600 nm gemessen werden kann. Dieser Test ist nur in der Lage, die Gesamteiweißmenge im Urin zu bestimmen.

Durchführung: Probe, Standard und Blank wurden mit dem Reagenz in der Messküvetten gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung im Photometer bei 600 nm.

Tabelle 12: Pipettierschema der Eiweißmessung

Probe	Urin (unverdünnt)	300 µl Reagenz + 3 µl Probe
Standard	Eiweiß, 1300 mg/l	300 µl Reagenz + 3 µl Standard
Blank	Ampuwa	300 µl Reagenz + 3 µl ddH ₂ O
Reagenz	besteht aus Pyrogallolrot und mehreren anderen Bestandteilen	

Auswertung: Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Anlehnung an eine Standardkurve mit einer daraus ermittelten quadratischen Funktion.

2.4.6 Glucose

Testprinzip: Der Test beruht auf der sogenannten Trinder-Reaktion. Diese besteht aus zwei Reaktionsschritten, an deren Ende ein rotgefärbter Chinin entsteht, dessen Farbintensität mit der Glucosekonzentration korreliert und photometrisch gemessen werden kann. Der erste Reaktionsschritt wird durch Glucose-Oxidase, der zweite durch Peroxidase katalysiert. Die Trinder-Reaktion lautet:

1. $\text{Glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Gluconsäure} + \text{H}_2\text{O}_2$
2. $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Phenol} + 4\text{-Amino-antipyrin} \rightarrow \text{Chinoniminfarbstoff} + 4\text{H}_2\text{O}$

Durchführung: Nach dem Pipettieren wurden die Messküvetten gevortext und dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Danach fand die photometrische Messung bei 546nm statt.

Tabelle 13: Pipettierschema der Glucosemessung

Probe	Urin (DF 1/5/10/15/20/30)	200 µl Reagenz + 5 µl Probe
Standard	5,5 mmol/l, 100 mg/dl	200 µl Reagenz + 5 µl Standard
Blank	Ampuwa	200 µl Reagenz + 5 µl ddH ₂ O
Reagenz	ist gebrauchsfertig und besteht aus allen Bestandteilen, die für die Reaktion notwendig sind(4-Amino-antipyrin, Phosphatpuffer etc.)	

Auswertung: Die Berechnung der Glucosekonzentration aus der gemessenen Absorption fand anhand folgender Formel statt:

$$C_{\text{Glucose}}[\text{mg/dl}] = \frac{(\text{Abs}_{\text{Probe}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})}{(\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})} \times 100 \times \text{DF}$$

Der lineare Bereich der gemessenen Absorptionen wurde aus einer parallel durchgeführten Standardreihe ermittelt und lag bei Absorptionswerten von <0,6. Alle Werte über 0,6 mussten daher herunterverdünnt werden. Umgekehrt mussten alle Absorptionswerte unter dem Blankwert konzentriert werden, dies war insbesondere bei stark verdünntem Urin bei polyurischen Mäusen der Fall.

2.5 Albumin-Bestimmung

Testprinzip: Die Messung erfolgte mit dem ‚Albumin Blue 580 Fluorescent Assay Kit‘ (progen, Freiburg). AB580 ist ein anionischer Farbstoff, der sehr spezifisch an Albumin bindet ohne mit Glucose oder anderen Proteinen zu interferieren. Die Intensität des entstandenen Fluoreszenzsignals korreliert direkt mit der Albuminkonzentration⁸¹.

Durchführung: Probe (Urin), Standard und Blank wurden in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und im Fluoreszenzgerät in counts pro sekunde (cpm) gemessen. Die Anregung (Exzitation) wurde bei 590 nm und die Emission bei 635 nm abgelesen. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde zusätzlich zur Probenmessung mit folgenden Standardkonzentrationen durchgeführt: 0/2/30/100 und 200 mg/l.

Tabelle 14: Pipettierschema der Albuminmessung

Probe	Urin (unverdünnt) Plasma	150 µl Reagenz + 25 µl Probe
Standard	Standardreihe	150 µl Reagenz + 25 µl Standard
Blank	Ampuwa	150 µl Reagenz + 25 µl ddH ₂ O
Reagenz	Besteht aus AB580 und Verdünnungslösung (MOPS, NaCl, EDTA, ddH ₂ O, Propanolol)	

Auswertung: Nach Erstellen einer Standardkurve mit murinem Albumin (Sigma) erfolgte die Auswertung der Messergebnisse im linearen Bereich der Standardkurve. Durch den Bezug des errechneten Albuminkonzentration auf

die Kreatininkonzentration derselben Urinprobe ergab sich die ausgeschiedene Albuminmenge.

2.6 Parathormon-Bestimmung

Testprinzip: Der Test beruht auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Hierbei wird die biologisch aktive intakte Form von Parathormon 1-84 in Mausplasma gemessen. Der capture-Antikörper ist gegen den C-Terminus des Hormons gerichtet und zur Signalverstärkung an Biotin gebunden. Der Detektionsantikörper bindet am N-Terminus des Hormons und ist mit der Meerrettichperoxidase (HRP) als Enzym gekoppelt. Als HRP-Substrat wird Tetramethylbenzidine mit Wasserstoffperoxid hinzugegeben.

1. Je 20 µl Probe (Plasma), Standard und Blank in die Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
2. 50 µl der Arbeitslösung, bestehend aus äquivalenten Mengen an biotinmarkierten Capture-Antikörpern und HRP-konjugierten Detektionsantikörpern, ebenso in die Wells pipettieren.
3. Die Mikrotiterplatte mit Verschlussdeckel und Aluminiumfolie abdecken, dann die Platte bei gleichzeitiger horizontaler Rotation von 180-220 rpm für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Entfernen des Well-Inhalts durch Waschen und Aspirieren.
5. 100 µl HRP-Substrat in jedes Well pipettieren. Danach mit Verschlussdeckel und Aluminiumfolie noch einmal abdecken und für 30 Minuten bei 180-220 rpm und Raumtemperatur inkubieren.
6. Deckel und Aluminiumfolie entfernen und die Absorption bei 620 nm gegen den 0 pg/ml Standard als Blank innerhalb von 5 Minuten messen.
7. 100 µl ELISA-Stop-Lösung in jedes Well pipettieren und danach für 1 Minute bei 180-220 rpm inkubieren.
8. Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 Minuten gegen einen Leerwert aus 100 µl HRP-Substrat und 100 µl ELISA-Stop-Lösung messen.

Auswertung: Es wurde eine Verdünnungsreihe mehrerer Standards mit den folgenden Konzentrationen durchgeführt: 0/32/102/336/1045 pg/ml. Anhand der erstellten Kurve wurde der lineare Messbereich festgestellt. In diesem Bereich

sollten die Probenkonzentrationen liegen; dementsprechend wurden die Proben verdünnt.

2.7 Aldosteron-Bestimmung

Die Bestimmung von Aldosteron wurde mittels Radioimmunassay durchgeführt. Dieses Verfahren ähnelt dem ELISA-Prinzip mit dem Unterschied, dass der Detektionsantikörper statt an ein Enzym an einen radioaktiven Tracer gekoppelt wird, dessen Radioaktivität mit der Menge des zu messenden Antigens korreliert⁸². Benötigt wurde von Proben bzw. Standards je 10 µl und 500 µl Tracer. Das Plasma wurde unverdünnt gemessen.

2.8 Aminosäuren-Bestimmung

Die Messung der Aminosäuren sowohl im Plasma als auch im Urin erfolgte mit dem Aminosäureanalysator Biochrom 30 Plus, dessen Funktionsweise auf das Prinzip der Ionenaustauscher-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (gekürzt Ionenaustauscher-HPLC) mit Ninhydrin-Nachsäulenreaktion beruht. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren, bei dem ein Gemisch durch verschiedene Trennmachanismen (Hier durch Ionenaustausch) in seinen einzelnen Substanzen getrennt wird. Diese Substanzen werden mittel eines Detektors registriert⁸³. Es wurden jeweils 50 µl Plasma und Urin benötigt. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 570/440 nm statt. Die Aminosäuren-Bestimmung erfolgten durch den Kooperationspartner Prof. Jörn Sass aus dem Kinderspital Zürich.

2.9 GFR-Bestimmung durch FITC-Inulin

Allgemein: Die glomeruläre Filtrationsrate ist definiert als die Menge an Primärharn, die pro Zeiteinheit von allen Glomeruli filtriert wird. Sie beträgt beim jungen gesunden Menschen ca. 120 ml/min, variiert jedoch stark und ist abhängig von Alter und Tageszeit. Da die GFR der aussagekräftigste Parameter ist, der die Nierenfunktion widerspiegelt, ist ihre Bestimmung sowohl für den klinischen Alltag als auch für die Forschung von größter Bedeutung,

wenn es um die Beurteilung der Nierenfunktion geht, beispielsweise im Falle einer Niereninsuffizienz. Für die Bestimmung der GFR haben sich 2 Methoden bewährt: Im klinischen Alltag ist die Kreatinin-Clearance die Methode der ersten Wahl, da Kreatinin als endogenes Stoffwechselprodukt vorliegt und einfach zu messen ist. Die andere Methode ist die Inulin-Clearance, bei der man Inulin exogen injiziert und dessen Konzentrationsabfall im Blut über die Zeit misst; diese Methode ist aufwendig und wird deshalb nur noch in bestimmten Fällen gebraucht (z.B. bei Messstörungen der Kreatinin-Clearance). Anhand der GFR kann die Niereninsuffizienz in 5 Stadien eingeteilt werden (KDOQI-Einteilung)⁸⁴.

Messprinzip: Inulin ist ein wasserlösliches Zuckergemisch, das in vielen Nahrungsmitteln enthalten ist, und zu medizinischen Zwecken genutzt werden kann. Seine Eigenschaften ermöglichen eine genaue Messung der GFR *in vivo*. Wenn Inulin in den Blutkreislauf appliziert wird, hat es die Eigenschaft, nicht in die Zelle einzudringen, sondern im Extrazellulärraum zu verbleiben. In der Niere wird Inulin im Glomerulus frei filtriert, im Tubulus weder rückresorbiert noch sezerniert. Somit kann man durch die direkte intravenöse Applikation von Inulin und die Bestimmung seiner Ausscheidung im Urin über die Zeit die Glomeruläre Filtrationsrate der Niere genau bestimmen.

Das applizierte Inulin ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert, dessen Plasmakonzentration im Fluoreszenzphotometer gemessen werden kann.

Durchführung:

1. Intravenöse Injektion von circa 50 µl FITC-Inulin (70 mg/ml, Sigma) in den retrobulbären Venenplexus
2. Um die injizierte Dosis genau zu bestimmen, wird die Spritze vor und nach Injektion gewogen.
3. Blutentnahme an der Schwanzvene 3,7,10,15,35,55,75 min nach Injektion.
4. Messung am Fluoreszenz-Photometer: Exzitation bei 485 nm und Emission bei 535 nm. Die Proben sollen unverdünnt nach folgendem Schema gemessen werden:

Probe(Plasma)	97 µl PBS (pH = 7,4) + 3 µl Probe
Standard	97 µl PBS (pH = 7,4) + 3 µl Standard
Blank	97 µl PBS (pH = 7,4) + 3 µl inulinfreies Plasma

Auswertung: Zuerst wird für jede Probe ein Diagramm mit der Zeit in Minuten auf der X-Achse und den gemessenen Counts auf der Y-Achse erstellt. Anhand der sich daraus ergebenden Kurve und der injizierten Inulindosis kann die GFR bestimmt werden.

2.10 Glucose-Toleranztest

Allgemein und Prinzip: Durch diesen Test konnten die Knockout-Mäuse mit einer hohen Menge an Glucose belastet werden, um herauszufinden, wie sie darauf reagieren und ob ihre Reaktion von den Wildtyp-Tieren auf irgendeiner Art und Weise abweicht.

Durchführung:

1. Gewichtsadaptierte intraperitoneale Glucoseinjektion mit der Dosierung 3 mg/g Körpergewicht.
2. Nach Injektion Glucosemessung mit einem herkömmlichen Glucosemessgerät (CONTOUR, BAYER®) zu folgenden Zeitpunkten nach Injektion: 0, 15, 30, 60, 120, 180 min.

Auswertung: Für jeden Zeitpunkt wurde je ein Mittelwert für Wildtyp- und Knockout-Tiere berechnet. Die Mittelwerte der beiden Mausgruppen wurde jeweils in einer Kurve dargestellt, um einen eventuellen Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen. Die erhaltene Kurve stellt zunächst den Teil der Absorption aus dem Darm in die Blutbahn und anschließend den Teil der Ausscheidung durch die Niere dar.

2.11 Insulin-Toleranztest

Allgemein: Im Rahmen der Untersuchung des Glucosestoffwechsels in diesem Tiermodell war es insbesondere bei auffälligem Glucosetoleranztest sinnvoll zu wissen, wie die Mäuse auf einen hohen Insulinspiegel reagieren. Der Test wurde mit zwei unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt, weil die Tiere unter der ersten Dosis stark hypoglykämisch wurden.

Durchführung:

1. Intraperitoneale gewichtsadaptierte Insulininjektion mit der gewollten Dosis: einmal Test mit 1 mU/g Körpergewicht und einmal mit 0,66 mU/g KG durchführen.
2. Nach Injektion Glucosemessung mit einem Glucosemessgerät (CONTOUR, BAYER®) zu folgenden Zeitpunkten nach der Injektion: 0,15,30,60,120 min.

Auswertung: Ebenso wie bei dem Glucosetoleranztest wurden auch hier die Mittelwerte an jedem gemessenen Zeitpunkt für je Knockout- und Wildtyp-Mäuse berechnet. Die Mittelwerte der beiden Gruppen wurden in einer Diagramm in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Der Vergleich der beiden Kurven miteinander konnte bei gleich applizierter Insulindosis Rückschluss darauf geben, wie hoch der Insulinspiegel im Blut zu den jeweiligen Zeitpunkten bei den verschiedenen Tieren war. Hierbei handelt es sich nicht um eine quantitative Messung, aber der Test lässt eine fundierte wissenschaftliche Schätzung zu. Dies könnte durch eine Messung des Insulin-Plasmaspiegels verifiziert werden, was aus technischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich war.

2.12 Osmolalitätsmessung

Messprinzip: Die Osmolalitätsmessung beruht auf dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung. Für die Messung wurde ein automatisches Osmometer verwendet (Osmometer Automatic, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin).

Durchführung:

1. Osmometer für ca. 5-10 Minuten warmlaufen lassen
2. Gerät kalibrieren: zuerst 150 µl Ampuwa als Leerwert dann 150 µl Eichlösung 400 osmol/kg als Standard geben.
3. Nach erfolgreicher Eichung mit der Probenmessung beginnen: dafür je 50 µl Probe (Plasma) + 100 µl Ampuwa vorlegen und messen.

Da die Osmolalitätsmessung einen kleinen Messbereich hat und sie gleichzeitig für Störfaktoren sehr anfällig ist, war es wichtig darauf zu achten, die

Messglassonde nach jeder Messung gründlich mit destilliertem Wasser zu reinigen. Darüber hinaus war es auch bei Messfehlern notwendig, das Gerät mit der Eichlösung noch einmal für die nächste Messung zu kalibrieren. Um die Tiere zu schonen und dennoch das erforderliche Messvolumen von 150 μl zu erhalten, wurden nur kleine Plasmaproben entnommen und mit Ampuva verdünnt. Eine weitere Osmolalitätsmessung war bei Opferung der Tiere problemlos möglich.

Auswertung: Da die vom Gerät angezeigten Werte bereits in der gewollten Einheit osmol/kg sind, war nur noch erforderlich, das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren, um so den Osmolalitätswert des gemessenen Plasmas zu erhalten.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Essenaufnahme

3.1.1 Kontrollbedingungen vor und nach Induktion

Unmittelbar bei Beginn der ersten Serie war bereits auffällig, dass die Knockoutmäuse im Gegensatz zum Wildtyp ein niedrigeres Gewicht aufwiesen. Während vor Knockoutinduktion kein signifikanter Gewichtsunterschied bestand, war dieser nach Induktion des Knockouts mit einem p-Wert von 0,0002 hochsignifikant geworden. Hinsichtlich der absoluten Nahrungsaufnahme konnte zwischen den beiden Tiergruppen keine Differenz gefunden werden. Bei Bezug der aufgenommenen Futtermenge auf das Gewicht des einzelnen Tieres zeigte sich sogar, dass die Knockout-Mäuse mehr Futter gefressen haben als die Wildtyp-Tiere.

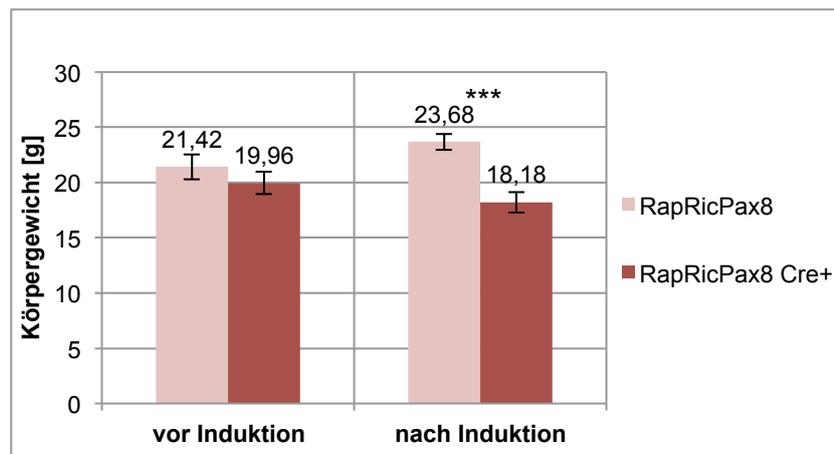


Abbildung 7: Körpergewicht in Gramm vor und nach Knockoutinduktion
 Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 24. ***: p<0,0005.

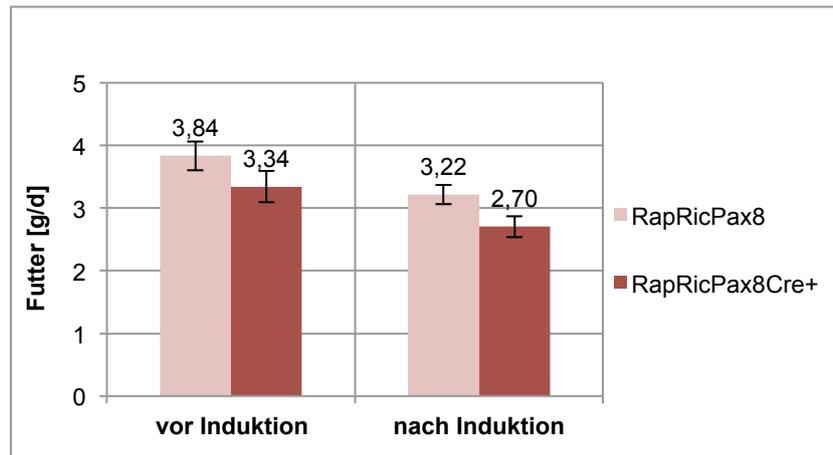


Abbildung 8: Nahrungsaufnahme Gramm pro Tag

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Kein signifikanter Unterschied. n (vor Induktion) = 6, n (nach Induktion) = 24.

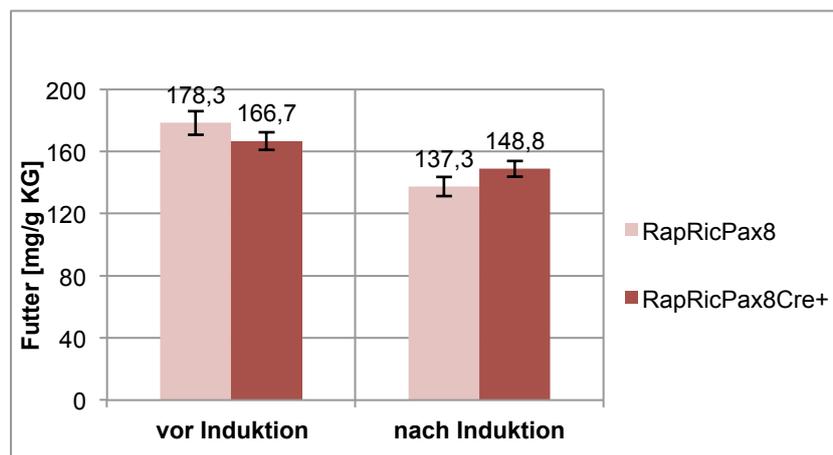


Abbildung 9: Nahrungsaufnahme in mg/g Körpergewicht

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Kein signifikanter Unterschied n (vor Induktion) = 6, n (nach Induktion) = 24.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es sinnvoll, den Gewichtsverlauf über längere Zeit vor, während und nach der Induktion des Knockouts zu beobachten, damit abhängig vom Ausgangsgewicht herausgefunden werden konnte, zu welchem Zeitpunkt es zur Gewichtsabnahme kam.

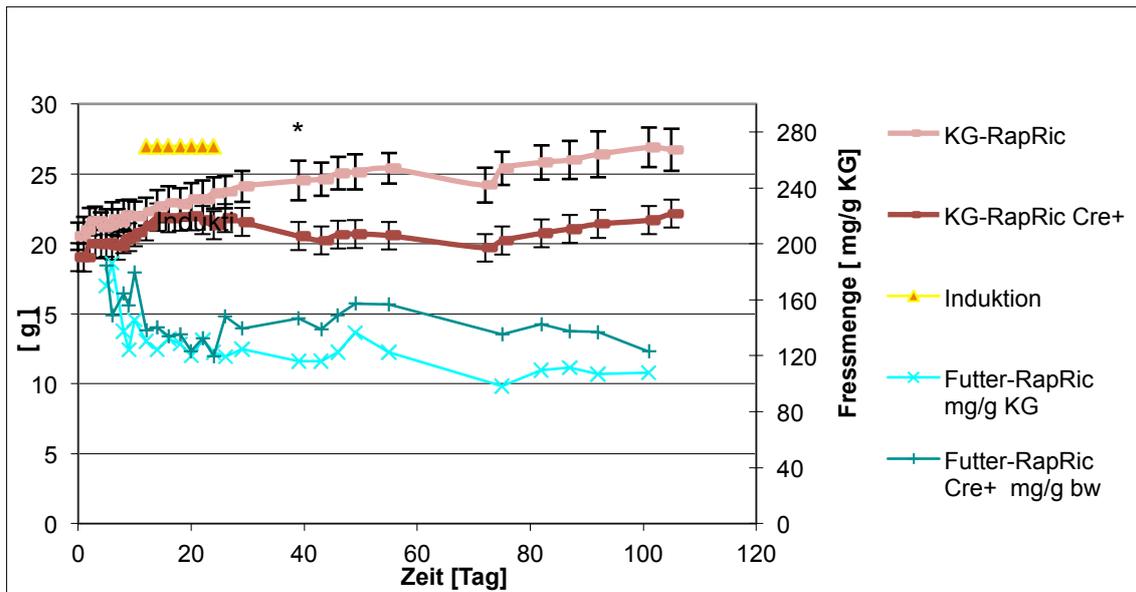


Abbildung 10: Gewicht und Nahrungsaufnahme im Verlauf

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM vor, während und nach Induktion des Knockouts sowohl des Körpergewichts in Gramm als der Futtermenge in mg/g KG. Induktion erfolgte zwischen Tag 12-24. Ab dem 39 Tag bestand ein signifikanter Gewichtsunterschied: *: $p < 0,05$. n (Wildtyp; Knockout) = 7.

Wie im obigen Diagramm zu sehen ist, war das Gewicht der beiden Tiergruppen vor Knockoutinduktion gleich und wies keinen signifikanten Unterschied auf. Unmittelbar nach der 14-tägigen Induktion konnte jedoch beobachtet werden, wie sich die beiden Gewichtskurven auseinander bewegten, bis sie ab dem 39 Tag (bereits 15 Tage nach Induktionsende) einen stabilen signifikanten Gewichtsunterschied erreichten. Darüber hinaus ist dem Diagramm auch zu entnehmen, dass die Futtermenge mg/g KG beim Knockout trotz der Gewichtsabnahme leicht höher als beim Wildtyp war.

Weil dieser Gewichtsunterschied bei den RapRic-Doppelknockout-Mäusen eindeutig auffällig war, war es sinnvoll, das Gewicht bei Einzelknockout-Tieren (RapPax8, RicPax8) wie beim Doppelknockout über die Zeit zu kontrollieren, um einen möglichen Effekt eines Einzelgens auf das Gewicht nicht zu übersehen. Unter denselben Bedingungen wurden dementsprechend dieselben Beobachtungen, einmal mit Raptor-Pax8-Tieren und einmal mit Rictor-Pax8-Tieren als Monoknockout, durchgeführt. Das Ergebnis ist im folgenden Diagramm dargestellt.

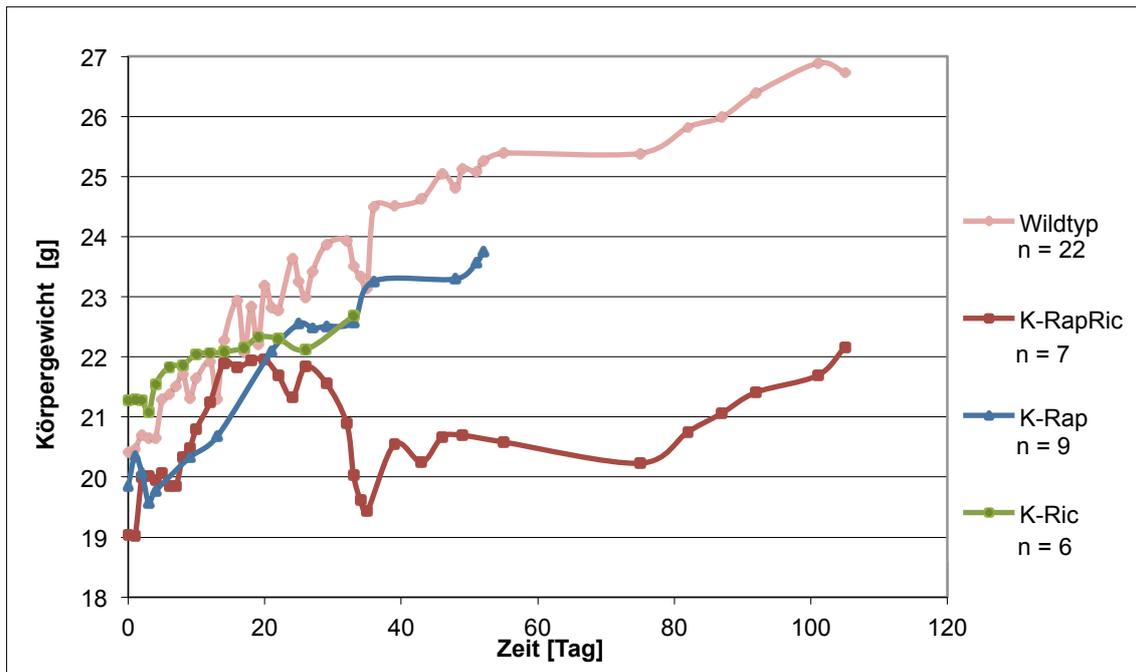


Abbildung 11: Gewichtsverlauf der verschiedenen Genotypen

Dargestellt ist der Mittelwert in Gramm in Abhängigkeit von der Zeit. Induktionsbeginn variiert (RapRic:12d/Rap:13d/Ric:6d). Gleicher Induktionsintervall von 14 Tagen. K heißt Knockout.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, besteht nach Induktionsende ausschließlich beim Doppelknockout ein signifikanter Gewichtsunterschied, während dieser Gewichtsunterschied bei keinem der beiden Einzelknockout-Modelle auftritt. Darüber hinaus bleibt dieser Unterschied im Verlauf trotz Wachstum der Tiere gleichförmig bestehen. Da die aufgenommenen Nahrungsmengen bei den Einzelknockouts keinen Unterschied gezeigt haben, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung dieser im Diagramm verzichtet.

3.1.2 Diuretikaserien

Obwohl es bei den Diuretikaserien hauptsächlich um die Beobachtung der Urinmenge ging, wurde das Gewicht ebenfalls kontrolliert, um ein auffälliges Verhalten des Gewichtes unter der Diuretikagabe nicht zu übersehen. 6 Stunden nach der ersten Gabe von Furosemid und Hydrochlorothiazid trat ein signifikanter Gewichtsverlust auf; bei der Vehikel- und Triamterengabe war verhielt sich das Gewicht unauffällig. Nach der zweiten Diuretikagabe mit der doppelten Dosierung blieb der Gewichtsverlust bei der Hydrochlorthiazid-Gabe

bestehen. Hierzu war dieser bei den Knockout-Tieren auch nach doppeltdosierter Gabe von Vehikel und Triamteren signifikant höher. Der Gewichtsverlust nach Furosemidgabe blieb hingegen nun unauffällig.

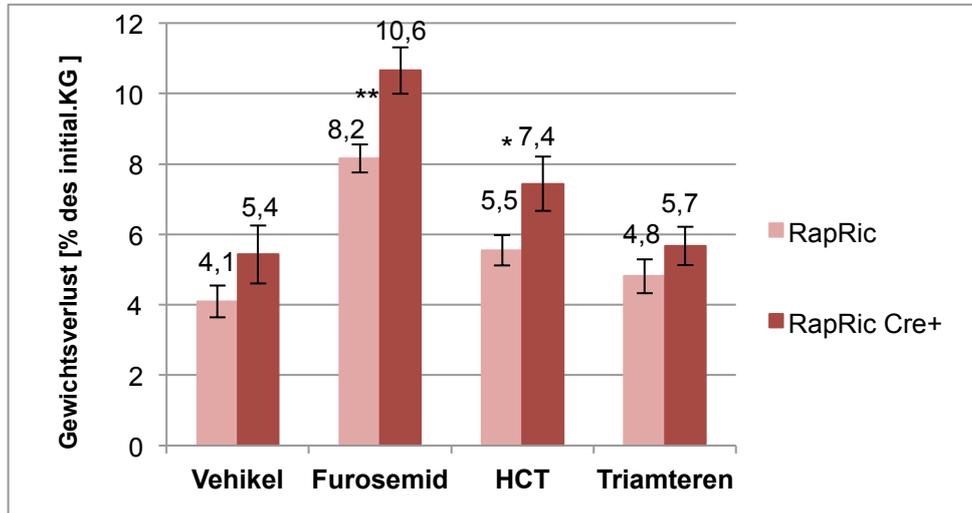


Abbildung 12: Gewichtsverlust nach Diuretikagabe

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Gewichtsverlustes zum initialen Gewicht vor der Diuretikagabe. n (Wildtyp) = 10, n (Knockout) = 8. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$.

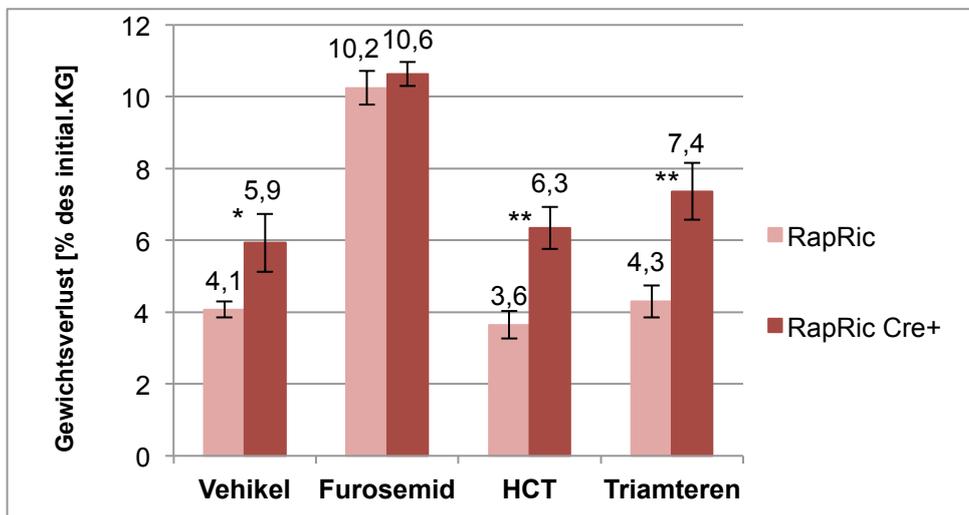


Abbildung 13: Gewichtsverlust nach doppeltdosierter Diuretikagabe

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Gewichtsverlustes zum initialen Gewicht vor der Diuretikagabe. n (Wildtyp) = 10, n (Knockout) = 8. $p < 0,05$, **: $p < 0,005$.

3.1.3 Hungerserien

Die Hungerversuche wurden mit dem primären Ziel durchgeführt, den Glucosestoffwechsel näher zu betrachten. Um ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich des Gewichts zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Tieren festzustellen –besonderes bei insgesamt gestörtem Energiehaushalt nach 24 Stunden Fasten –war eine Gewichtskontrolle nötig.

Nach 24 Stunden Futterrestriktion zeigte sich eine Gewichtsabnahme von 2-3 Gramm sowohl beim Wildtyp als auch beim Knockout. Diese Gewichtsabnahme war auch prozentual zum Ausgangsgewicht bei Knockout und Wildtyp nahezu gleich. Das absolute Körpergewicht der Knockout-Tiere war dabei, wie auch unter Normalbedingungen, sowohl vor als auch nach dem Fasten signifikant niedriger als beim Wildtyp.

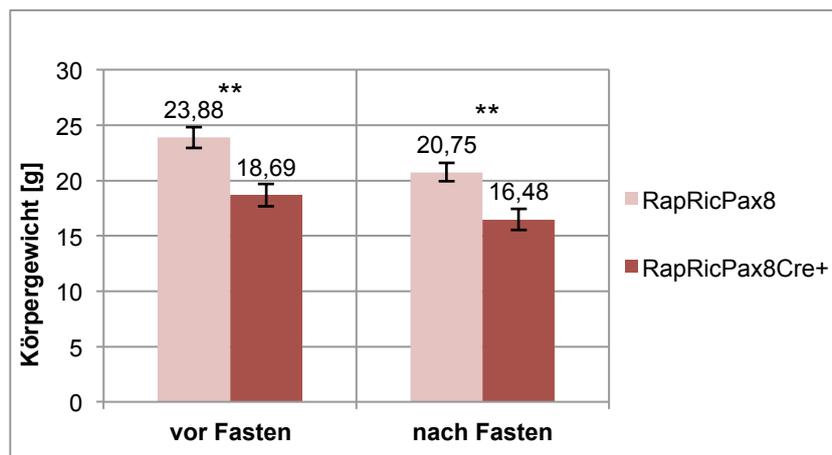


Abbildung 14: Körpergewicht beim Hungerversuch

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in Gramm vor und nach 24 Stunden Fasten. n (Wildtyp; Knockout) = 11. **: $p < 0,005$.

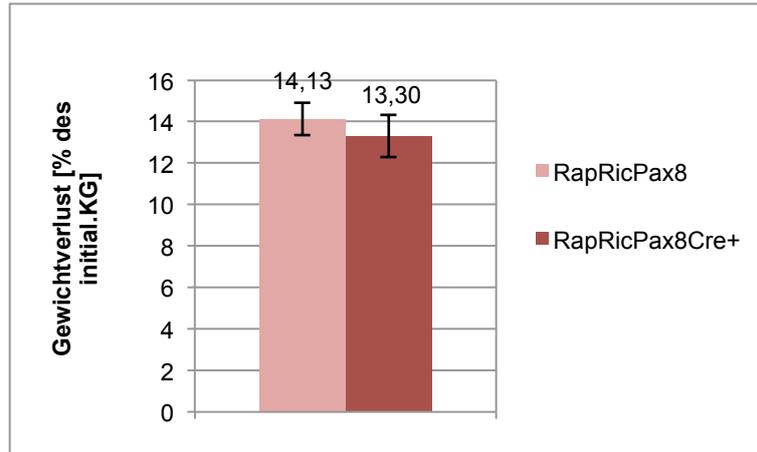


Abbildung 15: Gewichtsverlust beim Hungerversuch
 Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Gewichtsverlustes in prozentualer Angabe zum Ausgangsgewicht. n (Wildtyp; Knockout) = 11.

3.1.4 Durstserien

Nach 12 Stunden Flüssigkeitsrestriktion war deutlich festzustellen, dass die Knockout-Tiere an signifikant mehr Gewicht verloren hatten als die Wildtyp-Tieren.

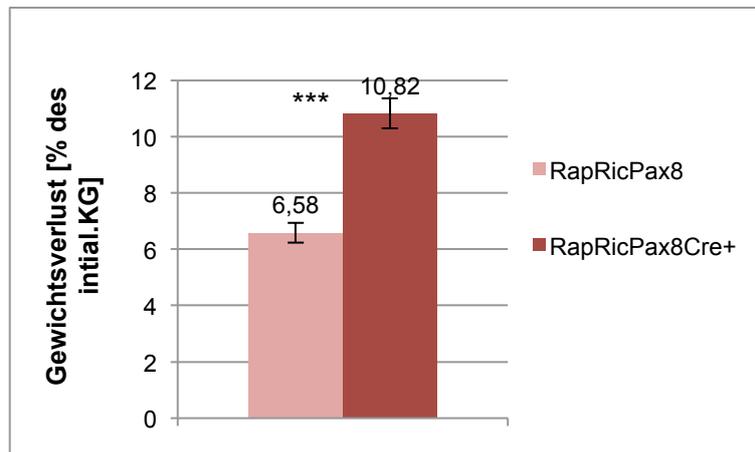


Abbildung 16: Gewichtsverlust beim Durstversuch
 Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Gewichtsverlustes nach 12h Durst in prozentualer Angabe des initialen Körpergewichts. n (Wildtyp) = 23, n (Knockout) = 20. ***: $p < 0,0005$.

3.1.5 Nierengewicht

Die beiden Nieren wurden nach Opferung der Tiere entnommen und gewogen. Auf dieser Weise konnte nachgewiesen werden, dass Nieren der Knockout-Tiere ein signifikant niedrigeres Gewicht hatten als die der Wildtyp-Tiere.

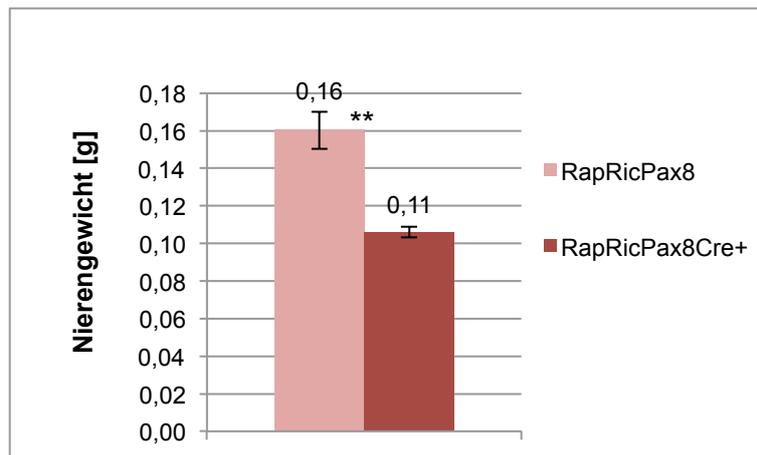


Abbildung 17: Nierengewicht

Mittelwert \pm SEM in g. n (Wildtyp) = 18, n (Knockout) = 15. **: P<0,005.

Nicht nur das absolute Nierengewicht, sondern auch das auf das Körpergewicht normalisierte Nierengewicht war signifikant niedriger.

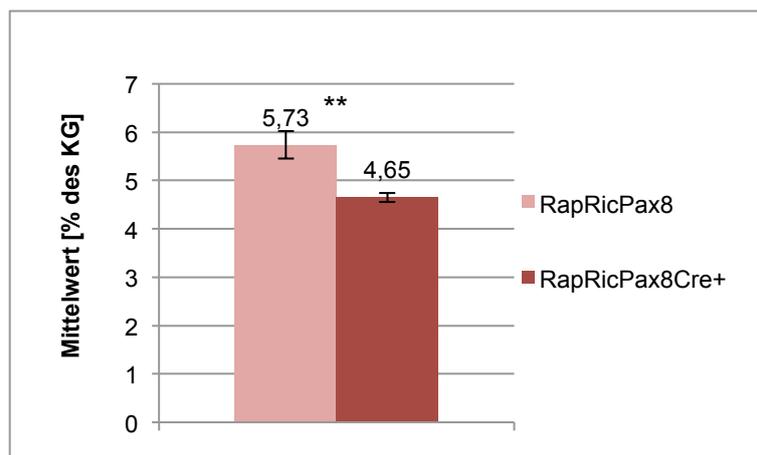


Abbildung 18: Nierengewicht

Mittelwert \pm SEM des Nierengewichtes in prozentualer Angabe zum Körpergewicht. n (Wildtyp) = 18, n (Knockout) = 15. **: p<0,005.

3.2 Urinausscheidung und Flüssigkeitsaufnahme

3.2.1 Kontrollserien

Von Anfang an war es zu erkennen, dass die Knockout-Mäuse eine vermehrte Urinausscheidung aufwiesen. Dies war sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Insulingabe deutlich zu sehen. Dieser Unterschied war auch optisch durch die verminderte Urinkonzentration – nahezu durchsichtiger Urin – beim Knockout festzustellen. Vor Induktion des Knockouts war die Urinmenge niedriger als beim Wildtyp, was bedeutet, dass die Polyurie erst nur nach der Knockoutmanifestation bestand.

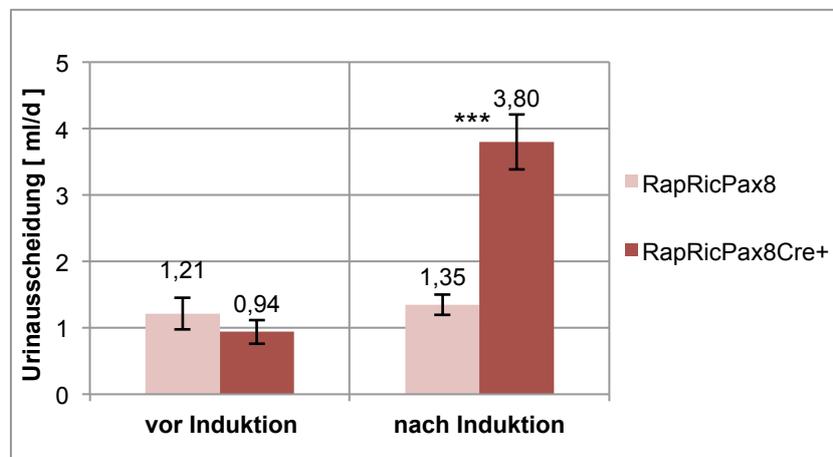


Abbildung 19: Urinausscheidung

Mittelwert \pm SEM in ml pro Tag vor und nach Induktion des Knockouts. n (vor Induktion) = 6.
n (nach Induktion) = 14. ***: p<0,0005.

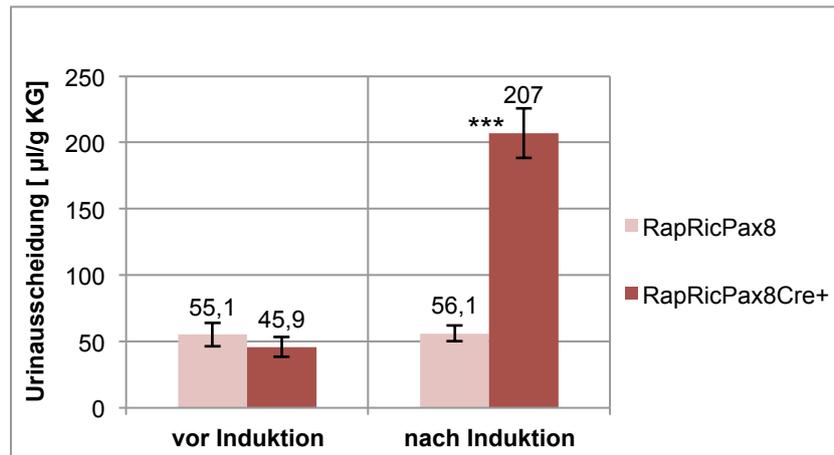


Abbildung 20: Urinausscheidung

Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht pro Tag vor und nach Induktion des Knockouts. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. ***: $p < 0,0005$.

Um weitere Informationen über den Wasserhaushalt zu erlangen, musste die Trinkmenge mitberücksichtigt werden. Die Trinkmenge war, wie der Befund der erhöhten Urinmenge erwarten lässt, bei den Knockout-Tieren signifikant erhöht. Dabei ergab sich kein Unterschied, ob das Trinkwasser (Leitungswasser) Saccharose enthalten hat oder nicht.

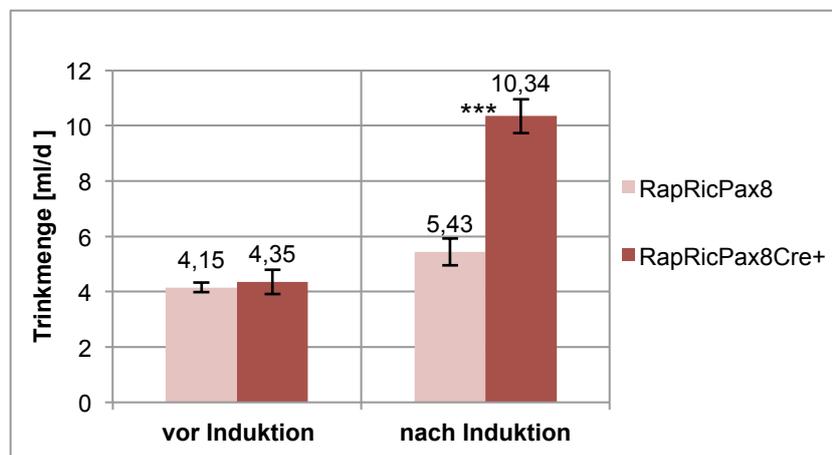


Abbildung 21: Flüssigkeitsaufnahme

Mittelwert \pm SEM in ml pro Tag vor und nach Induktion des Knockouts. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. ***: $p < 0,0005$.

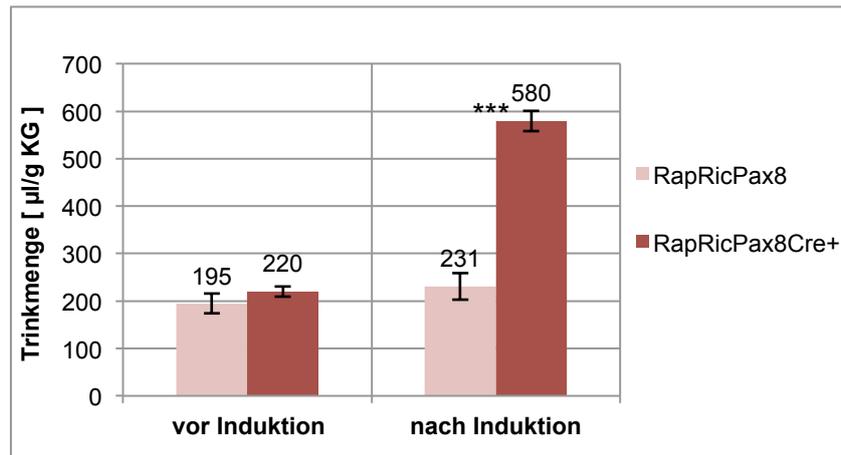


Abbildung 22: Flüssigkeitsaufnahme

Mittelwert \pm SEM in μl pro g Körpergewicht pro Tag vor und nach Induktion des Knockouts.
 n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. ***: $p < 0,0005$.

3.2.2 Diuretikaserien

Die Messung der Urinausscheidung unter Diuretikagabe wurde zur Untersuchung durchgeführt, inwieweit eine Störung im tubulären Na-Transport ursächlich für die Polyurie war. Die Urinausscheidung war nach Vehikel- und Hydrochlorothiazid-Gabe (je $20 \mu\text{g/g KG}$) bei den Knockouttieren signifikant höher. Bei den übrigen Diuretika gab es keinen Unterschied. Nach der Gabe der gleichen Diuretika mit der doppelten Dosierung (je $40 \mu\text{g/g KG}$) blieb der Unterschied in der Hydrochlorothiazid-Gabe hingegen bestehen. Dazu trat hierbei ein signifikanter Unterschied in der Triamteren-Gabe auf. Nach der Furosemid-Gabe war die Ausscheidung nicht unterschiedlich. Diese Befunde ergaben keinen Hinweis auf eine gesteigerte oder verminderte Reaktion der Knockoutmäuse.

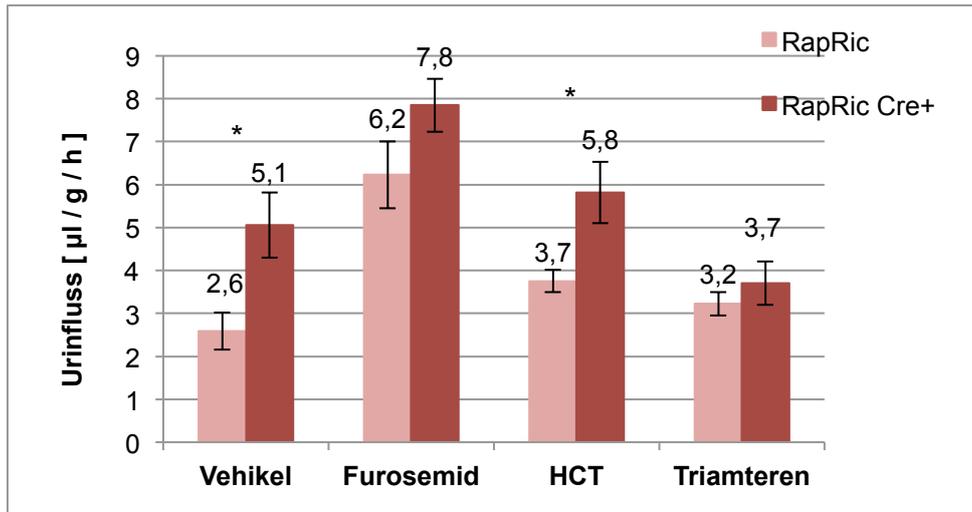


Abbildung 23 Urinausscheidung nach Diuretikagabe

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{l/g/h}$, gesammelt 6 Stunden nach der Diuretikum-Gabe. Dosis: je 20 $[\mu\text{g/g KG}]$. n (Wildtyp) = 10. n (Knockout) = 8. *: $p < 0,05$.

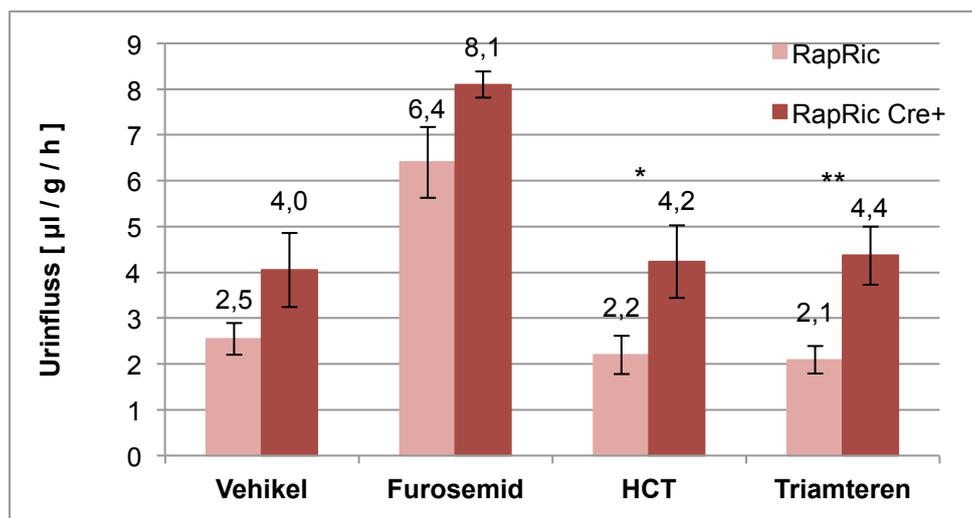


Abbildung 24: Urinausscheidung nach doppeltdosierter Diuretikagabe

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{l/g/h}$, gesammelt 6 Stunden nach der Diuretikum-Gabe. Dosis: je 40 $[\mu\text{g/g KG}]$. n (Wildtyp) = 10. n (Knockout) = 8. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,005$.

3.2.3 Durstserien

Zur weiteren Abklärung der Polyurie, wurden mehrere Durstserien durchgeführt. Diese zeigten, dass die Polyurie bei den Knockout-Tieren nach 12 stündiger Flüssigkeitsrestriktion nicht mehr bestand und die Mäuse den Urin maximal konzentrieren konnten. Die Urinausscheidung war sogar signifikant niedriger als

bei den Wildtyp-Tieren. Wenn man die Urinmenge auf das einzelne Körpergewicht bezieht, wird dieser Unterschied zwar deutlich geringer, bleibt jedoch weiterhin signifikant.

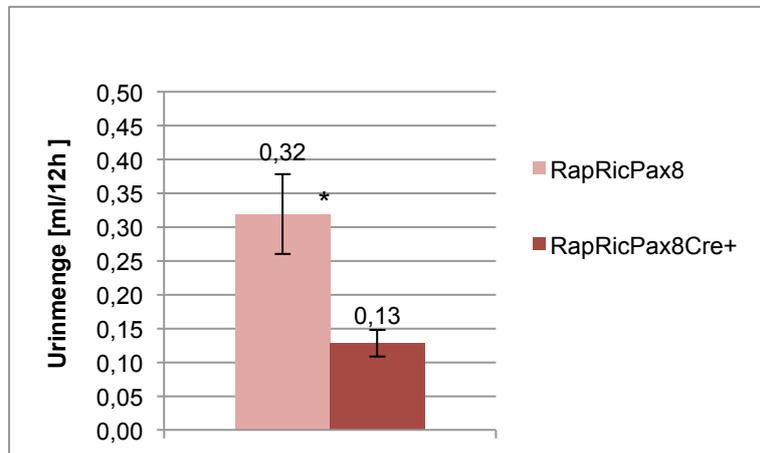


Abbildung 25: Urinausscheidung bei Durstserien
 Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in ml pro 12 Stunden Durst. n (Wildtyp) = 23.
 n (Knockout) = 20. **: $p < 0,005$.

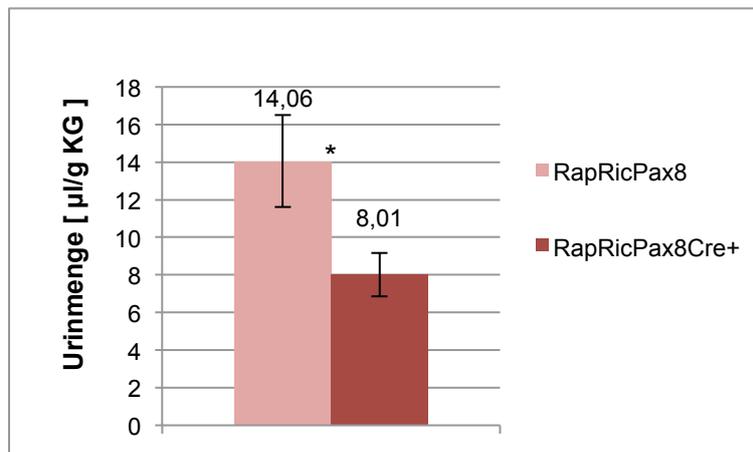


Abbildung 26: Urinausscheidung bei Durstserien
 Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μ l pro g Körpergewicht innerhalb 12 Stunden Durst.
 n (Wildtyp) = 23. n (Knockout) = 20. *: $p < 0,05$.

3.3 Elektrolyt-Haushalt

3.3.1 Natrium

Bei Betrachtung der Natrium-Ausscheidung zeigte sich, dass diese bei den Knockouttieren nach Knockoutinduktion signifikant höher war, wohingegen vor Induktion die Natrium-Ausscheidung mit den Wildtyp-Tieren vergleichbar war.

Das verwendete Futter und die anderen Versuchsbedingungen wie der Trinkwasserinhalt zeigten keinen Einfluss auf die Natrium-Ausscheidung.

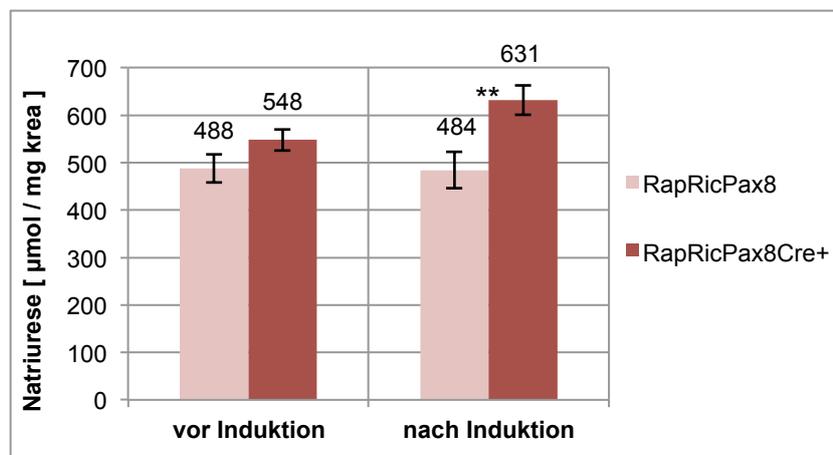


Abbildung 27: Natrium-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Natrium pro mg Kreatinin in 24Stunden-Sammelurin. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. **: $p < 0,005$.

Die auf die eingenommene Futtermenge bereinigte Datenanalyse bestätigte die verstärkte Natriurese der Knockout-Tiere:

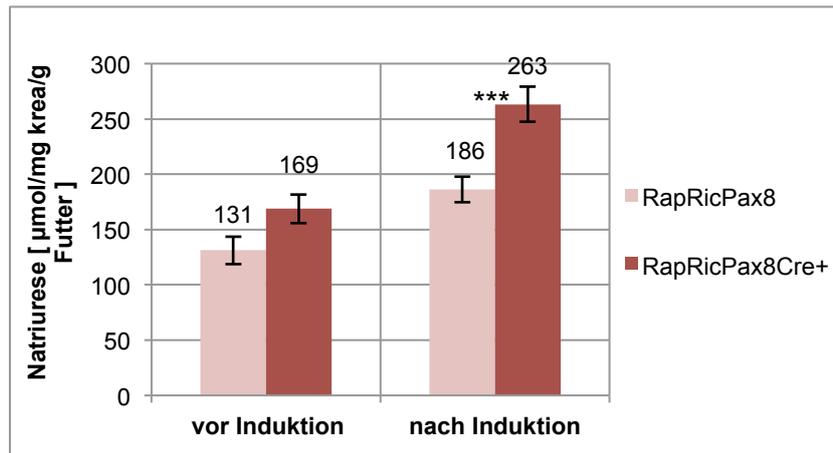


Abbildung 28: Natrium-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Natrium pro mg Kreatinin pro g Futtermenge in 24 Stunden. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. ***: $p < 0,0005$.

3.3.2 Kalium

Analog zur Natriurese bestand bei der Knockout-Maus nach Knockoutinduktion eine signifikant vermehrte Kaliumausscheidung im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Dieser Unterschied war vor der Induktion nicht nachzuweisen. Die Kaliurese konnte unter verschiedenen Versuchsbedingungen beobachtet werden und war unabhängig vom verwendeten Futter oder von der aufgenommenen Futtermenge.

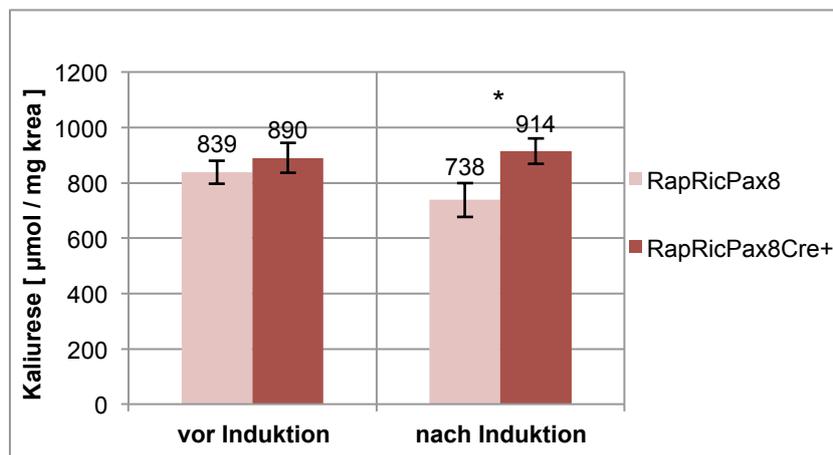


Abbildung 29: Kalium-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Kalium pro mg Kreatinin in 24 Stunden. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. *: $p < 0,05$.

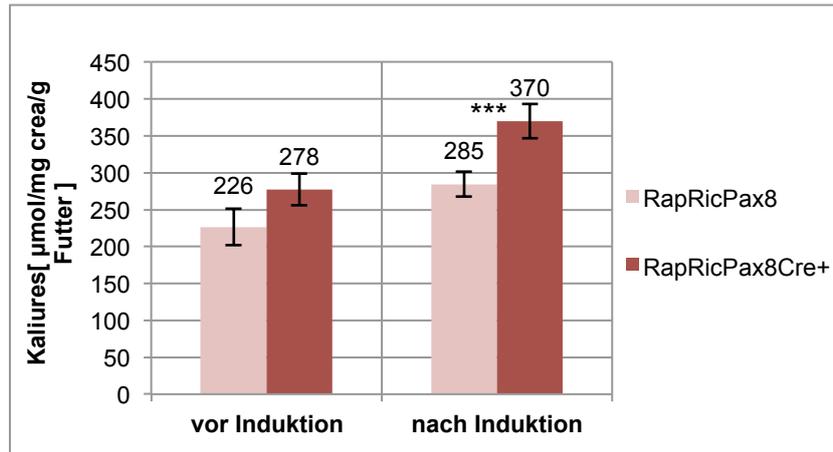


Abbildung 30: Kalium-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Kalium pro mg Kreatinin pro g Futter.
 n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 14. **: $p < 0,005$.

3.3.3 Phosphat

Nach Induktion des Knockouts bestand bei den Knockout-Tieren eine signifikant erhöhte Phosphaturie, die stark vom Futtertyp abhängig war. Sie trat ausschließlich beim Futtertyp C1314 auf, beim C1000-Futter war sie nicht zu beobachten.

Im Plasma der Knockout-Tiere war zwar ein leichter niedrigerer Phosphatspiegel zu finden, ein signifikanter Unterschied bestand allerdings nicht. Der Mittelwert betrug dabei beim Knockout $1,93 \pm 0,11$ mmol/l ($n = 9$) und beim Wildtyp $1,80 \pm 0,14$ mmol/l ($n = 10$; $p = 0,46$).

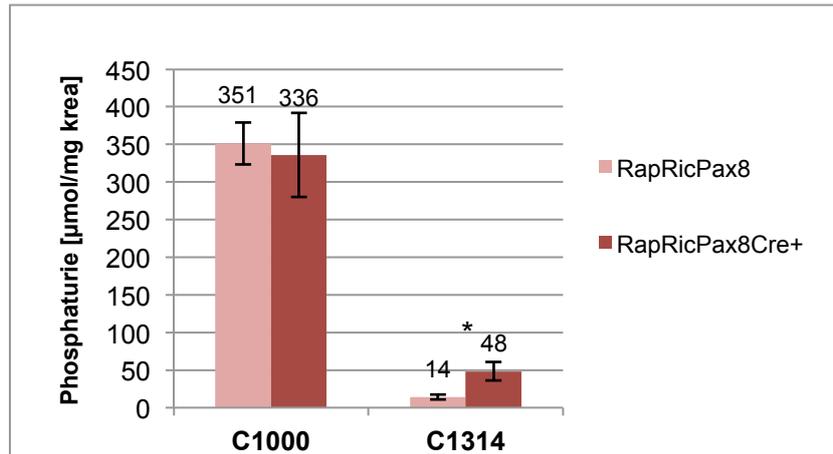


Abbildung 31: Phosphat-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Phosphat pro mg Kreatinin in 24 Stunden-Sammelurin für die Futtertype C1000 und c1314. n (C1000) = 12. n (C1314) = 10. *: $p < 0,05$.

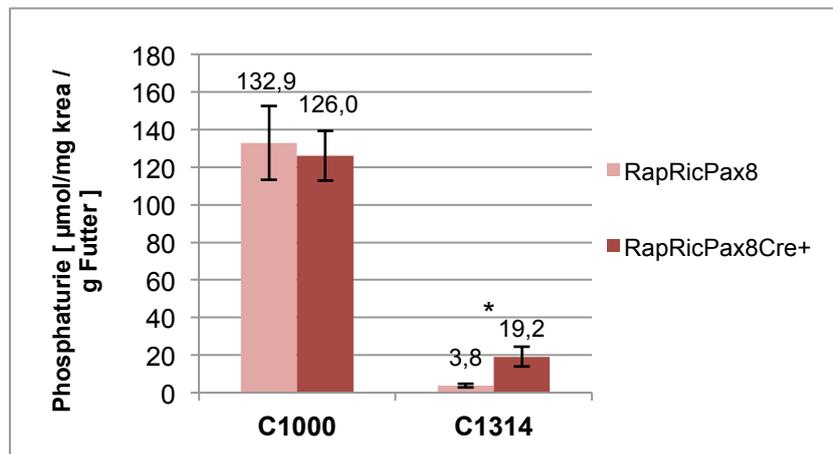


Abbildung 32: Phosphat-Ausscheidung

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in μmol Phosphat pro mg Kreatinin pro g Futter in 24 Stunden-Sammelurin für die Futtertype C1000 und C1314. n (C1000) = 12. n (C1314) = 10 *: $p < 0,05$.

3.3.4 Magnesium

Der Magnesiumhaushalt zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Magnesiumausscheidung zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren. Hier war der Mittelwert bei den Knockout-Tieren (n = 10) mit $25,4 \pm 5,5$ ($\mu\text{mol/mg krea/g Futter}$) zwar etwas höher als der Mittelwert der Wildtyp-Tiere (n = 9) mit $16,7 \pm 3,77$ ($\mu\text{mol/mg krea/g Futter}$), dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,22$).

3.4 Glucosstoffwechsel

3.4.1 Glucosurie

Eine minimale Glucosurie wurde sowohl bei den Knockout-Tieren als auch bei den Wildtyp-Tieren unter Normalbedingungen gefunden. Sie war bei den Knockout-Tieren jedoch signifikant höher als bei den Wildtyp-Tieren.

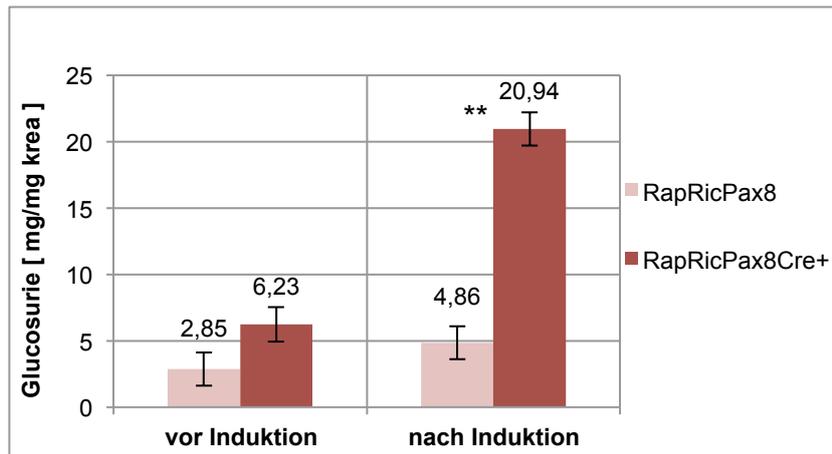


Abbildung 33: Glucosurie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg Glucose pro mg Kreatinin in 24 Stunden-Sammelurin. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 7(K), 5 (W). **: $p < 0,005$. Messung bei normalem Leitungswasser ohne Saccharose und C1000 als Futter.

3.4.2 Hungerversuch

Bei der Durchführung eines 24 stündigen Hungerversuchs zeigte sich kein Unterschied im Glucosespiegel im Blut zwischen den beiden Genotypen.

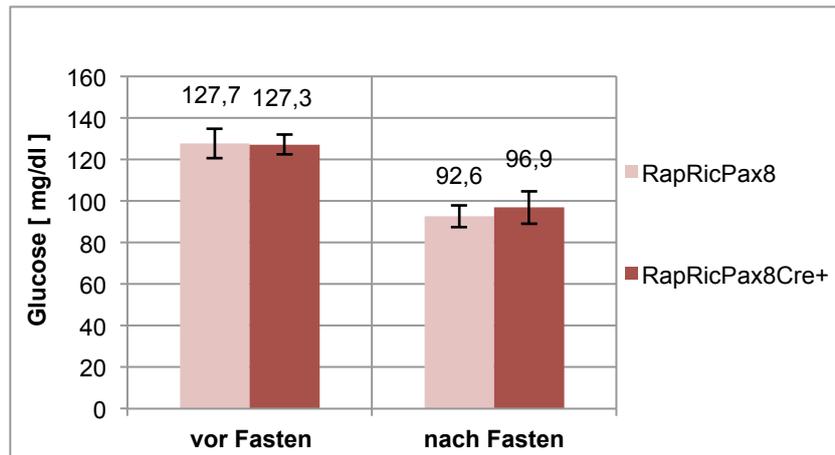


Abbildung 34: Glucose im Hungerversuch

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Glucosespiegels im Blut in mg/dl nach 24 Stunden Fasten. n (vor Fasten; nach Fasten) = 11.

3.4.3 Glucosetoleranztest (IP-GTT)

Der durchgeführte intraperitoneale Glucosetoleranztest hat sich als unauffällig erwiesen. Der Mittelwert der beiden Versuchsgänge war zwar zugunsten des Knockouts höher, die Differenz war jedoch nicht signifikant. Der p-Wert variierte dabei an den verschiedenen Messzeitpunkten zwischen 0,09 und 0,42. Eine weitere Analyse über die Berechnung der Fläche-unter-der-Kurve (AUC) ergab ebenso einen ähnlichen Befund. Der Mittelwert der AUCs der Wildtyp-Tiere lag bei 27.004 ± 3789 und der Mittelwert der Knockout-Tiere bei 34.912 ± 3504 ; der p-Wert betrug dabei 0,12.

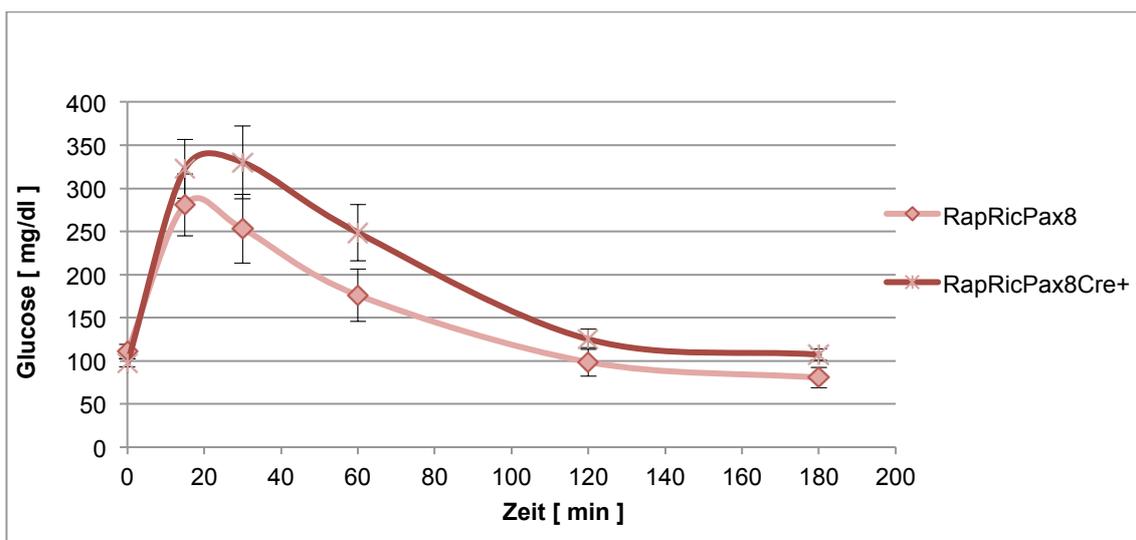


Abbildung 35: Intraperitonealer Glucosetoleranztest (IP-GTT)

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM im Blut in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit in min. n (Wildtyp) = 9. n (Knockout) = 9.

3.4.4 Insulintoleranztest

Der Insulintoleranztest wurde mit zwei verschiedenen Insulindosierungen durchgeführt. Bei Durchführung mit der aus der Literatur entnommenen Dosierung (1 U/kg KG) musste der Test wegen Hypoglykämien von bis zu 20 mg/dl abgebrochen werden. Daraufhin wurde der Test mit einer niedrigeren Dosierung (0,66 U/kg KG) durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Knockout-Mäuse nach Insulininjektion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen einen signifikanten niedrigeren Blutzuckerspiegel aufwiesen. Dieser Unterschied vergrößerte sich mit zunehmendem Abstand zur Insulin-Injektion hielt sich über circa zwei Stunden stabil.

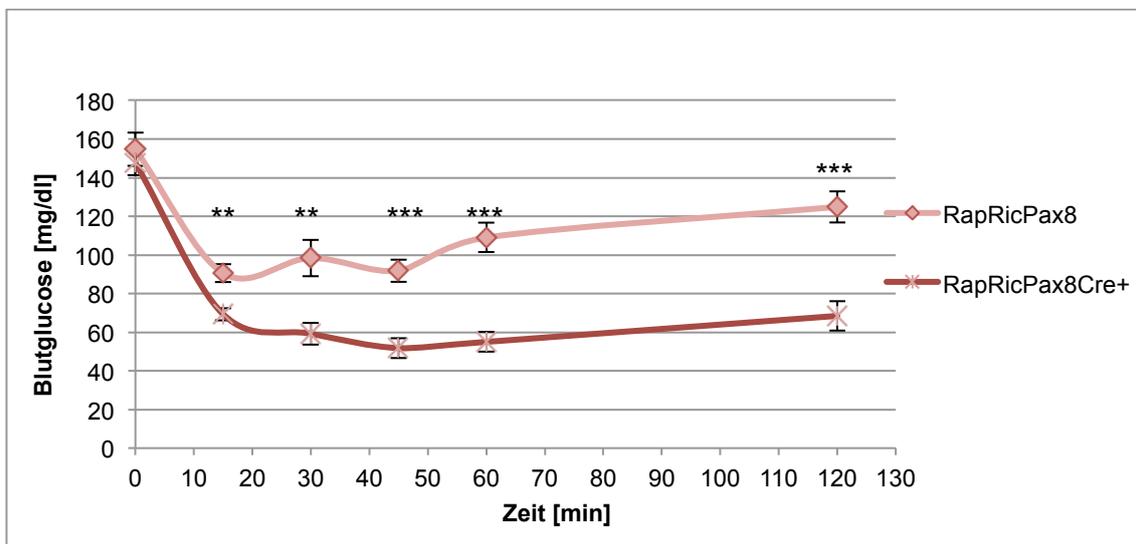


Abbildung 36: Intraperitonealer Insulintoleranztest

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM der Blutglucose in mg/dl. Minute 0 ist der Injektionszeitpunkt. Insulindosis= 0,66 U/kg Körpergewicht. n (Wildtyp) = 7. n (Knockout) = 9.
 : $p < 0,005$. *: $p < 0,0005$.

3.5 Eiweißstoffwechsel

3.5.1 Aminosäuren im Blut

Der Aminosäurenspiegel im Plasma war für nahezu alle Aminosäuren sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den Knockout-Tieren gleich. Ausschließlich

für Glutaminsäure, Glycin und Citrullin zeigte sich bei den Knockout-Mäusen hingegen ein signifikant höherer Plasmaspiegel.

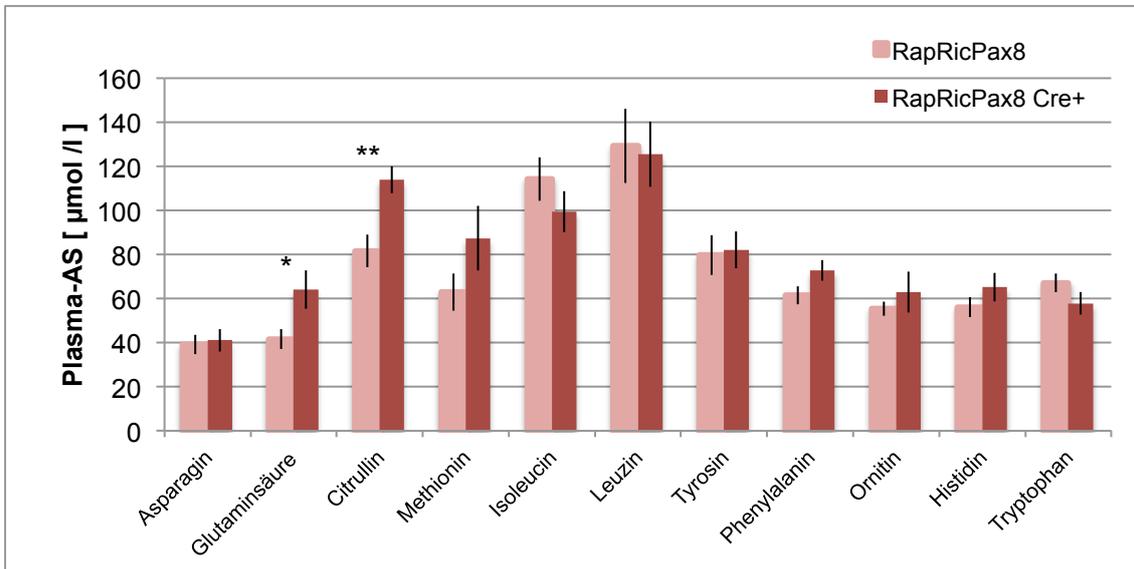


Abbildung 37: Aminosäuren im Plasma

Mittelwert ± SEM in µmol Aminosäuren pro l Plasma. n (Wildtyp; Knockout) = 9. *: p<0,05. **: p<0,005.

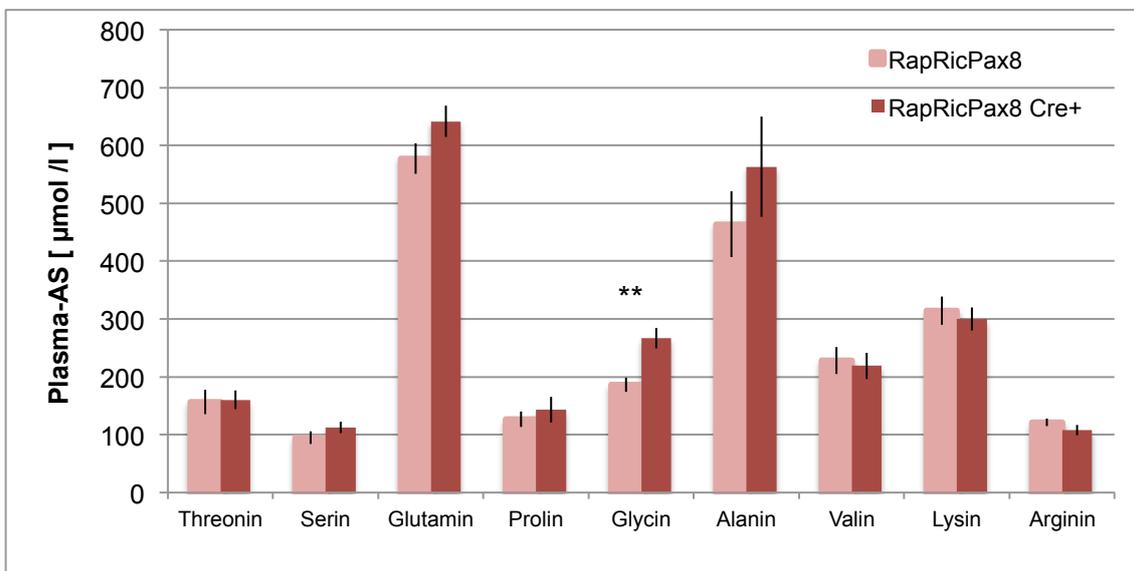


Abbildung 38: Aminosäuren im Plasma

Mittelwert ± SEM in µmol Aminosäuren pro l Plasma. n (Wildtyp; Knockout) = 9. **: p<0,005.

3.5.2 Aminosäurenausscheidung

Bei der Messung der Aminosäuren im Urin wurde ersichtlich, dass die Knockout-Maus eine im Vergleich zur Wildtyp-Maus höhere Ausscheidung zeigte. Diese auf Kreatinin normierte Urinausscheidung war bei nahezu allen Aminosäuren signifikant höher (globale Aminoazidurie).

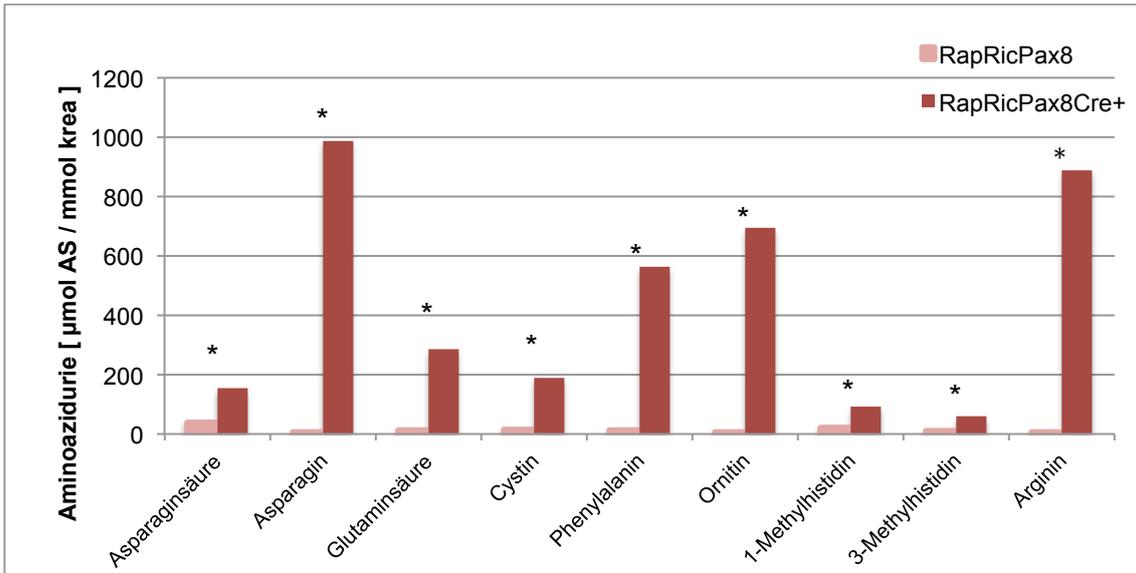


Abbildung 39: Aminosäuren-Ausscheidung

Mittelwert ± SEM in µmol Aminosäure pro mmol Kreatinin in 24 Stunden-Sammelurin.
n (Wildtyp) = 4. n (Knockout) = 6. *: p<0,05.

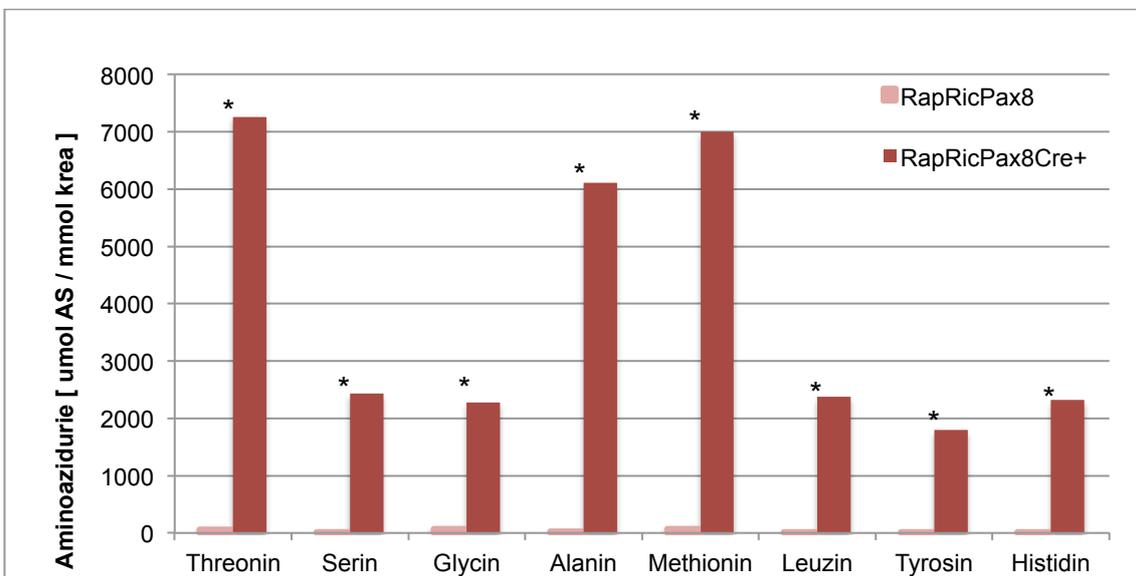


Abbildung 40: Aminosäuren-Ausscheidung

Mittelwert ± SEM in µmol Aminosäure pro mmol Kreatinin in 24 Stunden-Sammelurin.
n (Wildtyp) = 4. n (Knockout) = 6. *: p<0,05.

3.5.3 Plasma-Eiweiß

Der Eiweißspiegel im Plasma war im Mittel bei den Knockout-Tieren und den Wildtyp-Tieren weitgehend identisch.

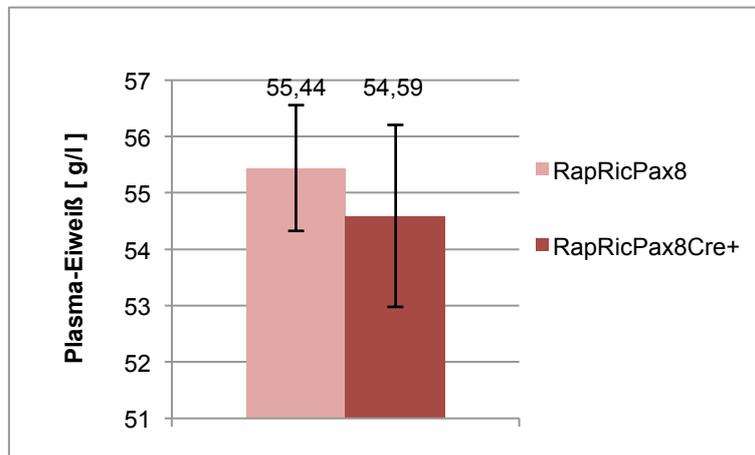


Abbildung 41: Plasma-Eiweiß

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in g/l. n (Wildtyp; Knockout) = 8.

3.5.4 Proteinurie

Analog zum Proteinspiegel im Blut zeigte sich sowohl vor als auch nach Knockoutinduktion kein signifikanter Unterschied in der Proteinurie.

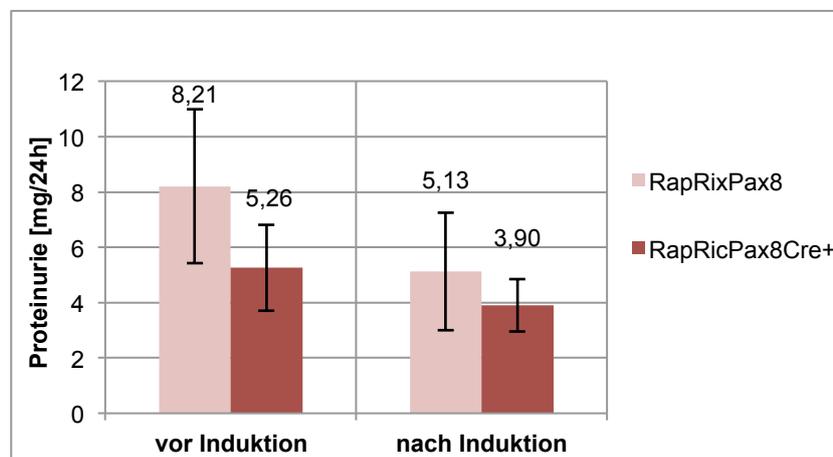


Abbildung 42: Proteinurie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg Protein im 24 Stunden-Sammelurin. n (Wildtyp; Knockout) = 6.

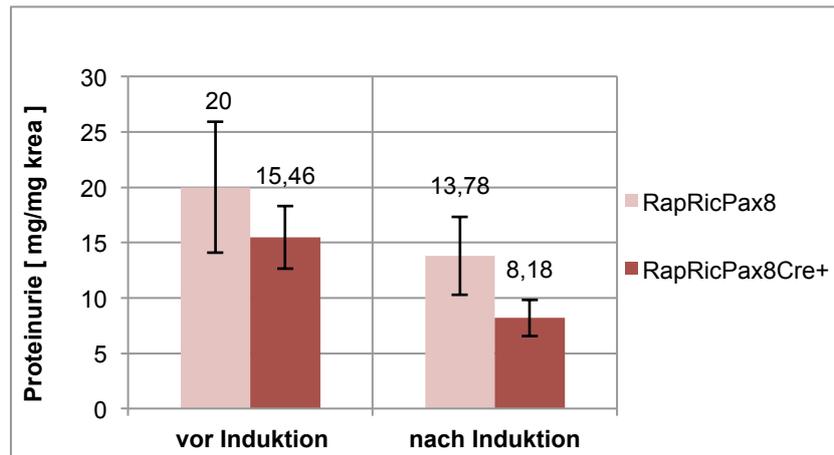


Abbildung 43: Proteinurie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg Protein pro mg Kreatinin im 24 Stunden-Sammelurin. n (Wildtyp; Knockout) = 6.

3.5.5 Albuminausscheidung

Die Ergebnisse wurden aus dem 24-Stunden-Sammelurin unter Kontrollbedingungen mit C1000 als Futter und normalen Leitungswasser gewonnen. Es hat sich keinen Unterschied in der Albuminausscheidung gezeigt.

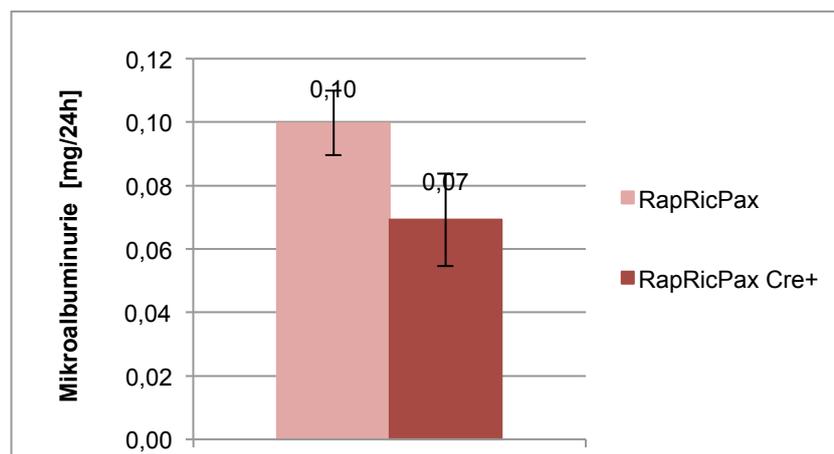


Abbildung 44: Albuminurie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg Albumin im 24 Stunden-Sammelurin. n(Wildtyp) = 23. n (Knockout) = 6.

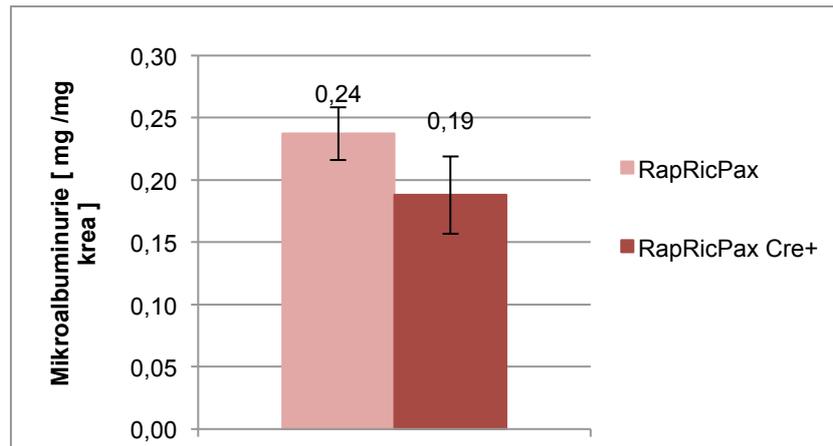


Abbildung 45: Albuminurie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg Albumin pro mg Kreatinin im 24 Stunden-Sammelurin. n (Wildtyp) = 23. n (Knockout) = 6.

3.6 Hormon-Haushalt

3.6.1 Parathormon

Um zu überprüfen, ob ein sekundärer Hyperparathyreoidismus als eine Komplikation der vermuteten und später nachgewiesenen Niereninsuffizienz bei der Knockout-Maus besteht, wurde der Parathormonspiegel im Plasma bestimmt. Es war zu sehen, dass der Parathormonspiegel sowohl bei den Knockout-Mäusen als auch bei den Wildtyp-Mäusen nahezu gleich war. Ein Hyperparathyreoidismus war somit nicht nachzuweisen.

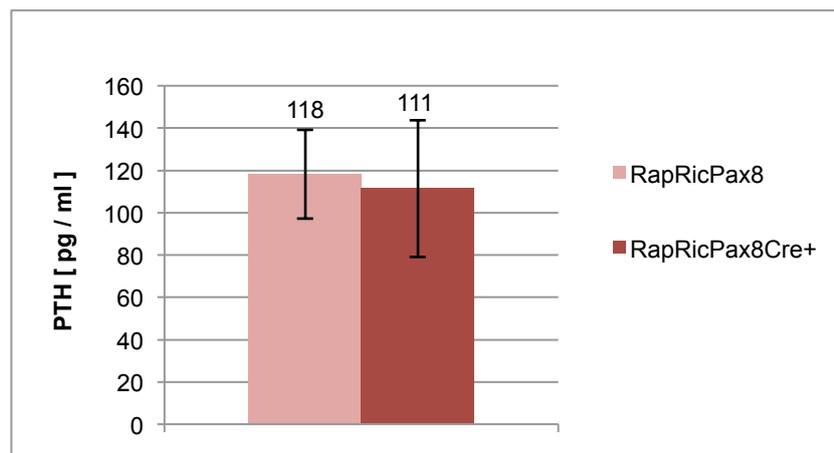


Abbildung 37: Parathormon

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in pg pro ml Plasma. n (Wildtyp) = 10. n (Knockout) = 8.

3.6.2 Aldosteron

Im Rahmen der Untersuchung des Wasserhaushaltes war es bei bestehender Polyurie von größter Bedeutung, den Aldosteronspiegel im Plasma zu bestimmen. Dabei hat sich herausgestellt, dass der Aldosteronspiegel bei der Knockout-Maus trotz großer Standardabweichung signifikant höher als bei der Wildtyp-Maus war.

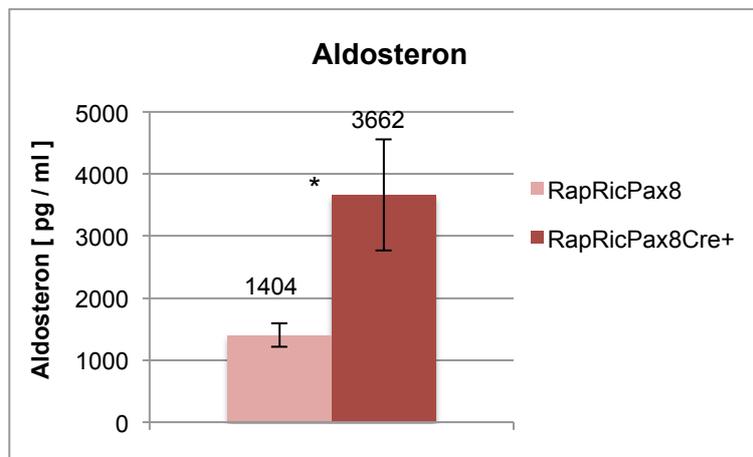


Abbildung 38: Aldosteron

Mittelwert \pm SEM in pg pro ml Plasma. n (Wildtyp) = 9. n (Knockout) = 8. *: $p < 0,05$.

3.7 Säure-Basen-Haushalt

Da eine bestehend Azidose einige Auffälligkeiten beim Knockout erklären könnte, wurde eine Blutgasanalyse durchgeführt, deren Ergebnis unauffällig war.

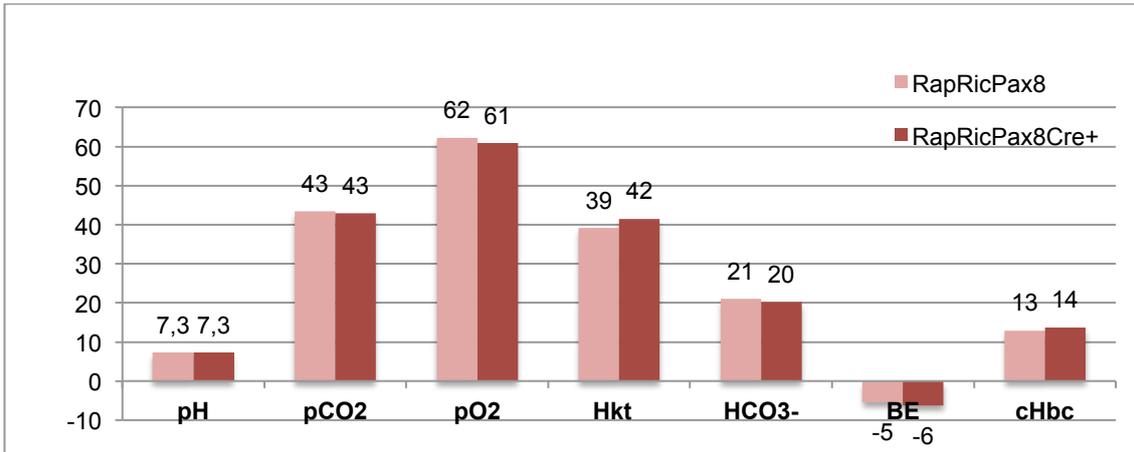


Abbildung 39: Kapilläre Blutgasanalyse

Dargestellt ist der Mittelwert. Einheiten: pCO₂/pO₂ [mmHg], Hkt [%], HCO₃⁻/BE [mmol/l], cHbc [g/dl]. n (Wildtyp; Knockout)=9.

3.8 Osmolalität

Zur Abklärung der Polydipsie wurde eine Osmolalitätsbestimmung im Plasma durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Osmolalität bei den Knockout-Mäusen im Mittel zwar niedriger war, jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-Tieren bestand. Die Polyurie war somit von einer unauffälligen Plasmaosmolalität begleitet.

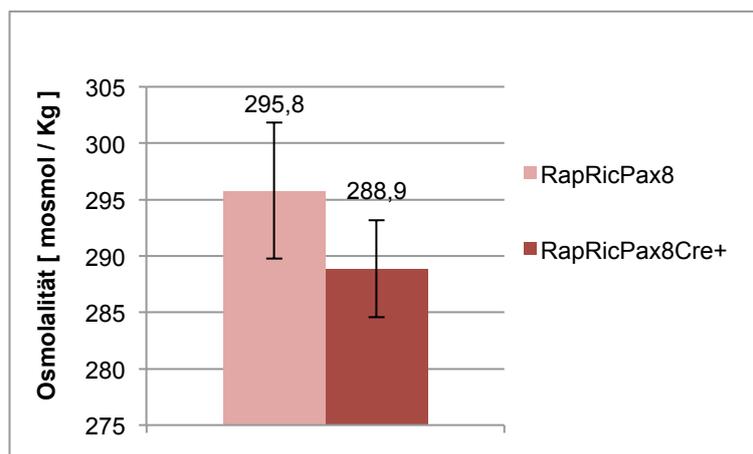


Abbildung 40: Plasma-Osmolalität

Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM in mosmol pro Kg Lösungsgsmittel (Wasser). n (Wildtyp) = 20. n (Knockout) = 17.

3.9 Harnstoff

Während sich vor der Knockoutinduktion kein Unterschied in der Harnstoffkonzentration im Plasma zeigte, waren höhere Harnstoffwerte bei den Knockout-Tieren bereits 9 Tage nach der Induktion nachweisbar. Dieser Unterschied war bei allen induzierten Tieren über die gesamte Versuchszeit signifikant vorhanden.

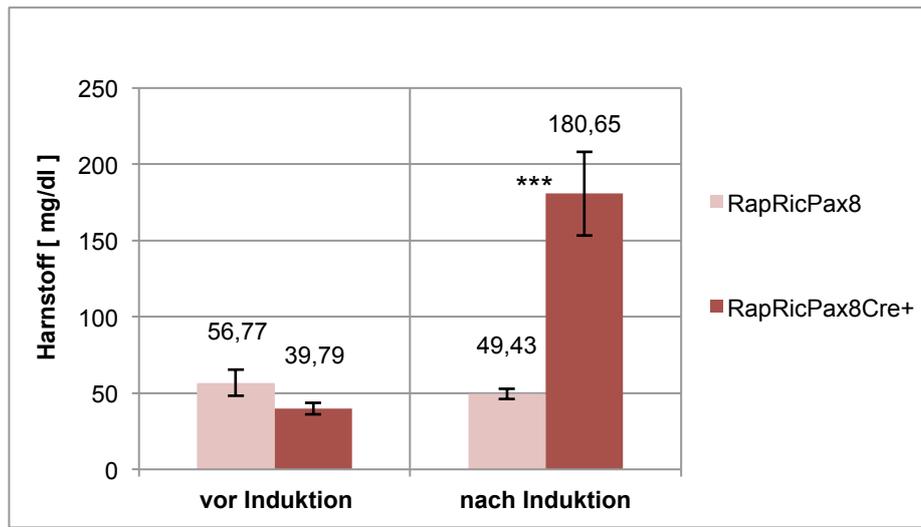


Abbildung 50: Harnstoff im Plasma

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in mg/dl im Plasma vor und nach Knockoutinduktion. n (vor Induktion) = 6. n (nach Induktion) = 21. ***: $p < 0,0005$.

3.10 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Bei zahlreichen Hinweisen auf eine verminderte Nierenfunktion bei den Knockout-Mäusen wurde eine exakte Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Knockout-Maus eine signifikant niedrigere GFR als die Wildtyp-Maus aufwies. Dieser Unterschied war sowohl bei der gemessenen GFR als auch bei der auf das Körpergewicht normalisierten GFR zu sehen. Bei den einzelnen erhaltenen Kurven zeigten sich R^2 -Mittelwerten von R^2 (Wildtyp) = 0,987 und R^2 (Knockout) = 0,996.

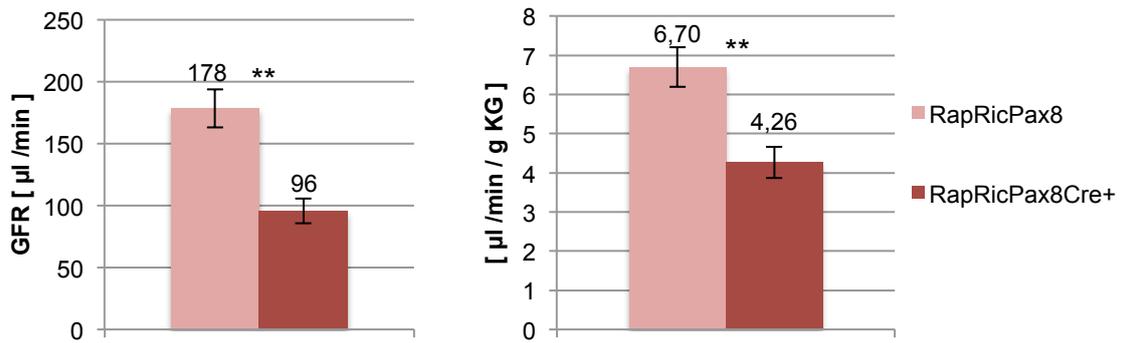


Abbildung 51: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM in [$\mu\text{l}/\text{min}$] und [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Körpergewicht]. n (Wildtyp) = 9. n (Knockout) = 8. **: $p < 0,005$. Messung unter Normalbedingungen.

4 Diskussion

Bei weitverbreitetem Einsatz von mTOR-Inhibitoren im klinischen Alltag und den unerforschten Funktionen von mTOR im Tubulusepithel, war es das Ziel dieser Arbeit, die physiologische Rolle und die damit verbundene klinische Relevanz von mTORC1 und mTORC2 im proximalen Tubulus zu untersuchen.

Zunächst war bei der Doppelknockout-Maus ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht sowohl klinisch als auch objektiv zu beobachten. Da ein reduziertes Körpergewicht auf zahlreiche Ursachen zurückgeführt werden kann, wurde dieser Befund zuerst im zeitlichen Verlauf analysiert. Darüber hinaus war es notwendig, den Gewichtsunterschied auf eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Knockout-Manifestation und auf ein Auftreten bei Einzelknockout zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass das Gewicht vor Knockoutinduktion bei allen Tieren gleich war, nach Induktion zeigte sich jedoch nur bei den Doppelknockout-Mäusen eine signifikante Gewichtsabnahme, die über die Zeit stabil blieb. Nach mehreren Tagen kam es zwar zu einem leichten Gewichtsanstieg, der Unterschied zum Wildtyp-Gewicht blieb jedoch signifikant bestehen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass nur das Fehlen der beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 zusammen zu diesem Gewichtsverlust führt und dass ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Knockout und der Gewichtsabnahme bestehen muss. Dieser Zusammenhang deutet, mit dem Wissen, dass sich der Energiehaushalt und mTOR gegenseitig beeinflussen⁵, und dass der proximale Tubulus für seine Transportvorgänge einen enormen Energieverbrauch hat⁶⁹, am ehesten auf eine gestörte Energiehaushalt hin. Darüber hinaus kann die Störung des Glucosehaushalts für den gestörten Energiehaushalt und somit für die Gewichtsabnahme verantwortlich sein. Im proximalen Tubulus findet nicht nur die Glucoseresorption sondern zum Teil auch die Glukoneogenese statt. Eine Störung der Glukoneogenese bei gleichzeitigem Resorptionsdefekt mit konsekutiver Glucosurie (siehe unten) könnte die Leber eventuell nicht vollständig kompensieren. Es zeigte sich jedoch weder eine deutliche Glukosurie noch eine Einschränkung der Glukoneogenese, so dass diese

Mechanismen des Energiemangels ausscheiden. Der direkte Pathomechanismus des Minderwuchses konnte demnach mit dieser Arbeit nicht aufgeschlüsselt werden und bleibt daher weiterhin unklar.

Ebenfalls auffällig war eine signifikante Polyurie bei den Knockout-Tieren, die ebenso wie die Gewichtsabnahme nur nach Knockoutmanifestation bestand und über die Zeit stabil blieb. Diese Polyurie ließ zunächst einen durch mTOR gestörten Wasserhaushalt mit gestörter Harnkonzentrierung im proximalen Tubulus vermuten. Nach Durchführung von Durstversuchen über 12 Stunden zeigte sich jedoch, dass die Polyurie unter Flüssigkeitsrestriktion nicht weiter bestand. Außerdem kam es zu keinem Unterschied in der Plasma-Osmolalität oder im Plasma-Natrium. In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann nicht mehr von einer renal-bedingten Polyurie ausgegangen werden, da die Nieren die Durstsituation gut kompensierten und das Wasser im Körper halten konnten. Darüber hinaus ergab die Gabe verschiedener Diuretika zur Lokalisierung der Ursache der Polyurie im Tubulussystem keinen wegweisenden Befund.

Eine weitere Erklärung für die vorhandene Polyurie wäre die osmotische Diurese, die im Rahmen der nachgewiesenen Glucosurie und Aminoazidurie durchaus auftreten kann. Dazu könnte auch die verstärkte Natriurese mit sekundärem Hyperaldosteronismus passen. Tiefgreifende Elektrolytveränderungen im Blut, die zu dieser Polyurie beitragen könnten wie beispielsweise eine Hyperkalziämie oder eine Hypokaliämie waren nicht nachweisbar.

Des Weiteren könnte auch eine primäre Polydipsie denkbar sein, die über eine erniedrigte Durstschwelle bei den Knockoutmäusen zu erhöhter Wasseraufnahme geführt hat. Die genaue Ursache des erhöhten Durstgefühls bleibt unklar, eine Erhöhung der Plasma-Osmolalität wurde nicht beobachtet.

Das Ausscheidungsmuster der Elektrolyte deutete auf eine generalisierte Störung der Funktion des proximalen Tubulus hin. Es war eine signifikant erhöhte Natriumausscheidung nachzuweisen, die bei insgesamt streng reguliertem Natriumhaushalt verschiedenste Ursachen haben kann. Da die

erhöhte Natriurese erst nach der Knockoutinduktion auftrat, war ein kausaler Zusammenhang naheliegend. Die naheliegendste Interpretation wäre eine Störung der Natriumresorption im proximalen Tubulus aufgrund der dortigen mTOR-Deletion. Die signifikant erhöhten Aldosteronwerte bei den Knockouttieren unterstützen diese These. Die erhöhten Aldosteronwerte dienten somit der Stimulation des distalen Tubulus, den Natriumverlust im proximalen Tubulus durch eine Aldosteron-abhängige vermehrte Expression von ENaC Kanälen zu kompensieren. Da aber der proximale Tubulus für den größten Teil der Natriumresorption verantwortlich ist⁶⁹, kann der distale Tubulus trotz der Aldosteronerhöhung eine Störung dort nicht vollständig kompensieren. Gleiches gilt für die Kaliumausscheidung, die beim Knockout signifikant erhöht war. Dieser Befund kann, genauso wie die erhöhte Natriurese, auf eine Resorptionsstörung im proximalen Tubulus zurückgeführt werden. Eine weitere mögliche Erklärung wäre das erhöhte Aldosteron, das die Kaliumausscheidung im distalen Tubulus stimuliert.

Bei der Betrachtung der Phosphatausscheidung fiel bei den Knockout-Tieren eine signifikante Phosphaturie auf, die zwar abhängig vom Futtertyp war, vorausgehende Beobachtungen und Veröffentlichungen über eine Phosphaturie unter Rapamycintherapie jedoch bekräftigte⁵⁷. Die Abhängigkeit vom Futtertyp kann dadurch erklärt werden, dass beim verwendeten C1000-Futter wenig Kalzium im Darm resorbiert wurde (erniedrigte Urin-Kalziumausscheidung), was einen vorübergehenden sekundären Hyperparathyreoidismus mit konsekutiver Phosphaturie verursacht haben kann. Aufgrund der höheren Phosphatausscheidung unter C1000-Diät im Vergleich zur C1314-Diät wurde der subtile Unterschied zwischen den beiden Genotypen überdeckt. Deshalb war die signifikante Phosphaturie nur unter C1314 als Futter zu sehen.

Während die Ursache der Phosphaturie unter Rapamycintherapie bislang unklar ist, scheint eine Störung der proximal tubulären Resorption eine Rolle zu spielen. Ob es sich dabei um eine Störung der basolateralen Seite des Tubulus oder um eine Störung der Phosphattransporter auf der luminalen Tubulusseite handelt, bleibt weiter unklar. Andererseits konnte eine Hypophosphatämie, die häufiger unter Rapamycintherapie auftritt⁴, in unserem Modell nicht reproduziert

werden. Da Rapamycin seine Wirkung systemisch entfaltet und der mTOR-Knockout in unserem Modell hauptsächlich die Niere betrifft, kann dies für eine extrarenale Ursache der Hypophosphatämie bei Rapamycingabe sprechen.

4.1.1 Niereninsuffizienz bei verminderter GFR

Bei mehreren Hinweisen auf eine Störung der Nierenfunktion wurde ein Inulin-Test zur Überprüfung der glomerulären Nierenfunktion durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikant erniedrigte GFR bei den Knockout-Mäusen. Somit bestätigte sich der Verdacht auf das Vorliegen einer Niereninsuffizienz. Diese war allerdings nicht so stark ausgeprägt, dass die Tiere darunter symptomatisch waren; eine hydropische Dekompensation mit Ödementwicklung konnte beispielsweise bei den Mäusen nicht beobachtet werden. Außerdem zeigten die Knockouttiere keine renale Anämie oder einen sekundären Hyperparathyreoidismus, was bei einer länger bestehender Niereninsuffizienz zu erwarten gewesen wäre.

Auf der anderen Seite waren zahlreiche Indikatoren für die verminderte GFR vorhanden. So zeigte sich ein signifikant erhöhter Harnstoffspiegel im Plasma der Knockouttiere, der teilweise das 10-fache der Wildtypwerte erreichte.

Ein weiteres Zeichen für die bestehende Niereninsuffizienz war das erniedrigte Nierengewicht, das sowohl absolut als auch im Verhältnis zum Körpergewicht im Vergleich zur Wildtypmaus signifikant bestand. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass bei einem mTOR-Ausfall ein zentraler Wachstumsschlüssel fehlt, der die Zellproliferation und das Zellwachstum stimuliert, sodass es zu einem mangelnden Nierenwachstum kam, das wiederum in einer verminderten Nierenfunktion mündete. Das erniedrigte Nierengewicht kann jedoch auch sekundär nach Verminderung der Nierenfunktion aufgetreten sein.

Da die mTOR-Deletion nur die Zellen des Tubulussystems betraf, sollte der Glomerulus und seine Funktion unberührt bleiben. Weil der Glomerulus und der Tubulus jedoch nicht getrennt arbeiten, sondern gemeinsam eine funktionelle Einheit bilden, kann man durch die vorhandenen Ergebnissen postulieren, dass die GFR-Verschlechterung aus der tubulären Störung resultiert. Diese Störung

kann als Versuch der Niere gesehen werden, bei tubulärer Dysfunktion mit Verlust vieler filtrierter Elemente die Filtration zu drosseln. Das erfolgt durch den sogenannten tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus, bei dem die geschädigten Tubuluszellen mit konsekutivem Natriumverlust Signale in der Macula densa induzieren, die neben anderen Faktoren zur Konstriktion des Vas afferens mit Reduktion der GFR führen⁸⁵.

4.1.2 Glucosehaushalt

Wie bereits erwähnt, wurde eine Glucosurie im Rahmen eines Fanconi-Syndroms unter Therapie mit Rapamycin bereits beschrieben⁵⁷. Eine signifikante Glucosurie beim Doppelknockout war auch in unserem Modell nachzuweisen. Diese Glucosurie ist, unter Berücksichtigung der anderen Ergebnisse, wahrscheinlich durch eine Resorptionsstörung im proximalen Tubulus zustande gekommen. Eine genauere Erkenntnis, wie es zu dieser Glucosurie auf Zellebene kommen kann, gelangt nicht.

Zur weiteren Untersuchung des Glucosehaushaltes wurde ein intraperitonealer Glucosetoleranztest durchgeführt, bei dem Auffälligkeiten der Knockout-Tiere ausgeschlossen wurden.

Bei dem durchgeführten intraperitonealen Insulintoleranztest zeigten die Knockout-Tiere signifikant niedrigere Blutzucker-Werte als die Wildtyp-Tiere. Da die Insulinsensitivität bei Gewichtsabnahme ansteigt, kann dieser Befund auf der einen Seite durch das niedrigere Gewicht der Knockout-Tiere erklärt werden. Da das Insulin teilweise von den Glomeruli filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert und abgebaut wird⁸⁶, kann dieser Unterschied auf der anderen Seite dadurch erklärt werden, dass das injizierte Insulin durch die reduzierte GFR bei den Knockout-Tieren langsamer filtriert wird, sodass sein Blutspiegel höher ist. Da eine Insulinbestimmung im Blut aus technischen Gründen nicht möglich war, bleibt dies jedoch nur eine mögliche Interpretation. Zusammenfassend kann von einem starken Einfluss von mTOR auf den Glucosehaushalt ausgegangen werden. Nicht nur durch seinen Einfluss auf die Glucoseresorption im proximalen Tubulus, sondern auch über seinen Einfluss auf die Regulation durch Insulin. Bei insgesamt komplexer Glucoseregulation

bleibt dieser Zusammenhang zwischen mTOR und Glucose durch weitere Arbeiten tiefgreifender zu analysieren.

4.1.3 Eiweiß- und Aminosäurehaushalt

Bislang war ausschließlich beschrieben, dass eine Aminoazidurie im Rahmen eines Fanconi-Syndroms unter Rapamycin-Therapie bestand⁵⁷, sodass ein Zusammenhang zwischen mTORC1 und der Aminosäureresorption postuliert werden kann. In dem hier verwendeten Doppelknockoutmodell hat sich eine globale Aminoazidurie gezeigt. Weil die Resorption der Aminosäuren vorwiegend im proximalen Tubulus über unterschiedliche Rezeptoren stattfindet, kann die Aminoazidurie am ehesten auf eine Resorptionsstörung im proximalen Tubulus zurückgeführt werden. Eine definitive Aussage über den verantwortlichen Pathomechanismus ist jedoch durch diese Arbeit nicht möglich. Deutlicher wurde hierdurch lediglich, dass mTOR, wie bislang bekannt, mit dem Aminosäurehaushalt eng gekoppelt ist.

Bei der bestehenden globalen Aminoazidurie war davon auszugehen, dass im Blut ein entsprechender Mangel an Aminosäuren zu finden ist. Überraschenderweise ergaben sich bis auf drei Aminosäuren keine auffälligen Befunde im Blut, was darauf hindeutet, dass die Aminoazidurie entweder nicht ausreichend erhöht war oder dass der Organismus die Aminoazidurie durch erhöhten Aminosäureabbau teilweise kompensieren konnte. Eine Drosselung des Aminosäureabbaus sollte jedoch mit einer Verminderung des Harnstoffspiegels im Plasma einhergehen, was hier allerdings nicht der Fall war.

Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Doppelknockout von mTORC1 und mTORC2 keinen Einfluss auf den Proteinhaushalt in der Niere hat. Die absolute Eiweißausscheidung war nicht erhöht. Sie war sogar bei den Knockout-Mäusen im Mittel niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen, wobei der Unterschied allerdings keine Signifikanz erreichte. Außerdem war der Eiweißspiegel im Blut unauffällig, was wiederum für einen fehlenden Einfluss von mTOR auf den Proteinhaushalt im Tubulus spricht.

Zur weiteren Untersuchung des Eiweißhaushaltes in der Niere wurde die Albuminausscheidung untersucht, insbesondere weil der Albuminhaushalt im Sinne einer Albuminurie bei Nierenpathologien häufig gestört ist. Hierbei zeigte sich, dass ein Doppelknockout zu keinerlei Veränderung in der Albuminausscheidung führte, was bei einer isolierten Funktionsstörung des proximalen Tubulus gut nachzuvollziehen ist, da die für die Albuminfiltration zuständigen Glomeruli von der mTOR-Deletion nicht betroffen sind. Eine erhöhte Albuminurie zeigte sich hingegen beim Einzelknockout von Raptor. Warum diese auffällige Albuminurie in dem verwendeten Doppelknockoutmodell verschwindet, konnte durch diese Arbeit nicht nachvollzogen werden. Bei den unauffälligen Ergebnissen des Doppelknockoutmodells wurde auf eine weitere Verifizierung einer möglichen proximal-tubulären Eiweißresorptionsstörung durch eine Messung der β_2 -Mikroglobulinausscheidung verzichtet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die mTOR-Deletion im proximalen Tubulus im Gegensatz zu ihrem Einfluss auf die Ausscheidung von Elektrolyten, Glucose und Aminosäuren keinen Einfluss auf den Proteinhaushalt hat. Nichtsdestotrotz steht dieses Fazit der bislang beschriebenen zentralen Rolle von mTOR in der Regulation des intrazellulären Proteinhaushaltes und der Proteinsynthese gegenüber¹.

4.1.4 Ausblick

Wie bereits erwähnt, konnten durch diese Arbeit zahlreiche, vor allem klinische Befunde und Auffälligkeiten bei einer doppelten Deletion von mTOR im proximalen Tubulus festgestellt werden.

Die erhobenen Erkenntnisse konnten etwas zum physiologischen und pathophysiologischen Verständnis von mTOR im Tubulus beitragen. Weitere Untersuchungen, um jeden der festgestellten Befunde auf zellulärer und molekularer Ebene besser nachvollziehen zu können, bleiben für zukünftige Arbeiten offen.

Für den klinischen Alltag konnte diese Arbeit zahlreiche Erkenntnisse liefern, die bei der Gabe von mTOR-Inhibitoren von Bedeutung sein können, wie

beispielsweise die nachgewiesene GFR-Abnahme im Rahmen einer proximaltubulären Dysfunktion begleitet von einer globalen Resorptionsstörung.

5 Zusammenfassung

Bei unklarer Rolle von mTOR im Tubulussystem und bei zunehmendem Einsatz von mTOR-Inhibitoren hat sich diese Arbeit zum Ziel gesetzt, die physiologische Funktion von mTOR und die damit verbundene Pathophysiologie im proximalen Tubulus zu untersuchen. Dazu wurde ein Mausmodell mit einem induzierbaren gewebespezifischen Knockout der beiden mTOR-Komplexen mTORC1 und mTORC2 herangezogen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Deletion von mTORC1 und mTORC2 zu einer Resorptionsstörung im proximalen Tubulus führt, die sich durch eine erhöhte Natriurese, Kaliurese, Phosphaturie, Glucosurie und eine globale Aminoazidurie äußert. Zudem verursachte diese Deletion eine Niereninsuffizienz mit verminderter GFR, erhöhten Harnstoffwerten und verringertem Nierengewicht. Weil sich der Knockout ausschließlich auf den proximalen Tubulus beschränkte und im Glomerulus somit keine Deletion vorlag, ist davon auszugehen, dass die nachgewiesene Niereninsuffizienz am ehesten nicht auf einer glomerulär bedingten Störung beruht, sondern eher als Antwort der Niere auf die Störung des proximalen Tubulus zu betrachten ist.

Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion des Körpergewichtes, die am ehesten auf einen insgesamt gestörten Energiehaushalt zurückzuführen ist.

Diese Befunde untermauern die zu Beginn gestellte Hypothese, dass mTOR als ein intrazelluläres Schlüsselprotein eine große Bedeutung im Haushalt der proximal-tubulären Zelle zukommt. Diese Bedeutung wird umso deutlicher, wenn man berücksichtigt, dass im proximalen Tubulus verschiedenste Transportvorgänge von beispielsweise Proteinen, Glucose, Elektrolyten ablaufen, die nahezu alle durch mTOR reguliert werden. Dieser enge Zusammenhang spielt eine große Rolle, wenn es beispielsweise um Nebenwirkungen von mTOR-Inhibitoren geht.

Nichtdestotrotz bleiben die genauen molekularen Mechanismen, die für die erhobenen Befunde ursächlich sind, durch diese Arbeit ungeklärt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-484, doi:10.1016/j.cell.2006.01.016 (2006).
- 2 Peter C. Heinrich, M. M., Lutz Graeve. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9.Auflage edn, (2014).
- 3 Harris, T. E. & Lawrence, J. C., Jr. TOR signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**, re15, doi:10.1126/stke.2122003re15 (2003).
- 4 Grahammer, F., Wanner, N. & Huber, T. B. mTOR controls kidney epithelia in health and disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **29 Suppl 1**, i9-i18, doi:10.1093/ndt/gft491 (2014).
- 5 Hall, M. N. mTOR—What Does It Do? *Transplantation Proceedings* **40**, S5-S8, (2008).
- 6 Francipane, M. G. & Lagasse, E. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget* **5**, 49-66 (2014).
- 7 Pavlidou, A. & Vlahos, N. F. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer. *TheScientificWorldJournal* **2014**, 709736, doi:10.1155/2014/709736 (2014).
- 8 Edlind, M. P. & Hsieh, A. C. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian journal of andrology* **16**, 378-386, doi:10.4103/1008-682x.122876 (2014).
- 9 Wheler, J. J. *et al.* Anastrozole and everolimus in advanced gynecologic and breast malignancies: activity and molecular alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncotarget* **5**, 3029-3038 (2014).
- 10 Liu, J. *et al.* Evidence for mTOR pathway activation in a spectrum of epilepsy-associated pathologies. *Acta neuropathologica communications* **2**, 71, doi:10.1186/2051-5960-2-71 (2014).
- 11 Curatolo, P. Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) in Tuberous Sclerosis Complex-Associated Epilepsy. *Pediatric neurology*, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.10.028 (2014).
- 12 Inoki, K., Corradetti, M. N. & Guan, K. L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature genetics* **37**, 19-24, doi:10.1038/ng1494 (2005).
- 13 Jacinto, E. & Hall, M. N. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 117-126, doi:10.1038/nrm1018 (2003).
- 14 Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* **16**, 1472-1487, doi:10.1101/gad.995802 (2002).
- 15 Ruvinsky, I. *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* **19**, 2199-2211, doi:10.1101/gad.351605 (2005).

- 16 Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* **12**, 502-513 (1998).
- 17 Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N. & Sonenberg, N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *The EMBO journal* **15**, 658-664 (1996).
- 18 Fingar, D. C. & Blenis, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**, 3151-3171, doi:10.1038/sj.onc.1207542 (2004).
- 19 Jacinto, E. *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* **6**, 1122-1128, doi:10.1038/ncb1183 (2004).
- 20 Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB* **14**, 1296-1302, doi:10.1016/j.cub.2004.06.054 (2004).
- 21 Inoki, K. & Guan, K.-L. Complexity of the TOR signaling network. *Trends in Cell Biology* **16**, 206-212,(2006).
- 22 Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323-335, doi:10.1038/nature09782 (2011).
- 23 Kroemer, G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *The Journal of clinical investigation* **125**, 1-4, doi:10.1172/jci78652 (2015).
- 24 Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D. H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* **584**, 1287-1295, doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017 (2010).
- 25 Cunningham, J. T. *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* **450**, 736-740, doi:10.1038/nature06322 (2007).
- 26 Kim, J. E. & Chen, J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **53**, 2748-2756 (2004).
- 27 Rosen, E. D. *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell* **4**, 611-617 (1999).
- 28 Peterson, T. R. *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* **146**, 408-420, doi:10.1016/j.cell.2011.06.034 (2011).
- 29 Sakai, J. & Rawson, R. B. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Current opinion in lipidology* **12**, 261-266 (2001).
- 30 Ozes, O. N. *et al.* A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4640-4645, doi:10.1073/pnas.051042298 (2001).

- 31 Li, J., DeFea, K. & Roth, R. A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9351-9356 (1999).
- 32 Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Toker, A. Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668, doi:10.1126/science.275.5300.665 (1997).
- 33 Sun, X. J. *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77 (1991).
- 34 Hara, K. *et al.* Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**, 14484-14494 (1998).
- 35 Gao, X. *et al.* Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 699-704, doi:10.1038/ncb847 (2002).
- 36 Lieberthal, W. & Levine, J. S. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **20**, 2493-2502, doi:10.1681/asn.2008111186 (2009).
- 37 Shaw, R. J. *et al.* The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell* **6**, 91-99, doi:10.1016/j.ccr.2004.06.007 (2004).
- 38 Su, D., Stamatakis, L., Singer, E. A. & Srinivasan, R. Renal cell carcinoma: molecular biology and targeted therapy. *Current opinion in oncology* **26**, 321-327, doi:10.1097/cco.000000000000069 (2014).
- 39 Serra, A. L. & Wuthrich, R. P. [Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): rapamycin as a new treatment option]. *Praxis* **98**, 1511-1516, doi:10.1024/1661-8157.98.25.1511 (2009).
- 40 Xue, C., Dai, B. & Mei, C. Long-term treatment with mammalian target of rapamycin inhibitor does not benefit patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. *Nephron. Clinical practice* **124**, 10-16, doi:10.1159/000354398 (2013).
- 41 Lieberthal, W. *et al.* Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **281**, F693-706 (2001).
- 42 Lieberthal, W., Fuhro, R., Andry, C., Patel, V. & Levine, J. S. Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance. *Transplantation* **82**, 17-22, doi:10.1097/01.tp.0000225772.22757.5e (2006).
- 43 Smith, K. D. *et al.* Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **14**, 1037-1045 (2003).
- 44 Godel, M. *et al.* Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2197-2209, doi:10.1172/jci44774 (2011).
- 45 Torras, J. *et al.* Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European*

- Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **24**, 3632-3640, doi:10.1093/ndt/gfp367 (2009).
- 46 Canaud, G. *et al.* AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. *Nature medicine* **19**, 1288-1296, doi:10.1038/nm.3313 (2013).
- 47 Inoki, K. Role of TSC-mTOR pathway in diabetic nephropathy. *Diabetes research and clinical practice* **82 Suppl 1**, S59-62, doi:10.1016/j.diabres.2008.09.028 (2008).
- 48 Molitch, M. E. *et al.* Nephropathy in diabetes. *Diabetes care* **27 Suppl 1**, S79-83 (2004).
- 49 Lee, M. J. *et al.* A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**, F617-627, doi:10.1152/ajprenal.00278.2006 (2007).
- 50 Chen, J. K., Chen, J., Neilson, E. G. & Harris, R. C. Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **16**, 1384-1391, doi:10.1681/asn.2004100894 (2005).
- 51 Ito, N. *et al.* mTORC1 activation triggers the unfolded protein response in podocytes and leads to nephrotic syndrome. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **91**, 1584-1595, doi:10.1038/labinvest.2011.135 (2011).
- 52 Rangan, G. K. & Coombes, J. D. Renoprotective effects of sirolimus in non-immune initiated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **22**, 2175-2182, doi:10.1093/ndt/gfm191 (2007).
- 53 Bonegio, R. G. *et al.* Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **16**, 2063-2072, doi:10.1681/asn.2004030180 (2005).
- 54 Kurayama, R. *et al.* Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **91**, 992-1006, doi:10.1038/labinvest.2011.43 (2011).
- 55 Morales, J. M. *et al.* Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2**, 436-442 (2002).
- 56 Morales, J. M. *et al.* Tubular function in patients with hypokalemia induced by sirolimus after renal transplantation. *Transplant Proc* **35**, 154s-156s (2003).
- 57 Kempe, D. S. *et al.* Rapamycin-induced phosphaturia. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **25**, 2938-2944, doi:10.1093/ndt/gfq172 (2010).

- 58 Haller, M. *et al.* Sirolimus induced phosphaturia is not caused by inhibition of renal apical sodium phosphate cotransporters. *PloS one* **7**, e39229, doi:10.1371/journal.pone.0039229 (2012).
- 59 Lu, M., Wang, J., Ives, H. E. & Pearce, D. mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry* **286**, 30647-30654, doi:10.1074/jbc.M111.257592 (2011).
- 60 Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X. & Guan, K. L. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO journal* **27**, 1919-1931, doi:10.1038/emboj.2008.119 (2008).
- 61 Lin, D., Sterling, H., Lerea, K. M., Giebisch, G. & Wang, W. H. Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels. *The Journal of biological chemistry* **277**, 44278-44284, doi:10.1074/jbc.M203702200 (2002).
- 62 Grahammer, F. *et al.* mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is essential in response to ischemic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E2817-2826, doi:10.1073/pnas.1402352111 (2014).
- 63 Shegogue, D. & Trojanowska, M. Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23166-23175, doi:10.1074/jbc.M401238200 (2004).
- 64 Lock, H. R., Sacks, S. H. & Robson, M. G. Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**, F76-81, doi:10.1152/ajprenal.00128.2006 (2007).
- 65 Liu, Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 1-12 (2004).
- 66 Lloberas, N. *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 1395-1404, doi:10.1681/asn.2005050549 (2006).
- 67 Wu, M. J. *et al.* Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney international* **69**, 2029-2036, doi:10.1038/sj.ki.5000161 (2006).
- 68 Diekmann, F. *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**, 2653-2660, doi:10.1681/asn.2007010087 (2007).
- 69 Schmidt, L. *Physiologie des Menschen*. (2011).
- 70 Behrends, J., Bischofberger, J. & Deutzmann, R. *Duale Reihe Physiologie*. (Thieme, 2012).
- 71 Pape, H. C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Physiologie*. (Thieme, 2014).

- 72 Stricklett, P. K., Nelson, R. D. & Kohan, D. E. The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *The American journal of physiology* **276**, F651-657 (1999).
- 73 Cre *Lox*, <https://de.wikipedia.org/wiki/Cre/loxP-System#/media/File:CreLoxP_Modellversuch.png> (
- 74 Laury, A. R. *et al.* A comprehensive analysis of PAX8 expression in human epithelial tumors. *The American journal of surgical pathology* **35**, 816-826, doi:10.1097/PAS.0b013e318216c112 (2011).
- 75 *Photometer*, <<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/photometer/51334>> (
- 76 *Flammenphotometer*, <<http://www.labexchange.com/nc/de/laborgeraete-kaufen/d/serial/21905/>> (
- 77 Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. (2008).
- 78 *Fluoreszenzmessung*, <<http://www.photometer.com/de/abc/show.html?q=Fluoreszenzmessung>> (
- 79 Goldsby, K., Kuby, Osborne. *Immunology*. 5th edn, (2002).
- 80 *Kreatinin*, <<http://flexikon.doccheck.com/de/Kreatinin>> (
- 81 Kessler, M. A., Meinitzer, A. & Wolfbeis, O. S. Albumin blue 580 fluorescence assay for albumin. *Analytical biochemistry* **248**, 180-182, doi:10.1006/abio.1997.2113 (1997).
- 82 Thorsten Kuwert , F. G., Uwe Haberkorn , Thomas Krause. *Nuklearmedizin*. (2007).
- 83 <http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>
- 84 Ulrich Kuhlmann , J. B., Friedrich C. Luft , Mark Dominik Alscher , Ulrich Kunzendorf. *Nephrologie*. (2015).
- 85 Herold, G. *Innere Medizin*. (Gerd, Herold, 2012).
- 86 Schneemann, H., Young, L. & Koda-Kimble, M. A. *Angewandte Arzneimitteltherapie: Klinisch-pharmazeutische Betreuung in Fallbeispielen*. (Springer Berlin Heidelberg, 2012).

7 Erklärung zum Eigentel

Die Konzeption dieser Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Artunc.

Die Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Prof. Artunc und unser Labormitglied Bernhard Bohnert, von mir eigenständig durchgeführt. Die Aldosteronmessung wurde durch unsere Laborassistentin (MTA) Frau Raiser durchgeführt. Die Aminosäurenmessung wurde im Rahmen unserer Zusammenarbeit durch Prof. Dr. Jörn Oliver Sass am Universitäts-Kinderspital Zürich durchgeführt.

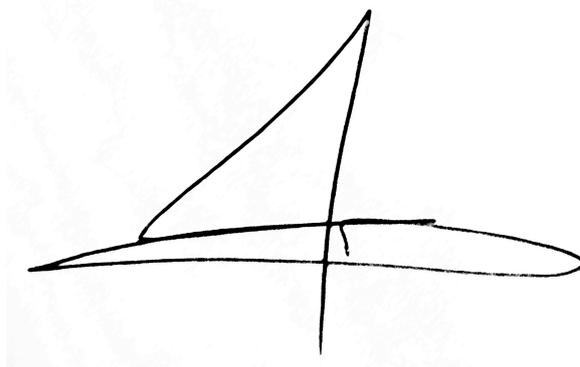
Die Tiere habe ich von Dr. F. Grahammer, Nephrologie- Uniklinik Freiburg bekommen.

Unterstützung bei der sprachlichen Bearbeitung habe ich freundlicherweise durch meinen Doktorvater Prof. Artunc und unser Labormitglied Bernhard Bohnert erhalten.

Die gesamte Auswertung erfolgte durch mich.

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

Tübingen, den

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'A' with a horizontal stroke extending to the right and a vertical stroke extending downwards.

8 Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf dem folgenden Kongress präsentiert:

Sechste Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 2014:
„Die induzierbare Deletion des mTOR-Komplexes 1 und 2 führt zu einer proximal-tubulären Dysfunktion“

H Khatib, M Roerden, F Grahammer, JO Sass, Theilig F, M Hall, M Ruegg, TB Huber, F Artunc.

Eine Publikation ist in Planung.

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Artunc, der mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand, viele seiner freien Abende für mich opferte und mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Ich danke meinem Kommilitonen, Labormitglied und Freund Bernhard Bohnert, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Ich danke meinen Kollegen im Labor, die mich in angespannter und gestresster Laune ertrugen und mir jeder Zeit an der Seite standen, wenn etwas schiefging.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hazim Khatib
Geburtsdatum: 28.10.1989

Akademische Laufbahn

1996-2005	Grund- und Mittelschule (Ort, Israel)
2005-2007	Gymnasium (Ort, Israel)
2007	Abschluss: Abitur (Ort, Israel)
2008	Erlernen der deutschen Sprache und Ablegen der DSH-Prüfung
04/2009 – 04/2014	Medizinstudium an der Universität Tübingen
03/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
04/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
06/2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
05/2014 – 04/2015	Praktisches Jahr (PJ) in folgender Abfolge: 1. Tertial: Neurologie, Universitätsklinik Tübingen 2. Tertial: Innere Medizin, RBK-Stuttgart 3. Tertial: Chirurgie, RBK-Stuttgart
11/2012- 2015	Promotion im Bereich der Nephrologie an der Universitätsklinik Tübingen mit dem Thema: <i>„Renaler Phänotyp der induzierbaren tubulären Deletion von mTORC1 und mTORC2 im Mausmodell“</i>