

Aus dem Department Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin IV
Schwerpunkt: Nephrologie und Allgemeinmedizin
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau



**Die Rolle der mTOR-Komplexe für den Salz- und Wasserhaushalt im Tubulusepithel
der Niere sowie bei akutem Nierenversagen**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2012

von Frederic Steinhardt
geboren in Freiburg im Breisgau

Dekanin: Prof. Dr. Kerstin Krieglstein
Erster Gutachter: Prof. Dr. Tobias B. Huber
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Robert Zeiser

Jahr der Promotion: 2014

Meiner Familie und meinen Freunden

Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD2	<i>11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2;</i> 11 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2
4E-BPs	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins;</i> eukaryote Translations-Initiations-Faktor 4E-bindende Proteine
Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
Akt/PKB	<i>protein kinase B;</i> Protein-Kinase B
ASDN	<i>aldosterone-sensitive distal nephron;</i> Aldosteron-sensitives distales Nephron
CD	<i>collecting duct;</i> Sammelrohr
CNT	<i>connecting tubule;</i> Verbindungstubulus
Cre	<i>cyclization recombination;</i> ringbildende Rekombination
DBA	Dolichus biflorus Agglutinin
DCT	<i>distal convoluted tubule;</i> Distaler Tubulus <i>Pars Convoluta</i>
DEPTOR	<i>dishevelled, EGL-10 and pleckstrin with TOR;</i> Dishevelled, EGL-10 und Pleckstrin mit TOR
EGF	<i>epidermal growth factor;</i> Epidermaler Wachstumsfaktor
ENaC	<i>epithelial Na channel;</i> Epitelialer Na-Kanal
flox	<i>flanked by loxP;</i> von <i>loxP</i> -Stellen flankiert
GAP	<i>GTPase-activating proteine;</i> GTPase-aktivierendes Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IRS	Insulinrezeptor Substrat
Ki-67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67;</i> durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 identifiziertes Antigen
KSP-Cadherin	<i>kidney-specific p-cadherin;</i> nierenspezifisches P- Cadherin

mLST8	<i>mammalian lethal with SEC13 protein8</i> ; tödlich mit SEC13 Protein8 in Säugetieren
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mSIN1	<i>mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i> ; mit der Stress-aktivierten Kinase interagierendes Protein 1 in Säugetieren
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> ; Zielstruktur von Rapamycin in Säugetieren
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i> ; mTOR-Komplex 1
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i> ; mTOR-Komplex 2
NCC	Na ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin 2</i> ; neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin 2
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
OSR1	<i>oxidative stress-responsive kinase 1</i> ; Auf oxidativen Stress reagible Kinase 1
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> ; in proliferierenden Zellen auftretendes Zellkern-Antigen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i> ; Phosphoinositid-3-Kinase
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40kDa</i> ; Prolinreiches Akt-Substrat von 40kDa
PROTOR	<i>protein observed with Rictor</i> ; mit Rictor beobachtetes Protein
PTH	Parathormon
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAPTOR	<i>regulatory associated protein of TOR</i> ; regulatorisch assoziiertes Protein von TOR
Ras	<i>ras-homolog enriched in brain</i> ; im Gehirn

RICTOR	angereichertes Ras-Homolog <i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i> ; Rapamycin-unsensibler Begleiter von mTOR
ROMK	<i>renal outer medulla kalium channel</i> ; Im äußeren Mark der Niere vorkommender Kalium-Kanal
RPF	Renaler Plasmafluss
rtTa	<i>reverse Tetracycline-controlled transcriptional activator</i> ; reverses tetrazyklin-kontrolliertes Aktivierungssystem
S6K1/2	<i>ribosomal S6 kinases 1/2</i> ; ribosomale S6-Kinasen 1/2
SGK1	<i>serum and glucocorticoid-inducible kinase 1</i> ; Serum und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1
SPAK	<i>STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase</i> ; STE20/SPS1-verwandte Prolin/Alanin-reichhaltige Kinase
TAL	<i>thick ascending limb of Henle's loop</i> ; distaler Tubulus <i>Pars recta</i>
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TRPM6	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6</i> ; transientes Rezeptorpotential Kationen-Kanal der Unterfamilie M, Mitglied 6
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i> ; tuberöse Sklerose-Komplex
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
WNK	<i>with no lysine (K)</i> ; ohne Lysin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Anatomie des Nephrons.....	12
Abbildung 2: Übersicht über die Transporter des proximalen Tubulus.....	14
Abbildung 3: Übersicht der Ionenkanäle der TAL.....	15
Abbildung 4: Übersicht über die an der Mg ²⁺ -Ionen-Resorption beteiligten Proteine.....	17
Abbildung 5: Übersicht über die an der Ca ²⁺ -Ionen Resorption beteiligten Proteine.....	18
Abbildung 6: Übersicht über die Zelltypen des CNT und ihre Transporter.....	19
Abbildung 7: Regulatorische Vorgänge bei Hyperkaliämie im distalen Tubulus.....	22
Abbildung 8: Schematische Übersicht über die den ENaC regulierenden Faktoren.....	23
Abbildung 9: Das Regulationsnetzwerk der mTOR-Komplexe.....	25
Abbildung 10: Das rtTA-System.....	38
Abbildung 11: Blutversorgung des Nephrons.....	45
Abbildung 12 : Übersichtspanel der <i>Rap^{f/f}KspCre</i> -Serie.....	59
Abbildung 13: Urinfluss bei der <i>Rap^{f/f}KspCre</i> -Serie.....	62
Abbildung 14: Eröffneter Retroperitonealraum mit freipräpariertem Ureter.....	62
Abbildung 15: MRT Untersuchung der Nieren von Mäusen der <i>Rap^{f/f}KspCre</i> -Serie.....	63
Abbildung 16: Quantifikation verschiedener Ionentransporter im Western-Blot.....	64
Abbildung 17: Untersuchung von Aquaporin 2 im Western-Blot.....	65
Abbildung 18: Untersuchung von PGC1- α in Medulla-Lysaten.....	65
Abbildung 19: Serum Kreatinin- und Harnstoffwerte der <i>Rap^{f/f}Pax8rtTATetOCre</i> -Mauslinie	66
Abbildung 20: Histologische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung der unbehandelten Tiere.....	67
Abbildung 21: Darstellung von NGAL im Western-Blot aus Urin der I/R-Tiere.....	68
Abbildung 22: Histologie in der PAS-Färbung nach erfolgter I/R-Behandlung zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten.....	69
Abbildung 23: Darstellung von <i>active-Caspase3</i> und <i>Ki-67</i> in der Immunfluoreszenz sowie deren Quantifikation.....	71
Abbildung 24: PAS-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung von Wildtypen und <i>Ric^{f/f}KspCre</i> -Gewebe.....	73
Abbildung 25: Gewichtsverlauf während der Belastungstests.....	74
Abbildung 26: Darstellung von P-Ser473-Akt in medullären Sammelrohren in den unterschiedlichen Gruppen.....	75

Abbildung 27: Darstellung von P-Ser422-SGK1 in medullären Sammelrohren in den unterschiedlichen Gruppen.....	76
Abbildung 28: Western-Blots von α ENaC, total-AKT und P-Ser473-AKT.....	77
Abbildung 29: Diagramme zur Darstellung des α ENaC-Gehaltes und zur Relation P-Ser-473-AKT/total-AKT in den Lysaten .	78

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	12
1.1.	Aufbau und Funktion der Niere	12
1.2.	Die Tubulusfunktion	13
1.2.1.	Der Proximale Tubulus	13
1.2.2.	Phosphat-Resorption im proximalen Tubulus.....	14
1.2.3.	Die Henle-Schleife	15
1.2.4.	Der distale Tubulus	16
1.2.5.	Der Verbindungstubulus	19
1.2.6.	Das Sammelrohr	20
1.2.7.	Hormonelle Regulation des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons.....	20
1.3.	Der mTOR-Signalweg und die mTOR-Komplexe.....	23
1.4.	Renale mTOR Physiologie – Der aktuelle Stand	26
1.5.	Fragestellung dieser Arbeit	27
2.	Material und Methoden	28
2.1.	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	28
2.1.1.	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2.	Geräte	29
2.1.3.	Software	30
2.1.4.	Chemikalien	30
2.1.5.	Lösungen	31
2.1.6.	Reagenzien	33
2.1.7.	Primer	33
2.1.8.	Antikörper	34
2.2.	Mausmodelle	35
2.2.1.	Tierhaltung	35
2.2.1.	Das Cre/loxP – System.....	35
2.2.2.	Verwendete Mauslinien.....	36
2.2.3.	Kreuzungen	38
2.3.	Genotypisierung	39
2.3.1.	DNA Aufreinigung.....	39
2.3.2.	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese.....	40
2.4.	Stressmodelle	44

2.4.1.	Niedrig-Salz-Diät	44
2.4.2.	Triamteren	44
2.4.3.	Das Ischämie-Reperfusion-Modell	44
2.5.	Gewebebegewinnung	47
2.5.1.	Präparation und Fixation der Nieren	47
2.5.2.	Gewinnung von Urin	48
2.5.3.	Blutentnahme	48
2.6.	Analyse der Nierenfunktion	48
2.6.1.	Gewichtsbestimmung	48
2.6.2.	Harnstoff.....	49
2.6.3.	Kreatinin.....	50
2.6.4.	Elektrolyte	51
2.7.	Westernblot	51
2.7.1.	Herstellung von Gesamtnierenlysaten.....	51
2.7.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	52
2.7.3.	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	53
2.8.	Mikroskopie	55
2.8.1.	Immunfluoreszenz-Färbung	55
2.8.2.	PAS-Färbung.....	57
2.8.3.	Transmissionselektronentomographie.....	57
2.9.	Magnetresonanztomographie	57
2.10.	Statistische Datenanalyse	58
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Die <i>Rap^{fl/fl}KspCre</i> -Mauslinie.....	59
3.1.1.	Nachweis des tubuluspezifischen Knockouts von <i>Raptor</i> und der Phänotyp... 59	
3.1.2.	Auffälligkeiten und Makroskopie	61
3.1.3.	Untersuchung von Ionentransportern und -Kanälen im Western-Blot.....	63
3.2.	Die <i>Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre</i> -Mauslinie	66
3.3.	Die <i>Ric^{fl/fl}KspCre</i> -Mauslinie.....	73
4.	Diskussion	79
4.1.	Die <i>Rap^{fl/fl}KspCre</i> -Mauslinie.....	79
4.2.	Die <i>Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre</i> -Mauslinie	81
4.3.	Die <i>Ric^{fl/fl}KspCre</i> -Mauslinie.....	84
5.	Zusammenfassung.....	87

6.	Literaturverzeichnis.....	88
7.	Lebenslauf.....	96
8.	Danksagung.....	97

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig vorkommendes Ausscheidungsorgan, das eine essentielle Rolle bei der Wasser- und Salzhomöostase einnimmt sowie maßgeblich an der Einstellung des Blutdrucks beteiligt ist. Sie reguliert den Säure-Basen-Haushalt und erfüllt endokrine Funktionen, wie beispielsweise die Produktion des bei der Blutbildung benötigten Erythropoietin und die Umwandlung des für den Kalziumhaushalt kritischen Kalzitriols in die aktive Form. Das im Retroperitonealraum liegende, von sowohl einer Fett- als auch Bindegewebskapsel umgebene Organ, lässt sich makroskopisch in Nierenrinde und Nierenmark einteilen.

In der Rinde befinden sich die Ursprünge aller funktionalen Einheiten der Niere: die Glomerula. Der Mensch besitzt pro Niere zirka eine Million Stück dieser Filtrationseinheiten. Sie bestehen aus einem Kapillarkonvolut umgeben von einer doppelwandigen Kapsel, der sogenannten Bowman-Kapsel, welche den Beginn des Tubulussystem darstellt. Dieses mündet schließlich in das Sammelrohr, von dem sich mehrere zu großen Ausführungsgängen vereinigen und offen in der Papille münden. Die Gesamtheit des Glomerulum mit sich anschließendem Tubulusapparat wird als Nephron bezeichnet.

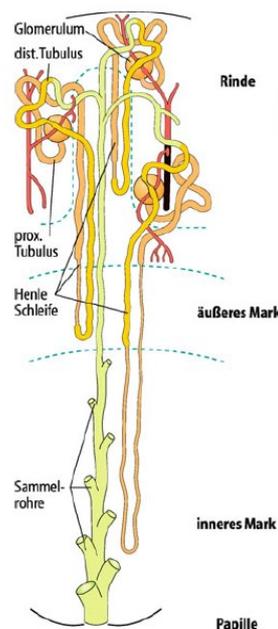


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Anatomie des Nephrons mit seinen unterschiedlichen Anteilen (Schmidt *et al.* 2010).

Die von der Aorta abgehenden Nierenarterien verzweigen sich in ein komplexes Gefäßsystem, welches, die dem Glomerulum vor- und nachgeschalteten, Vasa afferens und efferens hervorbringt. Im Kapillarkonvolut herrscht ein hoher Druck von bis zu 55 mmHg, der dazu führt, dass Wasser und darin gelöste Stoffe abfiltriert, zelluläre Blutbestandteile und Proteine bis zu einer Größe von 69 kDa jedoch zurückgehalten werden. Diese Aufgabe wird durch einen größenselektiven Filter gewährleistet, der aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Fußfortsätzen der Podozyten, mit dazwischen aufgespannter Schlitzmembran, besteht. Hat das Filtrat diesen Filter durchlaufen, wird es als Primärharn bezeichnet. Von den so entstehenden 180 l pro Tag wird bei der Passage durch das Tubulussystem allerdings der größte Teil wieder zurückgewonnen und ein konzentrierter Endharn von zirka 1,5 l pro Tag über die ableitenden Harnwege ausgeschieden (Lüllmann-Rauch 2006).

1.2. Die Tubulusfunktion

Das Tubulussystem mit seinen verschiedenen Abschnitten spielt bei der Herstellung des Endharns die zentrale Rolle. Es sorgt dafür, dass für den Körper wichtige Ionen, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Glukose und vor allem Wasser aus dem Primärharn rückresorbiert werden. Die Ionen- und Wasserresorptionsprozesse haben dabei entscheidenden Einfluss auf die Einstellung des Blutdrucks, sowie die sehr sensible Homöostase des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Körpers. Diese Vorgänge werden auf extrazellulärer Ebene über Hormone reguliert und die ankommenden Signale anschließend intrazellulär über ein extrem komplexes, in großen Teilen bisher unzureichend verstandenes, Signalnetzwerk aus Ionenkanälen, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren als Effektoren der Hormone integriert.

1.2.1. Der proximale Tubulus

Der proximale Tubulus besteht ultrastrukturell aus den Segmenten S1-S3 (Kriz, Bankir 1988). Er weist eine sehr hohe Transportkapazität auf, kann dabei jedoch keine hohen Konzentrationsgradienten aufbauen. Antrieb für die zahlreichen Resorptionsprozesse ist der energieintensive, durch die basolateral sitzende Na^+/K^+ -ATPase aufgebaute, Na^+ -Gradient. Dieser Gradient ermöglicht die gekoppelte apikale Aufnahme von Na^+ mit Nährstoffen. Dieses Prinzip findet sich in den anderen Tubulusabschnitten mit anderen Bestandteilen ebenfalls wieder (Lüllmann-Rauch 2006).

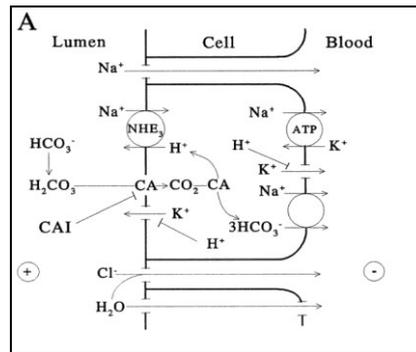


Abbildung 2: Übersicht über die Transporter des proximalen Tubulus (Greger 2000).

Über diesen sekundär aktiven Transport werden Phosphat, Glukose, Aminosäuren, Laktat, Sulfat und weitere Substanzen resorbiert.

Die apikale Membran weist außerdem den Na^+/H^+ - Antiporter auf, welcher in Kombination mit dem sowohl im Bürstensaum als auch zytosolisch vorkommenden Enzym Karboanhydrase und dem basal lokalisierten $3 \text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ -Symporter für die Rückresorption von Bikarbonat (HCO_3^-) verantwortlich ist. Des Weiteren spielt der Na^+/H^+ -Antiporter eine wichtige Rolle im Säuren-Basen-Haushalt: Ein zytosolisch saurer pH-Wert bei Azidose führt zur vermehrten H^+ -Exkretion und damit zur gesteigerten Bikarbonat-Resorption, wobei umgekehrt zytosolisch alkalische pH-Werte zum Gegenteil führen (Greger 2000).

Durch die starke Resorption von osmotisch aktiven Substanzen entlang des proximalen Tubulus folgt H_2O durch lecke *tight junctions* nach; dabei werden darin gelöste Stoffe mitresorbiert (*solvent drag*).

Durch die entlang des Tubulus stattfindenden Aufnahmeprozesse entstehen unterschiedliche luminal Potenziale, die ebenfalls zur weiteren Resorption von Ionen beitragen (Schmidt *et al.* 2010).

1.2.2. Phosphat-Resorption im proximalen Tubulus

Im proximalen Tubulus, insbesondere im S-1 Segment, findet die hauptsächliche Resorption von organischem Phosphat (P_i) statt. Die P_i -Konzentration im Plasma entspricht ungefähr der in der Bowman-Kapsel. Unter normalen Bedingungen werden entlang des proximalen Tubulus etwa 80% der filtrierten Menge über sekundär-aktive Transportprozesse wiederaufgenommen. Die Resorption erfolgt im Symport mit Na^+ -Ionen über die Transporter NaPi-IIa und NaPi-IIc, die ausschließlich in diesem Teil des Tubulussystems exprimiert werden (Biber *et al.* 2009).

1.2.3. Die Henle-Schleife

Die Bezeichnung „Henle-Schleife“ umfasst das S-3 Segment des proximalen Tubulus, die *thin descending and ascending loop of Henle* und die *Pars recta* des distalen Tubulus (=Thick Ascending Limb of Henle's loop = TAL). Da dieser Begriff sehr verbreitet ist, soll er hier zum Einsatz kommen (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Henle-Schleife ist für den Vorgang der Harnkonzentrierung essentiell: NaCl-Resorption in der TAL über den furosemidsensitiven $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ - Kotransporter (NKCC2), dem H_2O aufgrund impermeabler *tight junctions* nicht folgen kann, führt zu einem hypotonen Harn und einem hypertonen Interstitium. Dieses wiederum unterstützt die Rückresorption von Wasser im absteigenden Teil der Henle-Schleife, wo die *tight junctions* für Wasser permeabel sind und im Sammelrohr, in dem die Wasserresorption, abhängig vom Einbau von Aquaporinen in die apikale Membran, gesteuert wird.

Die treibende Kraft für diesen Prozess ist der oben bereits erläuterte, durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaute Gradient für Na^+ -Ionen (Greger 2000).

1.2.3.1. Magnesium-Resorption in der TAL

Die Niere ist für die Aufrechterhaltung der Mg^{++} -Homöostase unabdingbar. Es werden zwischen 95% und 98% der filtrierten Mg^{++} -Menge zurückgehalten. Zwar wird auch ein geringer Anteil (~10%) im bereits beschriebenen proximalen Tubulus resorbiert, den quantitativ bedeutsamsten Anteil (~60-70%) leistet jedoch die TAL. Dabei dient ein lumenpositives, transepitheliales Potenzial als Antrieb für den passiven, auf parazellulärem Weg, durch die *tight junction* Proteine Claudin 16/19 vermittelten, stattfindenden Resorptionsprozess (San-Cristobal *et al.* 2010).

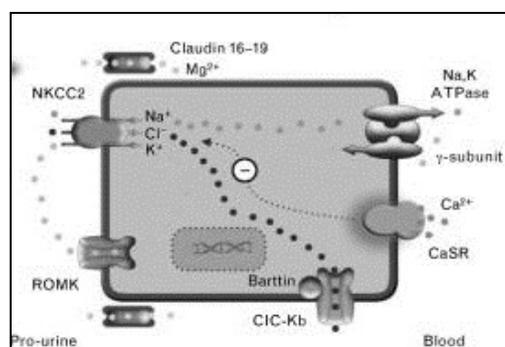


Abbildung 3: Übersicht der Ionenkanäle der TAL (San-Cristobal *et al.* 2010).

1.2.3.2. Calcium-Resorption in der TAL

Der Anteil der in der TAL resorbierten Ca^{2+} -Ionen ist mit ~25% der filtrierten Menge eher gering und erfolgt auf dem gleichen Wege wie die Wiederaufnahme des anderen divalenten Kations Magnesium: Das lumenpositive Potenzial führt zur Resorption auf parazellulärem Wege über durchlässige *tight junction* Proteine (Dimke *et al.* 2010).

1.2.3.3. Hormonelle Regulation der TAL

Das von der Neurohypophyse sezernierte Anti-diuretische Hormon (ADH), das von den Nebenschilddrüsen produzierte Parathormon (PTH) und das aus der Schilddrüse stammende Calcitonin sowie die Stresshormone Adrenalin und Glucagon stimulieren die Rückresorptionsrate in der TAL. Prostaglandin E_2 hingegen senkt die Rückresorptionsrate (Greger 2000).

1.2.3.4. Das Bartter-Syndrom

Bei diesem von Bartter *et al.* 1962 (Bartter *et al.* 1962) ursprünglich als „Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis“ beschriebenen Syndrom, handelt es sich um einen Symptomenkomplex aus Na^+/Cl^- -Verlust über die Niere, begleitet von einer hypokalämischen, metabolischen Alkalose sowie Hyperreninämie, Hyperaldosteronismus und Prostaglandin E_2 - Übersekretion. Dabei lässt sich ein normaler oder erniedrigter Blutdruck feststellen. Diese Befunde kommen durch Mutationen von Ionenkanälen der TAL zustande (Dimke *et al.* 2010).

1.2.4. Der distale Tubulus

Der distale Tubulus beinhaltet die *Pars recta*, die als Teil der Henleschen Schleife bereits beschrieben wurde und die *Pars convoluta* (=Distal Convoluted Tubule, DCT) (Lüllmann-Rauch 2006).

Der DCT spielt bei sowohl bei der Feinregulation der NaCl -Homöostase als auch bei der Resorption der divalenten Kationen Ca^{++} und Mg^{++} eine entscheidende Rolle.

Die Resorption von NaCl erfolgt über den, durch Thiazide hemmbaren, Na^+/Cl^- -Symporter entlang eines steilen Na^+ -Gradienten. Dabei ist dieses Tubulussegment insofern besonders, als dass es einen hohen Reichtum an Mitochondrien und sehr hohe Expressionslevel der Na^+/K^+ -ATPase aufweist. Der DCT lässt sich anhand des Vorkommens des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauschers

und ENaC noch weiter in DCT1 und DCT2 aufteilen: Der Austauscher und ENaC finden sich nur in den Zellen des DCT2 wieder.

Der ROMK-Kanal ist in der luminalen Membran der DCT1&2-Zellen ebenfalls vorhanden und dient auch hier der Exkretion der, durch die Na^+/K^+ -ATPase in die Zelle beförderten, K^+ -Ionen (Bachmann *et al.* 1999). Das resorbierte Cl^- -Ion kann die Zelle wahrscheinlich über den basalen K^+/Cl^- -Symporter wieder verlassen (Greger 2000).

1.2.4.1. Magnesium-Resorption in im DCT

Der DCT stellt das einzige Segment im Tubulussystem dar, in dem eine aktive Resorption von Mg^{++} -Ionen, zirka 10% der filtrierten Menge, erfolgt. Dies unterstreicht seine zentrale Bedeutung als Feineinstellungsglied, insbesondere da hiernach keine weitere Resorption erfolgt und das nicht wiederaufgenommene Magnesium über den Urin den Körper verlässt (San-Cristobal *et al.* 2010).

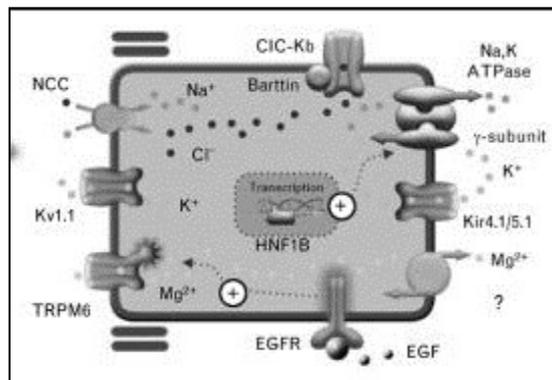


Abbildung 4: Übersicht über die an der Mg^{2+} -Ionen-Resorption beteiligten Proteine (San-Cristobal *et al.* 2010).

1.2.4.2. Calcium-Resorption im DCT

Ähnlich der Magnesium-Resorption erfolgt die Kalzium-Resorption im DCT transzellulär und sehr strikt reguliert, die beteiligten Kanäle, Proteine und Hormone sind in Abb. 5 dargestellt (Lambers *et al.* 2006).

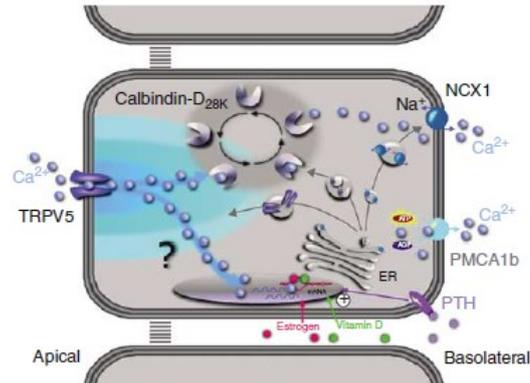


Abbildung 5: Übersicht über die an der Ca²⁺-Ionen Resorption beteiligten Proteine (modifiziert nach (Lambers *et al.* 2006)).

1.2.4.3. Hormonelle Regulation des DCT

Die Regulation des DCT ist ein äußerst komplexes, in vielerlei Hinsicht auch noch nicht verstandenes, Zusammenspiel auf mehreren Ebenen zwischen zahlreichen Hormonen und Botenstoffen.

In den letzten Jahren ist in Übersichtsartikeln versucht worden, das komplexe, das distale Nephron regulierende, Netzwerk zu entschlüsseln. Dabei spielen insbesondere das Hormon Aldosteron und die von Aldosteron induzierte SGK1 (Serum-and-Glucocorticoid-inducible kinase 1) sowie das dem RAAS-System angehörende Angiotensin-II eine wichtige Rolle. Diese interagieren mit einer Familie von „with-no-k (Lysin)“-Kinasen (WNK) und den SPAK (STE20-related proline-alanine-rich kinase)- und OSR1 (oxidative stress response 1 kinase)-Signalwegen um die Wasser- und NaCl-Homöostase des Körpers sehr fein an die aktuellen Bedürfnisse anzupassen (Dimke 2011). Dabei wird, bedingt durch die Ausstattung der Zellen mit den, für die Aldosteron-Wirkung benötigten, Rezeptoren ein sogenanntes aldosteron sensitives distales Nephron (ASDN) geschaffen. Dieses besteht aus dem DCT2, dem Verbindungstubulus sowie dem Sammelrohr. Nur dort kann Aldosteron seine Wirkung entfalten (Bostanjoglo *et al.* 1998). Ein genauerer Erklärungsansatz folgt weiter unten.

1.2.4.4. Das Gitleman-Syndrom

Ursprünglich von Gitleman *et al.* (Gitelman *et al.* 1966) beschrieben, handelt es sich bei dieser Erkrankung um eine autosomal-rezessiv vererbte Tubulopathie. Hypokalämische metabolische Alkalose, Hypomagnesiämie und Hypocalciurie stehen bei diesem Salzverlust-Syndrom im Vordergrund. Durch eine Mutation im SLC12A3-Gen kommt es zu einer Beeinträchtigung des thiazid-sensitiven Natrium-Chlorid-Cotransporters (NCC). Der dadurch

bedingte Volumenverlust führt zu einer gesteigerten proximal tubulären Natriumresorption, welche eine gesteigerte parazelluläre Calcium-Ionen-Resorption nach sich zieht und dadurch eine Hypocalciurie hervorruft. Die charakteristische Hypomagnesiämie entsteht durch einen Mangel des oben beschriebenen TRPM6-Kanals im DCT (Dimke *et al.* 2010).

1.2.5. Der Verbindungstubulus

Der recht kurze Verbindungstubulus (CNT) verbindet das distale Konvolut und das Sammelrohr. Dabei spielt er für die Feinregulation des NaCl-Haushaltes eine große Rolle, in einem Übersichtsartikel von Loffing *et al.* (Loffing, Korbmacher 2009) wird dem DCT sogar eine wichtigere Rolle bei der ENaC vermittelten, Aldosteron-regulierten Na^+ -Resorption zugesprochen als dem Sammelrohr.

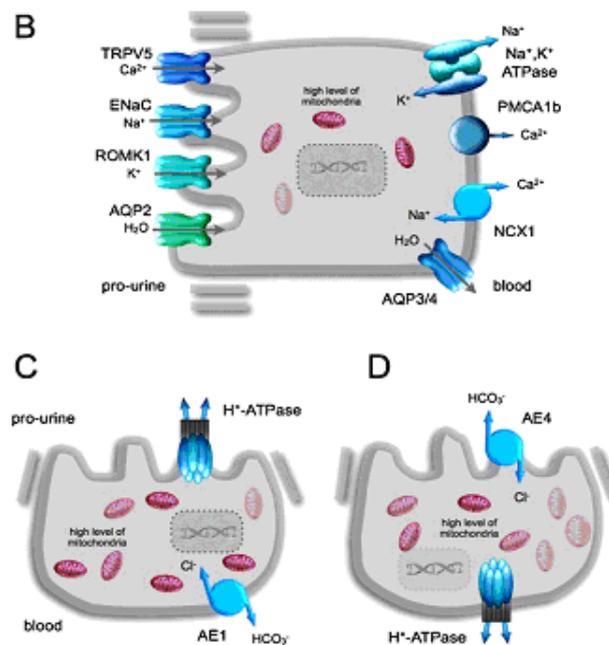


Abbildung 6: Übersicht über die Zelltypen des CNT und ihre Transporter (Markadieu *et al.* 2011).

Dabei finden sich im Epithel des CNT zwei Typen von Zellen wieder, die Schaltzellen und die nach Loffing *et al.* (Loffing, Korbmacher 2009) als „segmentspezifisch“-bezeichneten (analog den Hauptzellen des CD) Zellen. Diese Zellausstattung des DCT verleiht ihm funktionelle Charakteristika sowohl des DCT2 als auch des Sammelrohres. Abbildung 6B zeigt die Kanalausstattung der „segmentspezifischen“-Zellen. Sie ermöglicht der Zelle eine hormonell-kontrollierte Na^+ -Aufnahme nach dem gleichen Prinzip wie in im oben

beschriebenen DCT. Außerdem ist eine, über das antidiuretische Hormon (ADH) vermittelte, Resorption von H_2O möglich. Das Vorhandensein von ROMK in der apikalen Membran ermöglicht hierbei die Exkretion des basal aufgenommenen Kaliums. Ca^{++} -Ionen werden auf dem gleichen Wege und anhand der gleichen, für die Ca^{++} -Resorption benötigten, Proteine resorbiert wie im DCT. Die weniger häufig vorkommenden Schaltzellen, wie in Abbildung 6C und D illustriert, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Säure-Base-Haushaltes (Markadieu *et al.* 2011). Da der CNT zum ASDN gehört, bezieht sich die weiter oben geschilderte Regulation des DCT2 durch Hormone auch auf den CNT.

1.2.6. Das Sammelrohr

Das Sammelrohr (*collecting duct*, CD) erhält Harn aus mehreren Nephronen (Arroyo *et al.* 2011) und übernimmt die Feinjustierung von H_2O , NaCl, und H^+ -Ionen beziehungsweise HCO_3^- im Urin. Dabei unterscheidet sich die zelluläre Ausstattung des Sammelrohres nur unwesentlich von der des CNT: Sie besteht aus Hauptzellen und Typ A und Typ B Schaltzellen. Die Hauptzellen sind für die hormonell gesteuerte Resorption von Na^+ -Ionen und H_2O sowie die Exkretion von K^+ -Ionen verantwortlich, welche nach dem gleichen Prinzip wie im Verbindungstubulus abläuft (Greger 2000). Die Aufgabe der Schaltzellen besteht in der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, wobei ihnen neuerdings auch eine Rolle bei der NaCl-Resorption zukommen soll (Leviel *et al.* 2010).

1.2.7. Hormonelle Regulation des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons

Wie schon im Kapitel der Regulation des DCT angeführt, ist die Regulation des ASDN eine sehr komplexe, in der in den gleichen Tubulusabschnitten durch die gleichen, zentralen Regulatoren eine unterschiedliche Wirkung erzielt werden kann. Arroyo *et al.* (Arroyo *et al.* 2011) haben in einem Übersichtsartikel versucht, die bisher verstandenen und bekannten Mechanismen in ein integrativ physiologisches Regulationsmodell zu integrieren:

Wie der Name schon sagt, spielt das Mineralokortikoidhormon Aldosteron bei dieser Regulation eine zentrale Rolle. Es wird, neben anderen regulatorischen Hormonen, bei zwei scheinbar im Widerspruch stehenden Situationen, Hypovolämie und Hyperkaliämie, vermehrt sezerniert um eine Adaptation der Niere an die jeweiligen Gegebenheiten zu erzeugen. Dabei kommt ihm im Fall der Hypovolämie die Aufgabe zu, über erhöhte Na^+ -Resorption den Volumenverlust auszugleichen. Im Falle der Hyperkaliämie wird auch vermehrt Aldosteron

freigesetzt, nur muss es diesmal die K^+ -Ionen Exkretion erhöhen ohne gleichzeitig die Resorption der anderen Salze zu fördern.

Um diese beiden Zustände adäquat regulieren zu können, ist ein komplexes Zusammenspiel aus anderen ebenfalls beteiligten Regulatoren und der räumlichen Verteilung der Aldosteron-Rezeptoren vonnöten. So ist der Zustand der Hypovolämie durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gekennzeichnet, Angiotensin-II ist also im Gegensatz zum Zustand der Hyperkaliämie vermehrt vorhanden. Hinzu kommt, dass die Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) und der 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ 2 (11β -HSD2) nicht in allen Abschnitten des ASDN gleich ist. Die 11β -HSD2 verhindert die Besetzung des MR durch Glukokortikoide. So findet in allen ASDN-Segmenten außer dem DCT1 eine Koexpression von MR und 11β -HSD2 statt; dies gewährleistet Aldosteron-vermittelte Effekte in allen ASDN-Segmenten bis auf den DCT1. Die bei der Regulation ebenfalls benötigten Angiotensin II-Typ 1-Rezeptoren, die für die Regulation des Epithelialen-Natrium-Kanals (ENaC) wichtige Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 E₃ und die von Aldosteron induzierbare Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) werden hingegen entlang des gesamten distalen Nephrons exprimiert. Aldosteron kann über die Induktion der SGK1, welche Nedd4-2 E₃ phosphorylieren kann, die Bindung derselben an ENaC verhindern. Eine Bindung von Nedd4-2 E₃ an die β - und γ -Untereinheit von ENaC führt zu dessen Ubiquitinierung und Degradation.

Eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Aldosteron und Angiotensin-II vermittelten Effekte kommt vermutlich auch der Kinase WNK4 zu. Sie gehört zu einer Gruppe von 4 Serin/Threonin-Kinasen, von denen, bis auf WNK2, alle in der Niere exprimiert werden. Von WNK4 existieren in der Niere unterschiedliche Splice-Varianten, welche in den verschiedenen Abschnitten des ASDN unterschiedlich zu finden sind. Dabei hat WNK4 möglicherweise eine Vermittlerfunktion zwischen den beiden vorhin erwähnten Zuständen inne und koordiniert die Funktion des DCT/CNT und des Sammelrohres. Sie kann in ihrer Aktivität über Aldosteron via Phosphorylierung durch SGK1 moduliert werden, ist Ziel von Angiotensin II und interagiert mit den anderen Mitgliedern der WNK-Familie. All diese Faktoren beeinflussen die Funktion von WNK4, welches in seinem basalen Zustand eine inhibitorische Wirkung auf die Ionenkanäle NCC, ENaC und ROMK hat.

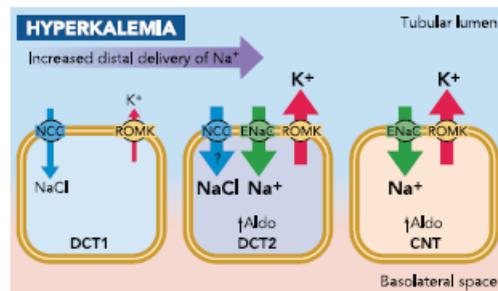


Abbildung 7: Regulatorische Vorgänge bei Hyperkaliämie im distalen Tubulus (Arroyo *et al.* 2011).

Im Zustand der Hyperkaliämie beispielsweise, in dem Aldosteron erhöht ist, jedoch keine vermehrte Angiotensin-II Freisetzung erfolgt, kann in den Zellen des distalen Tubulus Aldosteron über SGK1 WNK4 phosphorylieren, wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf ENaC und ROMK aufgehoben wird. In den Zellen des DCT1, in denen NCC am stärksten exprimiert ist, wirkt Aldosteron aufgrund der nicht vorhandenen Rezeptorausstattung nicht. So bleibt dort die inhibitorische Wirkung von WNK4 auf NCC erhalten. Durch diese Inhibition wird über den NCC im DCT1 weniger Na⁺ und Cl⁻ aufgenommen, welches dann vermehrt im DCT2, dem CNT und dem Sammelrohr resorbiert werden kann. Gleichzeitig fördert die vermehrte Na⁺-Resorption die Exkretion von K⁺, zum Beispiel durch ROMK, sodass der Kaliumspiegel wieder normalisiert werden kann.

Durch die unterschiedliche Ausstattung der Tubulusepithelzellen mit den unterschiedlichen Rezeptoren und Ionenkanälen und die dadurch bedingte Wirkung der beteiligten Hormone nur in bestimmten Bereichen in Kombination mit dem komplexen, regulatorischen Kinasenetzwerk, scheint es möglich zu sein, das Tubulussystem genau auf die jeweilige homöostatische Situation anzupassen.

Es lässt sich ein weiterer Erklärungsversuch für die komplexe distale Salz- und Wasserhomöostase versuchen, der zellbiologischer ausgerichtet ist.

Durch das in den letzten Jahren immer weiter wachsende Verständnis der Regulation des ENaC, lässt sich ein um die Funktion dieses Kanals herum aufgebautes Erklärungsmodell aufstellen.

So ist die Regulation von ENaC als Zusammenspiel aus unterschiedlichen Signalwegen zu sehen, in dem das Mineralokortikoid Aldosteron und die SGK1 die zentrale Rolle einnehmen. So kann beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) über den Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg eine inhibitorische Wirkung auf ENaC ausüben. Insulin und insulinähnliche Wachstumsfaktoren haben über den PI3K-Signalweg und damit über mTORC2 Einfluss auf ENaC. Bereits den initial entstehenden Botenstoffen PIP₂ und PIP₃ wird neuerdings die Fähigkeit zugesprochen, direkt mit ENaC zu assoziieren und so die

Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zu erhöhen. Aldosteron führt zu vermehrter Expression der SGK1 und von GILZ1, einem Chaperone. GILZ1 wirkt inhibierend auf ERK und kann dadurch die inhibierende Wirkung auf ENaC lockern. Darüber hinaus schützt es die SGK1 vor dem Abbau. SGK1 wiederum kann über die Inhibition von Raf ebenfalls die inhibitorische Wirkung dieses Signalweges auf die Na^+ -Aufnahme beeinflussen. Zusätzlich kann sie nach Aktivierung durch mTORC2 über die Inhibition der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 die Degradation von ENaC verhindern und so die apikale Na^+ -Aufnahme stimulieren. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die beteiligten Regulatoren die Integration der ankommenden regulatorischen Signale durch einen großen Multiproteinkomplex, den *ENaC regulatory Complex* (ERC), ausüben (Soundararajan *et al.* 2012).

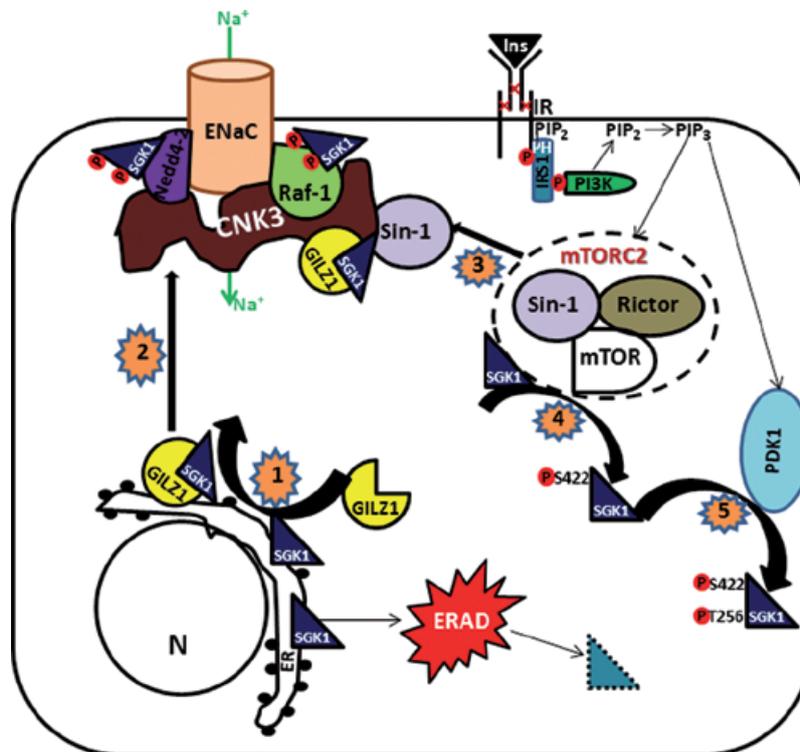


Abbildung 8: Schematische Übersicht über die den ENaC regulierenden Faktoren (Soundararajan *et al.* 2012).

1.3. Der mTOR-Signalweg und die mTOR-Komplexe

Die Entdeckung des Immunsuppressivums Rapamycin und die Aufschlüsselung seiner Wirkungsweise führten zur Entdeckung des mTOR (mammalian target of Rapamycin)-Komplexes. Dieser Komplex ist hoch konserviert; jedes bis heute bekannte eukaryote Genom enthält mindestens ein TOR-Gen, was die Wichtigkeit dieses Komplexes illustriert. TOR gehört zur Familie der PIKK (phosphatidylinositol-kinase-related kinase) und stellt eine Serin/Threonin-Kinase dar.

Der Komplex ist in der Zelle Sensor und Regulator für essentielle Funktionen und ist in sehr intrikate Regulationsnetzwerke eingebunden. Er integriert von außen kommende Informationen wie Nährstoffangebot, Wachstumsfaktoren und Hormone mit Informationen aus dem Inneren der Zelle, wie beispielsweise dem Energieangebot. Dies ermöglicht eine feine Abstimmung zwischen externen und internen Stimuli und sorgt dafür, dass die Zelle für ihr Überleben kritische Prozesse, wie beispielsweise Proteinbiosynthese, nur dann durchführt, wenn die Energielage es zulässt (Wullschleger *et al.* 2006).

mTOR liegt in 2 Komplexen vor, die unterschiedlich aufgebaut sind und unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Dabei sind manche Proteine wie beispielsweise mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein8), das den Komplex stabilisiert und DEPTOR (Dishevelled, EGL-10 and Pleckstrin with TOR), das die Aktivität des Komplexes herabsetzt, in beiden mTOR-Komplexen vorhanden.

mTORC1 ist aus mTOR in Verbindung mit RAPTOR (regulatory associated protein of TOR), das eine Stabilisierungsfunktion für den Komplex ausübt und Ziel zahlreicher Interaktionspartner ist, sowie PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40kDa) aufgebaut. PRAS40 wird durch die Kinase Akt phosphoryliert und hat in diesem Zustand eine inhibierende Wirkung.

mTORC2 ist aus mTOR in Verbindung mit RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), das eine ähnliche Funktion hat wie RAPTOR, und mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1) sowie PROTOR aufgebaut. mSIN1 stabilisiert den Komplex und sorgt dafür, dass mTORC2 an die Zellmembran gelangt und dort spezifische Aufgaben ausführen kann. PROTOR spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von SGK1 (Pearce *et al.* 2011).

mTORC1 ist in der Lage das Voranschreiten von der Zellzyklusphase G₀ zur nächsten Phase G₁ zu unterstützen und damit die Zellteilung zu beeinflussen. Außerdem kann der Komplex das Größenwachstum der Zelle über die Regulation der Proteinbiosynthese und die ribosomale Biogenese regulieren. Die beiden wichtigsten Effektoren von mTORC1 in dieser Hinsicht sind die ribosomalen S6 Kinasen 1 und 2 (S6K1 und S6K2) und die den eukaryoten translations Initiationsfaktor eIF-4E bindenden Proteine (4E-BPs). Außerdem stellt mTORC1 als Sensor der Stoffwechsellage den wesentlichen Inhibitor zellulärer Autophagozytoseprozesse dar. Des Weiteren kann der Komplex die mitochondriale Funktion modulieren (Lieberthal, Levine 2012).

Die Aufgaben des mTORC2-Komplexes hingegen sind anderer Natur. Er phosphoryliert bestimmte Motive an Kinasen der AGC-Gruppe und aktiviert diese dadurch. Hierzu zählen

unter anderem Proteinkinase B (Akt), Proteinkinase C (PKC) und die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1). Über die Regulation dieser Kinasen beteiligt sich der mTORC2-Komplex an einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen: Zellüberleben, Zellpolarität, Dynamik des Zytoskeletts und Aldosteron-vermittelte Natrium-Resorption im ASDN. Des Weiteren wird für mTORC2 ebenfalls eine modulierende Rolle bei der translationalen Reifung und Prozessierung der entstehenden Proteine vermutet (Oh, Jacinto 2011) (Lieberthal, Levine 2012).

Die Regulation der beiden Komplexe ist unterschiedlich und komplex. Eine Übersicht findet sich in Abb. 9:

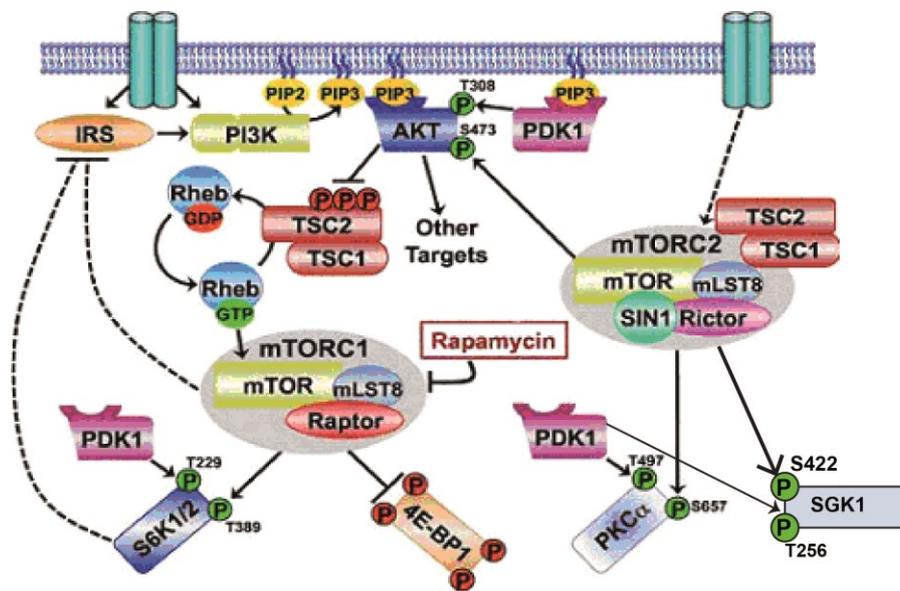


Abbildung 9: Das Regulationsnetzwerk der mTOR-Komplexe (modifiziert nach (Huang, Manning 2009)).

Die Wirkung von Insulin oder insulinähnlichen Wachstumsfaktoren auf mTORC1 wird über die PI3K-Signalkaskade vermittelt. Nach Assoziation der PI3-Kinase mit dem Insulinrezeptorsubstrat (IRS) an der Plasmamembran, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Phosphorylierung und dadurch Aktivierung von Akt steht. Akt wiederum hemmt den zentralen Regulator des mTORC1-Komplexes, den Tuberöse-Sklerose-Komplex (TSC). Dieser besteht aus Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2). Tuberin ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) welches mit der kleinen GTPase Rheb (Ras homologue enriched in brain) interagiert und diese dabei unterstützt GTP zu GDP umzuwandeln. Rheb wiederum aktiviert mTORC1 GTP-abhängig. Durch die Hemmung des TSC-Komplexes durch Akt wird die inhibierende Wirkung dieses Komplexes auf mTORC1 aufgehoben und es kommt zur Aktivierung in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren (Huang, Manning 2009).

Andere Wachstumsfaktoren sind in der Lage mTORC1 über von Akt unabhängige Signalwege zu aktivieren. So setzt beispielsweise die dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) nachgeschaltete Signalkaskade direkt am TSC-Komplex an und führt dort über eine Phosphorylierung von TSC2 zur Hemmung des Komplexes und damit zu einer Aktivierung von mTORC1.

Regulatoren von mTORC2 sind kaum bekannt. Eine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren scheint sehr wahrscheinlich. Außerdem ist es möglich, dass der Komplex ebenfalls durch den TSC reguliert wird, in diesem Falle allerdings unabhängig von Rheb (Lieberthal, Levine 2012) (Oh, Jacinto 2011).

1.4. Renale mTOR Physiologie – Der aktuelle Stand

In der Literatur bis heute ist die physiologische Rolle der mTOR-Komplexe in der Niere nur sehr spärlich beschrieben. Es gibt einige wenige Arbeiten die anhand von Beobachtungen bei Tieren oder Menschen unter Immunsuppression mit Rapamycin Rückschlüsse auf die Funktion der Komplexe ziehen.

Kempe *et al.* (Kempe *et al.* 2010) hatten Mäuse, die in metabolischen Käfigen gehalten wurden, über 3 Tage mit Rapamycin behandelt und festgestellt, dass die Behandlung zu einer Phosphaturie führt. Des Weiteren beobachteten sie eine Glukosurie und eine gesteigerte Ausscheidung von Aminosäuren. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten sie eine Beeinträchtigung proximal-tubulärer Transportprozesse durch Rapamycin.

Die Gruppe um Morales *et al.* (Morales *et al.* 2003) stellten in einer Studie mit einer kleinen Anzahl an immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation eine gesteigerte Kalium-Exkretion, trotz bestehender Hypokaliämie, im Urin fest. Diese ließ sich auf eine gesteigerte renale Kaliumausscheidung zurückführen. Die Autoren postulierten für Sirolimus eine Förderung der Kaliumausscheidung über bisher unbekannte Mechanismen.

In einer weiteren Studie dieser Autoren (Morales *et al.* 2002) mit einer größeren Patientenzahl, trat in der Gruppe der Sirolimus-Patienten ebenfalls häufiger eine Hypophosphatämie und eine Hypokaliämie auf. Diese Beobachtung beschränkte sich allerdings auf die ersten 3 Monate, in denen die Dosierung der Medikation am höchsten war.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in einer Studie von Golbækdal *et al.* (Golbækdal *et al.* 1994) an Schweinen finden. Bei suprathérapeuthischer Dosierung von Rapamycin ließ sich 2 bis 3 Stunden nach Infusion eine leichte Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Plasmaflusses (RPF) feststellen. Außerdem zeigten sich im Vergleich zur

Kontrollgruppe signifikant erhöhte Aldosteronplasmaspiegel und die Tendenz zu einer erhöhten Urin- und Natriumexkretion.

1.5. Fragestellung dieser Arbeit

Allen im vorausgegangenen Abschnitt aufgeführten Studien ist gemein, dass über die Ursache der unter Rapamycin beobachteten renalen Effekte Unklarheit herrscht. Einige Andeutungen, welche Veränderungen eine Inhibition des TOR-Komplexes in der Niere nach sich zieht, lassen sich zwar ableiten, aber die grundlegenden physiologischen Funktionen bedürfen weiterer Aufklärung.

Um diesem Ziel näher zu kommen, generierten wir tubulusspezifische mTORC1 (*Rap^{f/f}KspCre*)- und mTORC2 (*Ric^{f/f}KspCre*)-Knockout-Mäuse.

Bei den ersten mTORC1-Knockouttieren ließ sich ein Phänotyp mit erhöhter Urinausscheidung beobachten. Die durchgeführten Experimente sollten klären, ob

- der beobachtete Phänotyp eine Polyurie, eine Polydipsie oder einen renalen Diabetes insipidus darstellt oder sich andere Ursachen für die erhöhte Urinausscheidung finden lassen.

Des Weiteren ist aus der Transplantationsmedizin bekannt, dass frühe Gabe von Rapamycin nach einer Nierentransplantation zu einer verlängerten Phase von „delayed graft function“ führt, welche durch verringert stattfindende Reparaturprozesse erklärt wird (McTaggart *et al.* 2003).

Anhand von mTORC1-Knockouttieren (*Rap^{f/f}Pax8rtTATetOCre*) sollte geklärt werden, ob

- ein Ausschalten von mTORC1 die Regenerationsfähigkeit der Niere nach ischämischer Schädigung erniedrigt und/oder die Ischämie-Empfindlichkeit bei diesen Tieren gesteigert ist.

Außerdem sollte anhand von mTORC2-Knockouttieren (*Ric^{f/f}KspCre*) in Stressmodellen den in der Literatur postulierten Hinweisen nachgegangen werden, ob

- mTORC2 eine regulatorische Funktion in der Salzausscheidung im distalen Nephron innehat.

2. Material und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Animal Tattoo Ink Green Paste	Ketchum Manufacturing Inc., Brockville, ON, Canada
Combitipps®-Plus 0,5ml	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Deckgläser 18 x 18mm	R. Langenbrinck, Teningen
Falcon™ Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Frischhaltefolie	IGEFA Handelsgesellschaft GmbH & Co, Ahrensfelde
iBlot® Gel Transfers Stacks PVDF mini, regular	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Microlon® 200, 96 well ELISA-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Minicaps, Na-Hep. Einmal-Kapillarpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Nagellack p2 nail art top coat	p2 Kosmetik GmbH, Wien-Neudorf, Österreich
PCR SingleCap 8er-Softstrips 0,2ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen Micro Tips Premium 10 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen Micro Tips Premium 200 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City, UT, USA
Rasierklinge Classic	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Reagiergefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Rollrandglas 5 ml	Max Resch Laborbedarf, Wermelskirchen
Stripette 5ml, 10ml, 25ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Super PAP Pen, Liquid Blocker	Science Services GmbH, München
Super RX 13 x 18 cm Röntgenfilm	Fujifilm Deutschland, Düsseldorf
SuperFrost® Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen
Tissue-Tek® Cryomold® Intermediate	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
UV-Küvetten Mikro, 8,5 mm Zentrumshöhe	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

2.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
3722L Mini-Zentrifuge	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
ApoTome Einschubmodul	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
AxioCam Mikroskopiekamera	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
AxioCam MRm Mikroskopiekamera	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Axiophot 2 Aufrechtmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
AxioVert 200M Inversmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
BioSpec® 94/20 USR Kleintier-Magnetresonanztomograph	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
BP 121 S Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
BP5 Heizsystem	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
CM3050 Kryostat	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Crurix 60 Entwicklungsmaschine	Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
Discovery Comfort Multichannel 1-10 µl Multipipette	htL Lab Solutions, Warschau, Polen
EZ5 Stereomikroskop + KL 200 LED Lichtquelle	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
FCM 6341 Flammenphotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Genesys 20 Spectrophotometer	Thermo Electron Corp., Madison, WI, USA
HAL 100 Mikroskop-Leuchte	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
HBO 50 Quecksilberdampf-Mikroskop-Leuchte	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Heraeus® Fresco™ 17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Langenselbold
iBlot® Gel Transfer Device	Life Technologies GmbH, Darmstadt
IL21 Infrarot-Lampe	Beurer GmbH, Ulm
KS501 digital Laborschüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kleintier-, „Vogelkäfig“-Resonator-Spule, 35 mm	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
LP 6200 S Waage	Sartorius AG, Göttingen
Mini-Protean® 3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
Multipette® Plus-Handdispenser	Eppendorf AG, Hamburg
MS-2000 Multi-Axis Stage Controller	Applied Scientific Instrumentation, Eugene, OR, USA
Observer.Z1 Inversmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Pipetman® Pipettensatz	Gilson, Inc, Middleton, WI, USA
PowerPac™ HC Spannungsquelle	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
PowerPac™ Spannungsquelle	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
„Preci-Grind“ Tissue Grinders	Radnoti LCC, Monrovia, CA, USA
PTC-200 Thermo Cycler	GMI, Ramsey, MN, USA
REAX top Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Röntgenkassette 13 x 18 cm	Rego X-Ray GmbH, Augsburg

Small animal monitoring & gating system	Small Animal Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA
SpectraMax Plus 384 Photometer	Molecular Devices GmbH, Ismaning
Sub-Cell® GT Elektrophorese-System	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
Techne Dri-Block® DB-2A	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, England
TMW-20 Transilluminator UV-Leuchttisch	UVP, Upland, CA, USA
TRM 50-Taumel-Rollenmischer	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau
UP-D890 Video-Thermodrucker	Sony Professional Solutions Europe, Berlin
Vapor® 19.3 Isoflurane-Narkosemittel-Verdunster	Dräger Medical GmbH, Lübeck
XBO 75 Xenon-Mikroskop-Leuchte	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

2.1.3. Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München
AlphaEase® FC 4.1.0 Gel-Dokumentations-Software	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
AxioVision V. 4.8.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
LabImage 1D	Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Image J	http://rsbweb.nih.gov/ij/
ParaVision®V.5 MRT-Acquisitions-Software	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
SoftMaxPro5.2 Mikroplatten-Analysesoftware	Molecular Devices GmbH, Ismaning

2.1.4. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumperoxiddisulfat 10 % (APS)	AppliChem, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau-Na	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coumarin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-Disodium (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Forene® 100 %	Abbott, Wiesbaden
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (H ₂ KPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Normal Donkey Serum (NDS)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, England
Normal Goat Serum (NGS)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, England
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rotiphorese® Gel 30 % (Acrylamid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetranatriumdiphosphat-Decahydrat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton® X-100	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim

2.1.5. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Alkaline Lysis Reagent pH 12	25mM NaOH; 0,2mM Na ₂ EDTA
Agarosegel 2 %	500 ml 1x TAE-Puffer; 10 g Agarose; 25,0 µl Ethidiumbromid-Lösung 1 %
Blocking-Lösung für IF-Färbung	5% BSA in 1xPBS

Blocking-Lösung für IF-Färbung	5% BSA und 5% NDS in 1x PBS
Blocking-Lösung für Western Blot	5% BSA in 1x Proteinwaschpuffer + 0,1% Na-Azid
ECL-Lösung A	17,7 ml H ₂ O; 2 ml 1M Tris HCl pH 8,5; 200µl 250mM Luminol; 88µl 90mM Coumarin-Säure
ECL-Lösung B	18 ml H ₂ O; 2ml 1M Tris HCl pH 8,5; 12µl 30% H ₂ O ₂
IP-Buffer	20mM Tris HCl pH 7,4; 1% Triton® X-100; 50mM NaCl; 50 mM NaF;
Laemmli 2x	15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ; 1 mM EDTA; pH 8,0 125 ml Tris HCl 1 M pH 6,8; 20 g SDS; 100 ml Glycerol; 5 mg Bromphenolblau; 270 ml H ₂ O; 100µl 1 M DTT
Laufpuffer 10x für Western Blot	144 g Glycin; 30 g Tris; 10 g SDS ad 1 l ddH ₂ O
Laufpuffer 1x Laufpuffer	10x Laufpuffer + ddH ₂ O, 1:10
Lysepuffer zur Lysatherstellung	8,95ml IP-Buffer + 1mM EDTA; 200µl Na ₃ Vo ₄ ; 123mg CHAPS; 400µl Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail; 400µl Roche Phosphatase Inhibitor Cocktail; 44µl PMSF
Neutralization Reagent (pH 5)	40mM Tris HCl
PFA 4 % in PBS	4 % PFA in PBS
Phosphate buffered saline (PBS) 10x	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O; 2 mM H ₂ KPO ₄
Phosphate buffered saline (PBS) 1x	10x PBS + ddH ₂ O, 1:10
Sammelgelpuffer für Western Blot	242 ml 2 M Tris HCl; 8 ml 2 M Tris; 20 ml 20 % SDS ad 1 l ddH ₂ O; pH 6,8
Sucrose 10% in PBS	Sucrose 10% in PBS
TAE-Puffer 1x für Agarosegelherstellung	3520 ml H ₂ O, 80 ml 50x TAE-Puffer
TAE-Puffer 1x, mit Ethidiumbromid für PCR	3520 ml H ₂ O, 80 ml 50x TAE-Puffer, 200 µl Ethidiumbromid-Lösung 1 %
Trenngelpuffer für Western Blot	570 ml 2 M Tris; 180 ml 2 M Tris HCl; 20 ml 20 % SDS ad 1 l ddH ₂ O; pH 8,8
Tris HCl 1 M	121 g Tris ad 1 l ddH ₂ O
Tris HCl 2 M	242 g Tris ad 1 l ddH ₂ O
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) 50x für PCR	242g Tris; 57,1 ml Essigsäure; 18,6 g EDTA, ad 1 l H ₂ O
Waschpuffer 10x für Western Blot	612 ml 5 M NaCl; 306 ml 1 M Tris HCl pH 7,5; 30,6 ml Tween® 20 ad 1 l ddH ₂ O
Waschpuffer 1x für Western Blot	10x Waschpuffer + ddH ₂ O, 1:10

2.1.6. Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Creatinin PAP-Kit	Labor + Technik Eberhard Lehmann, Berlin
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
Harnstoff-Kit	Labor + Technik Eberhard Lehmann, Berlin
Li ⁺ -Verdünnungslösung für die Flammenphotometrie	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MgCl ₂ 25 mM	Genaxxon Bioscience, Ulm
MPC Protein Precipitation Reagent	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
NEBuffer 3 10x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
PeqGold 100bp DNA-Leiter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Precision Plus Protein Dual Color Western Blot-Proteinmarker	Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA
ProLong® Gold antifade reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Serum-Standard-Stammlösung für die Flammenphotometrie	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermo-Start ReddyMix Master Mix	Thermo Scientific, Hamburg
Triamterene, Produkt-Nr.: T4143	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Urin-Standard-Stammlösung für die Flammenphotometrie	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.7. Primer

Bezeichnung	Sequenz	PCR Reaktion
S1X-A	5' GCATAACCAAGTCAAACAGCATTGCTG 3'	Cre
S1X-B	5' GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG 3'	
PAX8 fp (ST1)	5' CCATGTCTAGACTGGACAAGA 3'	Pax8
PAX8 rp (ST2)	5' CTCCAGGCCACATATGATTAG 3'	
<i>Raptor</i> fp new	5' GATGGTAGCAGGCACACTCTTCATGAATTC 3'	Raptor
<i>Raptor</i> rp new	5' CTTATTTAGGCTAAACATTCAGTCCCTAATC 3'	
<i>Rictor</i> F	5' TTATTAAGTGTGTGTGGGTTG 3'	Rictor
<i>Rictor</i> B	5' TTATTAAGTGTGTGTGGGTTG 3'	

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-NKCC2, rabbit, SPC-401D, Lot#1006	Stressmarq Biosciences Inc, Victoria, BC, Kanada
Anti-NCC, rabbit, SPC-402D, Lot#1006	Stressmarq Biosciences Inc, Victoria, BC, Kanada
Anti-ENaC-Alpha, rabbit, Scnn1a, SPC-403D, Lot#1009	Stressmarq Biosciences Inc, Victoria, BC, Kanada
Anti-Aquaporin2, rabbit polyclonal, #AQP-002, Lot#AN-09	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel
Anti NGAL Polyclonal Goat IgG , AF1857	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-PGC1 alpha, rabbit polyclonal,#ab54481	Abcam plc, Cambridge, England
Anti-Human Tamm Horsfall Glycoprotein Sheep polyclonal IgG Antibody	AbD Serotec, Düsseldorf
Human/Mouse Active Caspase-3 Antibody, Polyclonal Rabbit IgG, AF835	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Ki-67, Rabbit Monoclonal Antibody, Clone SP6	Thermo Scientific, Hamburg
Monoclonal Anti- β -Aktin, mouse IgG1 isotype, Clone AC-15	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP TM Rabbit mAb, #4060S	Cell Signaling Technology® Inc, Danvers, MA, USA
Rabbit polyclonal to SGK1 (phosphor-Ser422), orb6931	Biorbyt Limited, Cambridge, Cambridgeshire, England
Raptor (24C12) Rabbit mAb, #2280S	Cell Signaling Technology® Inc, Danvers, MA, USA

2.1.8.2. Sekundärantikörper und Kofärbungen

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Alexa Fluor® 555 donkey anti-goat IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 555 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	Cell Signaling Techn. Inc., Danvers, MA, USA
Fluorescein labeled Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL)	VECTOR LABORATORIES, INC, Burlingame, CA, USA
Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Polyclonal goat anti-mouse HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Rhodamine labeled Dolichus Biflorus Agglutinin (DBA)	VECTOR LABORATORIES, INC, Burlingame, CA, USA
ZyMax™ Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP conjugate	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.2. Mausmodelle

2.2.1. Tierhaltung

Alle in den Experimenten verwendeten Mäuse entstammten der C57BL6 Inzuchtmauslinie. Die Tiere wurden im Biomed Zentrum artgerecht und keimarm (SPF) gehalten und hatten stets freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser. Nach der Geburt wurden sie zur Identifikation an den Endphalangen tätowiert und genotypisiert. Später erfolgte die Identifikation anhand einer nummerierten Ohrlochmarkierung.

2.2.1. Das Cre/loxP – System

Um die Funktion der mTOR-Komplexe in den Sammelrohren der Maus untersuchen zu können, war die Generierung von konditionalen *Raptor*- und *Rictor* Knockoutmäusen notwendig, bei der das Cre/loxP – System tubulussystemspezifisch zum Einsatz kam.

Bei dem Enzym Cre handelt es sich um die DNA-Rekombinase des Bakteriophagen P1, welche in der Lage ist, bestimmte DNA-Abschnitte als kovalent geschlossene Ringe zu exzidieren. Dabei werden die auszuschneidenden Bereiche jeweils von einem 34bp langen, als loxP-Sequenz bezeichneten Abschnitt flankiert, der von Cre spezifisch erkannt wird. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass bei dem oben genannten Prozess außer den loxP-Sequenzen keine zusätzlichen Erkennungssequenzen auf der DNA sowie Energieträger, wie beispielsweise ATP, benötigt werden.

Die Platzierung von Rekombinationsstellen im Genom und die darauffolgende, zielgerichtete Expression der Rekombinase ermöglichen so die Entwicklung von genetischen „Schaltern“, welche die Ablation oder das Anschalten jeglicher gewünschter Gene in transgenen Mäusen gestatten.

Durch das Kreuzen einer Mauslinie, in welche das von loxP-Sequenzen flankierte gewünschte Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eingebracht wurde, mit einer anderen Mauslinie welche das Cre-Transgen trägt, lassen sich knockout Tiere erzeugen.

Um einen konditionalen Knockout nur in bestimmten Zellpopulationen zu generieren, ist es möglich das Cre-Konstrukt hinter einen für diese Zellen typischen Promoter zu klonieren und den Effekt der Cre-medierten Rekombination auf den Expressionsbereich dieses Promoters zu beschränken (Sauer 1998).

2.2.2. Verwendete Mauslinien

2.2.2.1. Die *KspCre*-Maus

Die Arbeitsgruppe von Prof. Peter Igarashi (University of Texas Southwestern, Dallas, TX, USA) entwickelte diese Mauslinie, um ein tubulusspezifisches, konditionales Expressionsmuster der Cre-Rekombinase zu erhalten. Dabei bediente sie sich des *Ksp*-Cadherin Promoters. *Ksp*-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül und gehört zur Familie der Cadherine. Es wird in den Epithelzellen des sich entwickelnden Tubulussystems der Niere und des Genitouraltraktes exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein 1341bp langes Fragment, das die 5' flankierende Region des *Ksp*-Cadherin Gens und dessen Promoter enthält, ausreichend ist um das Expressionsmuster zu erzielen, das das wildtyp Gen aufweist. Dieser Befund führte dazu, dass die Autoren der Arbeit ein *Ksp1.3*/Cre-Konstrukt klonierten, das 1329bp der 5' Region des Maus *Ksp*-Cadherin Gens inklusive des Promoters enthält, sowie die für die Cre kodierenden Regionen des Cre-Gens. Dieses Konstrukt wurde anschließend erfolgreich in die C57BL/6 Mäuse eingebracht und fortan stand die Expression der Cre-Rekombinase bei diesen Tieren unter der Kontrolle des *KSP*-Cadherin Promoters. Shao *et al.* zeigten 2002 (Shao *et al.* 2002), dass sich das Expressionsmuster der Cre in diesen Mäusen kaum von dem des genetisch unveränderten *Ksp*-Gens unterscheidet: dicke aufsteigende Henle Schleife, Sammelrohre und nur zu einem sehr geringen Prozentsatz der proximale Tubulus.

2.2.2.2. Die *Raptor^{fl/fl}*-Maus

Um die physiologische Rolle des mTOR1-Komplexes im Sammelrohrsystem der Niere untersuchen zu können, wurden *Raptor^{fl/fl}*-Mäuse benötigt. Diese Mäuse wurden unserem Labor von Prof. Michael N. Hall (Universität Basel, Schweiz) großzügigerweise zur Verfügung gestellt.

Da Guertin *et al.* 2006 (Guertin *et al.* 2006) die Entdeckung machten, dass eine konstitutive – also alle Zellen betreffende – Deletion des *Raptor*-Gens in einer frühembryonalen Letalität endet, kam in dieser Arbeit die von Polak *et al.* (Polak *et al.* 2008) generierte, konditionale *Raptor*-Knockoutmaus zum Einsatz. Dabei entstanden C57BL/6 Mäuse, in deren Genom jeweils in die, das Exon 6 des *Raptor*-Genlokus flankierenden Introns, eine loxP-Sequenz eingebracht wurde (*Raptor^{fl/fl}*).

2.2.2.3. Die *Rictor^{fl/fl}*-Maus

Da in dieser Arbeit auch die Rolle des mTOR2-Komplexes für die Salzhomöostase im distalen Sammelrohrsystem der Niere beleuchtet werden soll, wurden für die Experimente *Rictor^{fl/fl}*-Mäuse benötigt. Ähnlich der Funktion die RAPTOR im mTOR1-Komplex ausübt, ist RICTOR essentiell für die strukturelle Integrität des mTOR2-Komplexes (Wullschleger *et al.* 2006).

Um also den mTOR2-Komplex auszuschalten, wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Michael N. Hall und Prof. Markus Rüegg (beide Universität Basel, Schweiz) vor das Exon 4 und hinter das Exon 5 des *Rictor*-Gens loxP-Sequenzen inseriert (*Rictor^{fl/fl}*), was dann, nach Entfernung durch die Cre-Rekombinase, zur Ausschaltung des mTOR2-Komplexes führt.

2.2.2.4. Die *Pax8rtTA*-Maus

Die weiter oben beschriebene *KspCre*-Maus sollte bei der Untersuchung der Salz- und Wasserregulation im distalen Tubulus zum Einsatz kommen, wohingegen die von Traykova-Brauch *et al.* (Traykova-Brauch *et al.* 2008) erschaffene *Pax8rtTA*-Maus bei den den proximalen Tubulus betreffenden Experimenten zur ischämischen Schädigung und der Nährstoffaufnahme verwendet wurde.

Das von Gossen *et al.* (Gossen *et al.* 1995) entwickelte reverse tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Aktivierungssystem (rtTA) ermöglicht hierbei die Kontrolle über die Expression von Transgenen. Durch die Wahl des Promoters kann in diesem System die Expression der rtTA auf bestimmte Zielgewebe beschränkt werden. Dieser Aktivator ist so

aufgebaut, dass er nur in Anwesenheit des Koaktivators Tetrazyklin an den Promoter tetO binden kann. Nach Gabe von Doxzyklin kommt es zur Bindung an tetO und damit zur Aktivierung des Zielgens. So hat der Untersucher sowohl die zeitliche als auch die räumliche Expression des zu untersuchenden Gens unter Kontrolle (Zhu *et al.* 2002).

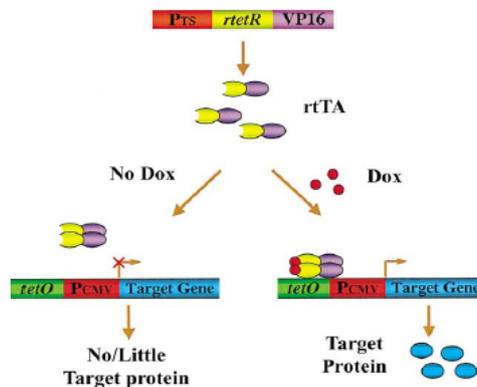


Abbildung 10: Das rtTA-System (Nach (Zhu *et al.* 2002)).

Bei der Generierung der *Pax8rtTA*-Maus wurde das für die rtTA-kodierende Gen unter die Kontrolle des murinen *Pax8*-Promoters gestellt, dessen Expressionsbereich im adulten Tier das gesamte Tubulussystem der Niere und einige Hepatozyten in der Leber umfasst.

2.2.2.5. Die tetOCre-Maus

Bei der in der Arbeit von Eremina *et al.* (Eremina *et al.* 2008) zum Einsatz kommenden und bei uns ebenfalls verwendeten tetOCre-Mauslinie wurde der, für die Cre-Rekombinase kodierende, DNA-Abschnitt unter Kontrolle eines Promoters aus dem Cytomegalievirus gestellt.

2.2.3. Kreuzungen

Um die für diese Arbeit benötigten Knockout-Tiere zu generieren, war eine Kreuzung der oben beschriebenen Mauslinien nötig:

2.2.3.1. *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre* -Maus

Hierfür wurden zunächst *Pax8rtTa*-Mäuse mit tetOCre-Mäusen verpaart und genotypisiert. Trugen die Nachkommen das gewünschte Transgen und waren alt genug, fand eine Verpaarung mit *Raptor^{fl/fl}*-Mäusen statt. Die aus der Kreuzung hervorgebrachten

Nachkommen wurden anschließend mit Doxyzyklin induziert um den *knockout* von *Raptor* herbeizuführen.

2.2.3.2. Die *Rap^{fl/fl}KspCre*-Maus

Um eine Exzision des *Raptor^{fl/fl}*-Gens im Expressionsbereich des *Ksp*-Cadherin-Promoters zu erreichen, wurden die oben beschriebenen *Raptor^{fl/fl}*-Mäuse mit den *KspCre*-Mäusen verpaart. In Nachkommen, die doppelt transgen waren, konnte das Exon 6 durch die Cre-Rekombinase im Expressionsbereich des *Ksp*-Cadherin Promoters entfernt werden, was in der Folge zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem verfrühten Translationsstopp führt (Bentzinger *et al.* 2008).

2.2.3.3. Die *Ric^{fl/fl}KspCre*-Maus

Analog zur *Rap^{fl/fl}KspCre*-Maus wurden hier *Rictor^{fl/fl}*-Mäuse mit *KspCre*-Mäusen verpaart um die benötigte *Rictor*-Deletion zu erhalten.

Ein Vorteil der zum Einsatz kommenden Verpaarungsstrategie war, dass in den Experimenten mit Wurfgeschwistern gearbeitet werden konnte. So war sichergestellt, dass der genetische Unterschied zwischen den Versuchstieren möglichst gering ausfiel.

2.3. Genotypisierung

2.3.1. DNA Aufreinigung

Um eine Genotypisierung an den von den Mäusen gewonnenen Schwanzstücken durchführen zu können, musste zunächst das Gewebe aufgeschlossen und die enthaltene DNA verdaut werden. Dazu wurden die Gewebe für eine halbe Stunde bei -20°C tiefgefroren und durchliefen im Anschluss in einem PTC-200 Thermocycler für 30 Minuten, nach Zugabe von 75µl *alkaline lysis reagent* (pH 12), das „hot shot“-Programm zum Verdau der enthaltenen DNA:

Temperatur in C°	Dauer in Minuten	Anzahl der Zyklen
95	30	1
10	forever	1

Im Anschluss wurden zu der basischen Lösung noch 75µl 40mM TrisHCl (pH 5) zur Neutralisation hinzugegeben, bevor die dann verdaute DNA als Matrize für die darauffolgenden PCR-Reaktionen dienen konnte.

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe sich ein, über die zugegebenen Primer genau definierter DNA-Abschnitt, in vitro exponentiell vermehren lässt (Mullis *et al.* 1992).

Dabei durchläuft der Reaktionsansatz, der die zu amplifizierende DNA als Matrize, hitzestabile Taq-Polymerase und weitere wichtige Bestandteile enthält, im Thermocycler pro Zyklus die folgenden Teilschritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Elongation wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, wodurch sich der Doppelstrang auftrennt. Die Primer lagern sich dann, bei der jeweils für sie optimalen Temperatur, während des *annealings* spezifisch an die Einzelstränge an. Die Verlängerung der Stränge erfolgt in der Elongation durch das Enzym Taq-Polymerase. Je nach Reaktion durchläuft der Reaktionsansatz 35-40 Zyklen.

Um die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse zu genotypisieren, kamen folgende Reaktionsansätze und Thermocyclerprogramme zum Einsatz:

2.3.2.1. Cre-Transgen

Die in dieser Reaktion zum Einsatz kommenden Primer dienen lediglich der Amplifikation der für die Cre-Rekombinase kodierenden Sequenz im Genom und lassen so keine Rückschlüsse auf den vorangestellten Promoter zu. Da bei den in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien *Raptor^{fl/fl}KspCre* und *Rictor^{fl/fl}KspCre* jedoch ausschließlich das Ksp1.3/Cre-Transgen zum Einsatz kam, ist der Nachweis von Cre im Genom ausreichend. Auch in den *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäusen wurde ausschließlich Cre nachgewiesen und nicht *TetOCre*. Da die verschiedenen Mauslinien getrennt gezüchtet wurden, war die Verwendung dieses Nachweises ausreichend. Im Falle des Vorhandenseins von Cre wurde ein Produkt von 280bp erwartet:

Reaktionsansatz **Cre**:

Bestandteil	Menge (in μl)
Thermo-Start ReddyMix Master Mix	10
MgCl ₂ 25mM	0,8
S1X-A/B-Primer Mix 10 μ M	0,4
H ₂ O	1,2
Template	1,6
Gesamtansatz	14

PCR-Programm **Cre**:

Temperatur (in $^{\circ}$C)	Dauer (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
94	3	1
94	0:30	
57	0:30	35
72	1	
72	5	1
10	forever	1

2.3.2.2. Raptor-PCR

Bei dieser Reaktion wurde entweder ein Produkt von 141bp für das Wildtyp-Allel oder von 228bp für das gefloخته Allel erwartet:

Reaktionsansatz **Raptor**:

Bestandteil	Menge (in μl)
Thermo-Start ReddyMix Master Mix	10
MgCl ₂ 25mM	0,6
Raptor new fp&rp Primermix 10 μ M	0,15
H ₂ O	2,25
Template	1
Gesamtansatz	14

PCR-Programm **Raptor**:

Temperatur (in $^{\circ}$C)	Dauer (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
94	4:00	1
61	2:00	1
72	3:00	1

94	1:00	1
60	1:00	1
72	1:30	1
94	1:00	1
59	1:00	1
72	1:00	1
94	0:30	
58	0:30	40
72	0:45	
72	5:00	1
10	Forever	1

2.3.2.3. Rictor-PCR

Bei dieser Reaktion wurde entweder ein Produkt von 197bp für das Wildtyp-Allel oder von 297bp für das gefloخته Allel erwartet:

Reaktionsansatz **Rictor**:

Bestandteil	Menge (in μ l)
Thermo-Start ReddyMix Master Mix	10
MgCl ₂ 25 mM	0,8
Rictor F 10 μ M	0,3
Rictor B 10 μ M	0,3
H ₂ O	0,6
Template	2
Gesamtansatz	14

PCR-Programm **Rictor**

Temperatur (in °C)	Dauer (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
94	4:00	1
58	2:00	1
72	3:00	1
94	1:00	1
57	1:00	1
72	1:30	1
94	1:00	1
56	1:00	1
72	1:00	1
94	0:30	
55	0:30	36

72	0:45	
72	5:00	1
10	forever	1

2.3.2.4. *Pax8rtTA*-PCR

Die Primer dieser Reaktion wurden so entworfen, dass bei Vorhandensein des *Pax8rtTA*-Konstrukts im Genom eine Bande von 640bp erwartet wurde:

Reaktionsansatz *Pax8rtTA*:

Bestandteil	Menge (in μ l)
Thermo-Start ReddyMix Master Mix	10
MgCl ₂ 25mM	0,6
<i>Pax8</i> fp (ST1) 10 μ M	0,25
<i>Pax8</i> rp (ST2) 10 μ M	0,25
H ₂ O	1,4
Template	1,5
Gesamtansatz	14

PCR-Programm *Pax8rtTA*:

Temperatur (in °C)	Dauer (in Minuten)	Anzahl der Zyklen
96	0:30	1
95	1:30	1
94	0:40	
55	0:30	35
72	0:45	
72	5:00	1
10	forever	1

2.3.2.5. Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

Nachdem die Reaktionsansätze ihr jeweiliges PCR-Programm durchlaufen hatten, wurden sie mithilfe der Ethidiumbromid-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt.

Das Grundprinzip der Gelelektrophorese beruht darauf, dass die unterschiedlich großen DNA-Fragmente eine unterschiedliche Ladung aufweisen. Durch die unterschiedliche Ladung kommt es zu unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten durch die netzartige Struktur des Agarosegels und damit zur Auftrennung je nach Größe der Fragmente. Die anschließende

Darstellung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff.

Die Taschen eines 2%, mit Ethidiumbromid versetzten, Agarosegels wurden mit dem kompletten PCR-Reaktionsprodukt befüllt. Anschließend wurde für 50 Minuten eine Spannung von 120V angelegt. Nach der verstrichenen Zeit wurden die Banden im Gel mithilfe eines UV-Lichttisches sichtbar gemacht und der jeweils ermittelte Genotyp dokumentiert.

2.4. Stressmodelle

2.4.1. Niedrig-Salz-Diät

Um die Rolle des mTORC2 im Tubulussystem im Hinblick auf seine Funktion für die Salzhomöostase zu untersuchen, erhielten die Versuchstiere (*Ric^{fl/fl}KspCre*) für 4 Tage ausschließlich eine Niedrig-Salz-Diät ($\text{Na}^+ < 0,02\%$; $\text{Cl}^- < 0,02\%$) kombiniert mit Zugang zu destilliertem Wasser. Dieser Stresstest diente dazu, die NaCl-Resorptionsfähigkeit des ASDN zu testen.

2.4.2. Triamteren

Die Behandlung der Versuchstiere mit dem Diuretikum Triamteren (200mg/l in ddH₂O; pH 3,5) im Trinkwasser bei Kontroll-Diät ($\text{Na}^+ < 0,25\%$; $\text{Cl}^- < 0,36\%$) über 4 Tage diente als Stressreiz für das ASDN und sollte überprüfen, ob die pharmakologische Inhibition des Epithelialen Natrium Kanals (ENaC) und der damit verbundene Na^+ -Ionen Verlust bei gleichzeitigem K^+ -Ionen Anstieg von den Versuchstieren ausgeglichen werden konnte.

Sowohl die mit der Niedrig-Salz-Diät als auch die mit Triamteren behandelten Tiere wurden während der 4-tägigen Behandlungsdauer täglich gewogen und die Gewichte zu weiteren Auswertung protokolliert.

2.4.3. Das Ischämie-Reperfusionen-Modell

Ischämie-Reperfusionen-Schäden sind eine der Hauptursachen von akuter Nierenverletzung in der „endogenen“- und der Transplantniere. Der durch die Schädigung entstehende Schaden hat wesentlichen Einfluss auf die langfristige Nierenfunktion (Kennedy, Erlich 2008).

Pathophysiologisch gesehen, führt die Depletion zellulärer Energieträger wie ATP oder GTP während der Ischämie zu verschiedenen Varianten des Zelltodes. So kann es durch den

Schaden zu Nekrose, Apoptose oder autophagozytose-assoziiertem Zelltod kommen (Eltzschig, Eckle 2011).

Nach Wiederaufnahme des Blutflusses folgen zahlreiche Ereignisse: Es kommt zur Zerstörung des Zytoskeletts und zu Veränderungen der zellulären Ionenkonzentrationen und damit zum Zusammenbruch des sorgfältig, unter hohem Energiebedarf aufrechterhaltenen, Ionengleichgewichts. Des Weiteren werden proteolytische und phospholipolytische Signalwege induziert, es entstehen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale und es werden inflammatorische Botenstoffe freigesetzt, die zu einer Leukozyteninfiltration führen. Am Ende dieser Prozesse stehen die oben angesprochenen Wege des Zelltodgangs (Kennedy, Erlich 2008).

Welcher der Wege eingeschlagen wird, scheint dabei durch das Absinken von entweder ATP oder GTP beeinflusst zu werden. So führt ein vermindertes Vorkommen von ATP eher zur Zellnekrose, wohingegen erniedrigte GTP-Spiegel eher zur Induktion der Apoptose führen (Dagher 2000).

Es gibt in letzter Zeit verstärkt Hinweise darauf, dass vor allem der Prozess der Apoptose nach akuten Schädigungen der Niere zur eingeschränkten Nierenfunktion führt. Im Maus-Modell entscheidet sogar eher das Ausmaß der Apoptose als das der Nekrose über den Grad der Funktionseinschränkung (Havasi, Borkan 2011).

Im Falle einer ischämischen Schädigung der Niere, ist vor allem das S3-Segment des proximalen Tubulus, gemeinsam mit der Pars recta des distalen Tubulus, stark betroffen (Bonventre, Yang 2011).

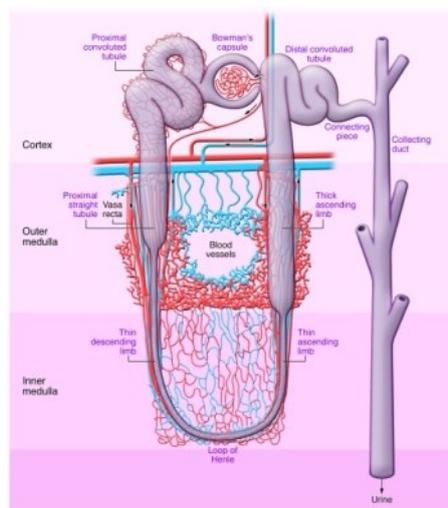


Abbildung 11: Blutversorgung des Nephrons. Gefäßsystem des äußeren Markes (Kapillaren in Rot, Venen in Blau, modifiziert nach (Bonventre, Yang 2011)).

Für Zellen, die sublethal geschädigt sind, stellen Wachstumsfaktoren entscheidende Überlebenssignale dar. Dabei beruht der anti-apoptotische Effekt dieser Hormone unter anderem auf dem oben beschriebenen PI3K Signalweg, der in der Aktivierung von Akt mündet (Bonegio, Lieberthal 2002).

Überlebende tubuläre Progenitorzellen sind in der Lage durch Ausbreitung und Proliferation den entstandenen Schaden zu reparieren. In der gesunden Niere findet Zellteilung in den Zellen des proximalen Tubulus mit einer sehr niedrigen Rate, beobachtet anhand von Färbungen gegen Ki-67 und das proliferierende Zellen Kern Antigen (PCNA), statt. Nach einer ischämischen Verletzung steigt die Proliferationsrate auf ein Niveau ähnlich dem während der Nierenentwicklung und es lassen sich Genexpressionsmuster beobachten, die so sonst nur während der Organogenese zu finden sind. So lässt sich beispielsweise Vimentin, ein Protein aus der Gruppe der Filamentproteine, welches sich sonst in mesenchymalen Zellen findet, in den Zellen des proximalen Tubulus nachweisen. Die proliferative Antwort auf die ischämisch induzierten Schäden wird dabei möglicherweise durch auto- und parakrin freigesetzte Wachstumsfaktoren aufrechterhalten (Bonventre 2003).

Die Gruppe um Lieberthal *et al.* (Lieberthal *et al.* 2001) stellte nun fest, dass die Behandlung von Ratten, deren Nieren durch Ischämie/Reperfusion geschädigt worden waren, mit Rapamycin zu einer deutlich schlechteren Regeneration führte als in der Vergleichsgruppe. Dabei war der Regenerationsprozess der Tubuli sowohl strukturell als auch funktionell deutlich eingeschränkt. Geschädigte tubuläre Epithelzellen verlassen normalerweise die G₀-Phase des Zellzyklus um zu proliferieren; ein für den Reparaturvorgang des Tubulus essentieller Schritt. Die Wirkung von Rapamycin verhindert diesen Schritt und führt zusätzlich über die Blockade von Wachstumsfaktor-vermittelten, die Zellteilung stimulierenden, Reizen zur Induktion der Apoptose, was die Funktionseinschränkung der geschädigten Tubuli aufrechterhält. Im Umkehrschluss kann dem mTOR1-Komplex, dessen Funktion durch die Gabe von Rapamycin gehemmt war, eine tragende Rolle bei sowohl den strukturellen als auch den funktionellen Regenerationsprozessen nach ischämischer Verletzung zugesprochen werden.

2.4.3.1. Durchführung

Zunächst wurde das Versuchstier in Abhängigkeit seines Körpergewichtes (5,5 µl/g Körpergewicht) mit einer Mischung aus Ketamin 10% (3ml), Rompun 2% (1ml) und NaCl-Lösung (0,9%) betäubt. Es folgte eine Lagerung in Rechtsseitenlage und das Besprühen des Fells mit Ethanol 70%. Anschließend wurden die Haare zur Seite gekämmt und ein leicht

bogenförmiger, paravertebraler Schnitt bis zum Rippenbogen durchgeführt. Die darunterliegenden Haut- und Muskelschichten wurden durchschnitten und die Niere stumpf freipräpariert. Um an das Gefäßbündel gelangen zu können, wurde die Niere nach ventral mobilisiert. Nach Freipräparation der Arteria Renalis innerhalb des Bündels wurde die Blutzufuhr für 30 Minuten, durch Aufbringen einer Metallklemme, zum Erliegen gebracht. Während der Klemmzeit wurde die Wunde durch angefeuchtete Kompressen bedeckt gehalten und das Tier unter einer Wärmelampe gelagert. Nachdem die vorgesehene Zeit verstrichen war, erfolgte die visuelle Kontrolle, ob die Niere eine dunkel-violette Farbe angenommen hatte. War dies der Fall, wurde die Klemme gelöst und es wurde unter Sicht überprüft, ob die Niere reperfundiert wurde. Bei Erfolg wurde das Organ reponiert und die Wunde schichtweise verschlossen. Die Zeit bis zum Erwachen aus der Narkose verbrachte das Versuchstier ebenfalls unter der Wärmelampe. Zum Volumenausgleich folgte die intraperitoneale Gabe von 40µl 0,9% Kochsalzlösung pro Gramm Körpergewicht. Nach den entsprechenden Zeiträumen (24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden) wurden die Nieren der Versuchstiere nach der unten beschriebenen Methode entnommen.

2.5. Gewebegewinnung

2.5.1. Präparation und Fixation der Nieren

Die für die Versuche benötigten Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und im Anschluß die Bauchdecke mit einer medialen Laparotomie eröffnet. Das nun freiliegende Darmkonvolut wurde zur Seite geschoben und am Rektum abgetrennt um besseren Zugang zur Aorta abdominalis und den Nieren im Retroperitonealraum zu haben. Ein Paket aus Aorta abdominalis inklusive der Abgänge der Arteriae renales und den Nieren wurde entnommen. Nun erfolgte die Durchspülung jeder Niere mit 1x PBS über die ihr zugehörige A. renalis um das im Gefäßsystem verbleibende Blut auszuwaschen und gleichzeitig die Lumina des Tubulussystems offenzuhalten. Das Bindegewebe um die Niere herum wurde entfernt. Je nach Verwendungszweck der gewonnenen Probe folgte ein unterschiedliches weiteres Vorgehen. Die für Western-Blot vorgesehenen Niere wurden entweder halbiert oder der Nierenkortex scharf vom Nierenmark abpräpariert, für den Fall, dass diese jeweils gesondert untersucht werden sollten. Das gewonnene Material wurde anschließend in 2ml Reaktionsgefäße überführt, welche direkt in flüssigen Stickstoff getaucht wurden um die Gewebe sofort einzufrieren.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen vorgesehene Nieren wurden zusätzlich noch mit 5% und anschließend mit 10% Sucroselösung durchspült und dann mit O.C.T.TM-Einbettmedium bedeckt, wobei ihre Schnittfläche parallel zum Boden der Plastikgewebeträger ausgerichtet war. Anschließend erfolgte ebenfalls das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff.

Um das gewonnene Material für die Lichtmikroskopie und Transmissionselektronentomographie (TEM) vorzubereiten, erfolgte eine Durchspülung mit 4% PFA in 1x PBS. Die durchspülten Nieren wurden dann über Nacht, jedoch mindestens 12 Stunden, bei 4°C weiter fixiert. Im Anschluss wurde die 4% PFA-Lösung gegen eine 0,1% PFA-Lösung ausgetauscht. Die Proben konnten nun bei 4°C gelagert werden oder die für die Lichtmikroskopie und PAS-Färbung vorgesehenen Proben direkt in Paraffin eingebettet werden.

2.5.2. Gewinnung von Urin

Zur Gewinnung von Urin wurden die Mäuse für 2 Stunden in eine Sammelbox mit einer perforierten, für Urin durchlässigen, Mittelebene gesetzt. Sobald der Zeitraum verstrichen war, wurden die Mäuse aus den Kästen geholt und der Urin in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Sollte kein oder zu wenig Urin vorhanden gewesen sein, wurde die Blase der Maus durch manuelle Stimulation entleert und der austretende Urin direkt mit einer Pipette aufgefangen. Der Urin wurde bis zur Auswertung bei -80°C gelagert.

2.5.3. Blutentnahme

Die Tiere wurden zunächst mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde über den inneren Augenwinkel der retroorbitale Venenplexus mit einer Einmal-Kapillare punktiert und das austretende Blut in einem PCR-Gefäß aufgefangen. Die zellulären Blutbestandteile wurden durch dreiminütige Zentrifugation vom Serum getrennt, welches nun behutsam abpipettiert und bei -20°C zur weiteren Analyse aufbewahrt wurde.

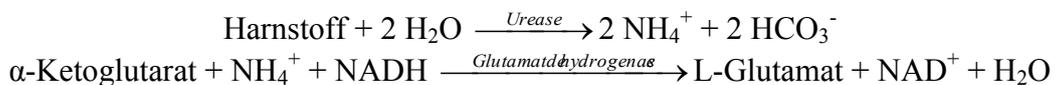
2.6. Analyse der Nierenfunktion

2.6.1. Gewichtsbestimmung

Die Mäuse wurden während der Experimentalzeit täglich gewogen und die Gewichte in einer Tabelle dokumentiert.

2.6.2. Harnstoff

Die quantitative Harnstoff-Bestimmung aus den Seren der zu untersuchenden Mäuse wurde anhand des Harnstoff-Kits (siehe Materialien) durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht auf der vollenzymatischen UV-Methode, die aus 2 aufeinanderfolgenden Reaktionen besteht. In der ersten Reaktion wird Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) von dem Enzym Urease in Hydrogenkarbonat (HCO_3^-) und Ammonium-Ionen (NH_4^+) gespalten. Darauffolgend werden die Ammonium-Ionen gemeinsam mit α -Ketoglutarat ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5$) und NADH als Kofaktor von einem weiteren Enzym, der Glutamatdehydrogenase (GLDH), zu L-Glutamat und NAD^+ umgesetzt.

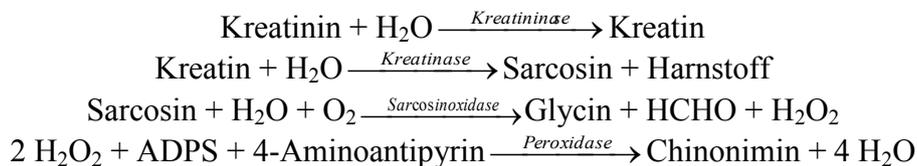


Die Tatsache, dass NADH zwei Absorptionsmaxima, eines bei Licht der Wellenlänge 340nm und das andere bei 260nm, aufweist, NAD^+ hingegen nur eines bei 260nm besitzt, macht man sich bei der Auswertung zunutze. Anhand einer vorher erstellten, genau definierten Eichgerade lässt sich durch die bei 340nm gemessene Absorptionsänderung aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Extinktionsabnahme und Konzentration, die Harnstoffkonzentration in den zu untersuchenden Serumproben bestimmen.

Bei der Messung wurden in Einmal-Küvetten mit 8,5mm Zentrumshöhe jeweils 200 μ l Reagenz (Tris-HCl-Puffer pH 7,8 100 mmol/l, α -Ketoglutarat 6 mmol/l, GLDH \geq 9000 U/l, Urease \geq 4000 U/l, NADH 0,2 mmol/l, Adenosin-5-Diphosphat 2 mmol/l, EDTA 4 mmol/l, Stabilisatoren) sowie entweder 2 μ l Standard oder 2 μ l ddH₂O als Leerwert oder 2 μ l zu untersuchendes Serum durch vortexen vermischt. Nach 1:30 Minuten wurde am Photometer der erste Extinktionswert A_1 abgelesen, nach 3 Minuten der Zweite A_2 . Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten war die strikte Einhaltung der Zeitabstände von großer Wichtigkeit. Nun wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (40mg/dl – 10 mg/dl Harnstoff in ddH₂O und nur ddH₂O als Leerwert) für die Eichgerade erstellt und gemessen. Dabei wurden die Konzentrationen auf die X-Achse und die errechneten Absorptionsänderungen $\Delta E = A_2 - A_1$ auf die Y-Achse eingetragen. Hieraus ergab sich ein linearer Zusammenhang, der sich in der Funktion $y = m \cdot x + n$ ausdrücken ließ. Die jeweilige Konzentration der Probe konnte durch Auflösen nach dem X-Achsenabschnitt errechnet werden.

2.6.3. Kreatinin

Zur Bestimmung des Kreatinins im von den Mäusen gewonnenen Serum wurde das Kreatinin-PAP-Kit verwendet. Die hier zu Einsatz kommende, enzymatische Methode erlaubt eine sehr spezifische und präzise Bestimmung sowohl im Urin als auch im Serum (Guder *et al.* 1986). Ähnlich der oben beschriebenen Harnstoff-Messung beruht diese Messung auf einer Kopplung mehrerer enzymatischer Teilreaktionen, an deren Ende eine photometrische Messung der sich ändernden Extinktion die Bestimmung des Kreatinins im Serum erlaubt. Das vorhandene Kreatinin wird unter Zugabe einiger Substrate (Kreatininase, Kreatinase, Sarcosinoxidase und Peroxidase) schlussendlich zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgesetzt, das in der sogenannten Trinder-Reaktion mit 4-Aminoantipyrin und ADPS einen roten Chinonimin-Farbstoff bildet:



Anhand einer zuvor erstellten Eichgerade lässt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

(ϵ =molarer Extinktionskoeffizient, c =Stoffmengenkonzentration, d =Schichtdicke)

über die bei Licht der Wellenlänge 546nm auftretende Extinktionszunahme die Kreatininkonzentration der jeweiligen Probe bestimmen.

Zunächst wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß jeweils 200 µl Reagenz 1 (Phosphatpuffer, pH 8, 100 mmol/l; ADPS 1 mmol/l; Kreatinase 1 kU/l; Sarcosinoxidase 10 kU/l; Peroxidase 20 kU/l; Ascorbatoxidase 5 kU/l; Kaliumhexacyanoferrat 10 µmol/l) mit entweder 20 µl ddH₂O als Leerwert oder 20 µl Standard oder 20 µl des zu untersuchenden Serums durch vortexen vermischt und danach für 5 Minuten inkubiert. Die darauffolgende Zugabe von 40 µl Reagenz 2 (Phosphatpuffer, pH 8, 100 mmol/l; ADPS 1 mmol/l; 4-Aminoantipyrin 0,2 mmol/l; Kreatinase 60 kU/l) initiierte die oben beschriebenen, aufeinanderfolgenden Reaktionen. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde dann in eine Einweg-Küvette mit 8,5mm Zentrumshöhe überführt und nach 2 Minuten im Photometer der erste Extinktionswert A₁ gemessen. Nach weiteren 2 Minuten wurde der zweite Extinktionswert A₂ notiert. Identisch dem oben bei der Harnstoff-Messung beschriebenen Vorgehen ließ sich nun anhand der Extinktionswerte der Standard-Verdünnungsreihe (2 mg/dl – 0,0625 mg/dl Kreatinin in

ddH₂O und nur ddH₂O als Leerwert) eine Eichgerade erstellen. Das weitere Vorgehen entsprach exakt dem bei der Harnstoff-Messung.

2.6.4. Elektrolyte

Die Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen im Plasma und Urin erfolgte mit Hilfe eines Flammenphotometers. Dabei führt das Zerstäuben der zu untersuchenden Lösung in eine Acetylenflamme zur Lichtemission charakteristischer Wellenlängen. Die thermische Energie der Flamme regt die in der Lösung enthaltenen Atome so stark an, dass sie bei Rückkehr in den Ursprungszustand ein Licht spezifischer Wellenlänge abgeben. Besitzt die Elektrolytlösung eine konstante Volumenstromstärke, so ist die Intensität der Lichtemission der Zahl der angeregten Atome proportional und es lässt sich die exakte Elektrolytkonzentration berechnen.

Das emittierte Licht trifft nach Passieren der entsprechenden Interferenzfilter auf Photoempfänger, die das optische Signal in ein elektrisches umsetzen.

Um die bei der Messung auftretenden Störfaktoren wie eine variierende Zerstäubung oder schwankende Gas- beziehungsweise Luftdrücke auszugleichen, kommt bei der Messung das sogenannte „Leitlinienprinzip“ zum Einsatz: Hierbei wird den Proben- und Eichlösungen jeweils ein konstanter Anteil (5mmol/l) an Lithium-Ionen (Li⁺) zugesetzt. Durch Quotientenbildung mit dem Li⁺-Referenzsignal kann die Elektrolytkonzentration weitestgehend unabhängig von den genannten Störfaktoren ermittelt werden. Dies ermöglicht im Vergleich zu den Standardmesswerten die genaue Konzentrationsbestimmung.

Die Proben wurden jeweils nach Herstellerangaben verdünnt (Eppendorf AG, Hamburg).

2.7. Westernblot

2.7.1. Herstellung von Gesamtnierenlysaten

Um an den für Western-Blotting entnommenen Nieren quantitative Untersuchungen von Ionenkanal-Proteinen und wichtigen Proteinen des mTORC1- beziehungsweise mTORC2-Signalweges durchführen zu können, mussten zuerst Lysate aus dem Gewebe hergestellt werden.

Da endogene Proteasen und Phosphatasen sowie andere endogene Enzyme die Ergebnisse der quantitativen Auswertung deutlich verfälscht hätten, war die permanente Kühlung der Gewebeproben während des gesamten Vorganges der Lysatherstellung essentiell. Zu diesem

Zweck waren alle verwendeten Materialien und Lösungen vorgekühlt und alle Arbeitsschritte geschahen auf Eis.

Zunächst wurde das Gewicht der Proben mit der Feinwaage bestimmt und dokumentiert. Im Anschluss wurden die Gewebe für 2 Minuten mit 3µl Lysepuffer pro mg Nierengewicht im Gewebehomogenisierer zerkleinert. Danach inkubierten sie für 15 Minuten um im Anschluss für weitere 15 Minuten bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert zu werden. Von dem entstandenen Überstand wurden 4µl für die spätere Proteinbestimmung nach Lowry in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Der verbliebene Rest wurde mit exakt dem gleichen Volumen an DTT enthaltendem 2x Lämmli versetzt und für 30 Minuten bei 42°C in einem Wärmeblock erhitzt. Dies führte einerseits zur Denaturierung der Proteine und andererseits reduzierten die im Lämmli enthaltene Detergenzien DTT (Dithiothreitol) und SDS (Sodiumdodecylsulfat) die Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur und sorgten dafür, dass die Eigenladung der Proteine maskiert wurde und sie entsprechend ihrer Größe eine negative Ladung aufwiesen. Die dann fertiggestellten Lysate wurden bei -20°C zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.1.1. Untersuchung von Urin im Westernblot

Um bei den Ischaemie/Reperfusion behandelten *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäusen das Ausmaß des Schadens beurteilen zu können, kam das Protein neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) zum Einsatz. Es wurde 2003 von Mishra *et al.* (Mishra *et al.* 2003) als früh auftretender und sehr sensitiver Biomarker für ischaemische und nephrotoxische Schädigungen im murinen Urin beschrieben.

Um das Vorhandensein und gegebenenfalls die Menge von NGAL im Urin von Ischaemie/Reperfusion behandelten *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäusen untersuchen zu können, wurde zunächst der bei -20°C gelagerte Urin auf Eis aufgetaut. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000rpm für 5 Minuten an. Aus dem Überstand wurden 35µl entnommen und mit der gleichen Menge an 2x Lämmli versetzt. Analog zur normalen Lysatherstellung (siehe oben) folgte ein Erhitzen der Proben auf 42°C für 30 Minuten. Die nun fertiggestellten Proben wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die von Oliver H. Lowry 1951 (Lowry *et al.* 1951) publizierte Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration besteht im Prinzip aus 2 Schritten: Im ersten Schritt bildet sich zwischen

den Peptidbindungen der zu untersuchenden Lösung und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung ein Komplex (Biuret-Reaktion), was in der Reduktion der Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen mündet. Im zweiten Schritt reduzieren die entstandenen Kupfer(I)-Ionen das gelbe Folin-Reagenz zu Molybdänblau. Die entstandene Menge an Molybdänblau steht in linearem Zusammenhang zur vorhandenen Proteinmenge und kann anhand von Licht mit der Wellenlänge von 750nm photometrisch bestimmt werden.

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration kam das BioRad DC Protein Assay Kit zum Einsatz.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Lysate zunächst im Verhältnis 1:50 mit dem bei der Lysatherstellung verwendeten Lysepuffer verdünnt. Des Weiteren wurde aus einer BSA-Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 1,54mg/ml eine absteigende Verdünnungsreihe erstellt (1,54mg/ml – 0,096mg/ml). Als Leerwert diente wiederum der Lysepuffer. Als nächstes wurden in eine 96well-Platte jeweils 25µl einer zuvor hergestellten 50:1 Mischung aus DC Protein Assay Kit Reagent A + Reagent S in jedes Well vorgelegt. Dabei wurden alle Proben doppelt aufgetragen. Jetzt wurden jeweils 5µl der verdünnten Lysate gefolgt von 200 µl DC Protein Assay Kit Reagent B hinzupipettiert. Es folgte eine mindestens 15 Minuten lange Inkubationsperiode bei Raumtemperatur. Bei der Auswertung mittels Photometer kam die Software SoftMax Pro 5.0 zum Einsatz. Differierten die von der Software ermittelten Werte um mehr als 10%, wurden sie verworfen und der Test wiederholt. Andernfalls wurde der Mittelwert aus beiden Proben gebildet und für die Berechnung der Ladungsmenge für die SDS-Gelelektrophorese herangezogen. Diese wurde so gewählt, dass die Proteinkonzentration in allen Proben 100µg/µl betrug.

2.7.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Dieses Verfahren bezeichnet die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und respektive ihrer negativen elektrischen Ladung (siehe oben) durch Anlegen eines elektrischen Feldes an ein Gel. Anschließend erfolgt die Übertragung auf eine Membran und die antikörperbasierte Sichtbarmachung des Bandenmusters. Nun kann, in Relation zu einem Proteingrößen-Marker, das Vorhandensein beziehungsweise die relative Menge des Zielproteins untersucht werden (Towbin *et al.* 1979).

Nach der Herstellung eines 10% Acrylamidgels wurde jeweils die erste Tasche des Gels mit Proteinmarker und die darauffolgenden Taschen mit der zuvor berechneten Lysatmenge beladen. Dann wurde über 30 Minuten eine Spannung von 70V angelegt. Dies diente der Fokussierung des Lysats in der niedrigprozentigen Sammelphase. Die Auftrennung erfolgte

über einen Zeitraum von 1 Stunde und 50 Minuten in dem Maschennetzwerk der Trennphase. Direkt danach wurden die Proteine anhand des iBlot®-Gerätes („Dry“-Blot) bei einer Spannung von 20V über 7 Minuten auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Um Bereiche auf der Membran, auf denen kein Protein gebunden hatte, abzusättigen, blockte die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Proteinwaschpuffer-Lösung mit 5% BSA. Nun inkubierte die Membran über Nacht bei 4°C mit dem in Proteinwaschpuffer-Lösung mit 5% BSA gelösten Primärantikörper. Die Verdünnungen der Primärantikörper unterschieden sich dabei je nach Herstellerangabe. Um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen, folgten 3 fünfminütige Waschschrte. Dann wurde ein, gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichteter, mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Es folgten wieder 3 Waschschrte, an deren Ende das Aufbringen der selbst hergestellten ECL (enhanced chemoluminescence)-Lösung stand. Die Visualisierung kam durch die enzymatische Reaktion, bei der die ECL-Lösung der Meerrettichperoxidase als Substrat dient, zustande. Der in einer Röntgenkassette auf die Membran aufgebrachte Röntgenfilm wird durch die bei der chemischen Reaktion entstehenden Lichtquanten geschwärzt und das Bandenmuster somit sichtbar gemacht. Dabei entspricht die Intensität der Bandenschwärzung der Menge an gebundenem Sekundärantikörper und damit der Proteinmenge.

Zur quantitativen Auswertung wurden die so entstandenen Bilder eingescannt und die Intensität der Banden anhand der Labimage1a-Software ausgewertet. Dabei wurde zunächst der Mittelwert aller Banden gebildet um im Anschluss den Wert jeder Bande durch den errechneten Mittelwert zu dividieren. So wurden die Werte auf die Belichtungsintensität des jeweiligen Röntgenfilms normiert. Dies wurde auch bei den Beladungskontrollen durchgeführt. Nun wurde der Quotient der Werte aus dem zu untersuchenden Protein und seiner Ladungskontrolle gebildet und auf den Wert des Kontroll-Wildtyps normiert. Diese Werte gingen schließlich in die Auswertung ein.

Als Beladungskontrolle dienten Antikörper entweder gegen β -Aktin oder α -Tubulin, ubiquitär in jeder Zelle exprimierte Strukturproteine. War anhand des Bandenmusters der Färbung mit diesen Antikörpern ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Lysaten sichtbar, erfolgte, ebenfalls mit der Labimage1a-Software, ein Beladungsangleich und ein erneuter Durchlauf.

2.8. Mikroskopie

2.8.1. Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung dient der Visualisierung von zu untersuchenden Antigenen im Gewebe. Durch spezifisch gegen das Antigen von Interesse gerichtete Primärantikörper ist es möglich, deren Verteilung und Menge zu untersuchen. Die Sichtbarmachung erfolgt über Sekundärantikörper, die gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Dabei werden diese Antikörper jeweils in unterschiedlichen Spezies generiert und der Sekundärantikörper erkennt Antikörper jeglicher Art aus der Spezies des Primärantikörpers.

Zunächst wurden aus den-oben beschriebenen- in O.C.T.TM-Einbettmedium eingebetteten Nieren am Cryostat 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen.

Im Falle der Gewebe der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäuse wurden jeweils 3 Schnitte pro Niere angefertigt: Nach Erstellen eines Schnittes wurde jeweils 150 µm Gewebe getrimmt, dann folgte der nächste Schnitt. Die Gewebe durchliefen nun die folgenden Schritte:

Schritt	Zeit (in Minuten)
Fixation in 4%PFA in 1x PBS	1.5
Waschen in 1x PBS	3x3
Sättigung freier Aldehydgruppen in 50mM NH ₄ Cl in 1x PBS	7
Waschen in 1x PBS	2x3
Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5%BSA +5%NDS in 1x PBS (Blocking-Lösung)	120
Aufbringen von 100 µl in Blocking-Lösung verdünntem Primärantikörper	45
Waschen in 1x PBS	4x3
Aufbringen von 100 µl in 1x PBS verdünntem Sekundärantikörper	30
Waschen in 1x PBS	4x3
Versiegeln mit 10 µl ProLong® Gold Antifade-Reagenz und einem Deckglas	--

Die Verdünnungen für die Antikörper waren die folgenden:

Antikörper/Kofärbungen	Verdünnung
Anti-KI-67	1:400
Anti-active Caspase3	1:500
Anti-phospho-Ser473-AKT	1:200

Anti-phosho-Ser422-SGK1 (Biorbyt)	1:200
Anti-ENaC	1:500
Anti-human-THP	1:100
Anti-Aquaporin2	1:500
Alle Sekundär-AK	1:500
Rhodamin-DBA	1:125
FITC-gelabeltes LTG	1:500
Hoechst 33342	1:1000

Die den Sekundärantikörpern beigefügten Kofärbungen dienten dazu, bestimmte Teile des Tubulussystems anzufärben und so zu überprüfen, in welches Segment das mit dem Primärantikörper detektierte Antigen lokalisiert. Dabei färbte Rhodamin-DBA spezifisch Sammelrohre und LTG den proximalen Tubulus.

Die gefärbten Gewebeschnitte der *Raptor^{fl/fl}KspCre* und *Rictor^{fl/fl}KspCre* Mäuse wurden an einem AxioVert 200M-Invers-Mikroskop begutachtet, wohingegen die Gewebe der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Tiere am Observer.Z1-Invers-Mikroskop aufgenommen wurden.

Bei den Aufnahmen am AxioVert 200M-Invers-Mikroskop mittels der Axiovision Version 4.8.1 kam das 20x Objektiv zum Einsatz und die Bilder wurden mit aktiviertem ApoTome-Einschubmodul aufgenommen. Dies führt über das Prinzip der strukturierten Beleuchtung (Schaefer *et al.* 2004) zu einem stark verbesserten Kontrast sowie einer merklich besseren Auflösung.

Um eine möglichst objektive Aussage aus den *Ki-67* und *a-Caspase3*-Färbungen der Ischämie-Reperfusion behandelten *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäusen ziehen zu können, mussten Übersichtsaufnahmen der kompletten Niere gemacht werden. Hierzu wurde zunächst die Größe der Niere in 5-facher Vergrößerung im DAPI-Kanal ausgemessen und notiert. Anschließend wurde der Mittelpunkt des Präparates aufgesucht und mit dem des Gesichtsfeldes zur Deckung gebracht. Die zuvor ermittelten Abmessungen der Niere wurden nun in das MosaiX-Plugin der Axiovision-Software eingegeben, damit, ausgehend vom Mittelpunkt des Präparates, mäanderförmig Bilder der ganzen Niere aufgenommen werden konnten. Dies geschah mit Hilfe eines motorisierten Objektisches, der von der Software so angesteuert wurde, dass zwischen dem zuvor aufgenommenen und dem nächsten Bild 10% Überschneidung herrschten. Die Einstellung der korrekten Schärfenebene übernahm dabei die Autofokusfunktion der Axiovision-Software. Nach Beenden der automatisierten Aufnahme wurden die Einzelbilder in 10-facher Vergrößerung anhand des MosaiX-Plugins zu einem großen Bild zusammengefügt und in ihrer Dateigröße reduziert. Da färbe- und schneidetechnisch bedingt auf einigen Bildern Artefakte vorhanden waren, musste für jedes Bild individuell Kontrast und Helligkeit in der Axiovision-Software angepasst werden, bis nur

noch die tatsächlichen Signale zu sehen waren. Diese Bilder wurden nun in das .jpeg Format exportiert um sie mit Adobe Photoshop bearbeiten zu können. Die Bearbeitung diente dazu, die oben beschriebenen Artefakte wie Verwischungen durch den Schneideprozess oder Teile von Gewebe, die außerhalb der eigentlichen Niere lagen, zu entfernen und so bei der späteren Auswertung falsche Werte zu verhindern. Diese Bilder wurden mit dem Nucleus Counter Plugin von ImageJ hinsichtlich Anzahl der DAPI-positiven Kerne und Anzahl von *Ki-67* beziehungsweise von *active-Caspase3* positiven Signalen ausgewertet. Die resultierenden Zahlen wurden in Microsoft Excel in einer Tabelle notiert und ausgewertet.

2.8.2. PAS-Färbung

Die PAS (Periodic-acid-Schiff) – Färbung dient dem Nachweis von Polysacchariden, Glykoproteinen, Muzinen und Glykolipiden. Dabei oxidiert die Perjodsäure benachbarte Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Diese reagieren mit dem Schiffreagenz, einer farblosen fuchsinschwefeligen Säure, welches dann in einen magenta-roten Farbstoff übergeht (Lüllmann-Rauch 2006).

Die bereits auf Objektträger aufgezogenen, in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Freiburg gefärbt. Die darauffolgende Untersuchung der Schnitte fand an einem Axiophot 2 Aufrecht-Lichtmikroskop statt.

2.8.3. Transmissionselektronentomographie

Die in der Arbeit verwendeten transmissionselektronentomographischen Bilder entstanden in Kollaboration mit Hr. Prof. Donscho Kerjaschki (Pathologie, Medizinische Universität Wien).

2.9. Magnetresonanztomographie

Zur morphologischen Beurteilung der Nieren der Wildtyp- und *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mäuse, wurden in Kooperation mit Dr. Wilfried Reichhardt aus der Medizinischen Physik der Radiologischen Klinik des Universitätsklinikums Freiburg MRT-Bilder dieser Mäuse aufgenommen und beurteilt.

Die Aufnahmen entstanden unter Einsatz eines MRT-Protokolls, welches jeweils zwei T₂-gewichtete RARE-Sequenzen enthielt, was eine gute Darstellung des Nierenparenchyms und von Flüssigkeit enthaltenden Strukturen in der Niere gewährleistete.

2.10. Statistische Datenanalyse

Die in den Diagrammen dargestellten Daten sind als Mittelwerte mit den zugehörigen Fehlerbalken als Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Signifikanzprüfung der Werte der Kontroll- beziehungsweise Experimentalwerte erfolgte mit dem unverbundenen Zweistichproben t-Test in Microsoft Excel[®]. Dabei wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant (*) angesehen, ein p-Wert von $< 0,01$ als sehr signifikant (**) und ein p-Wert von $< 0,001$ als höchst signifikant (***) .

3. Ergebnisse

3.1. Die *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mauslinie

3.1.1. Nachweis des tubulusspezifischen Knockouts von *Raptor* und der Phänotyp

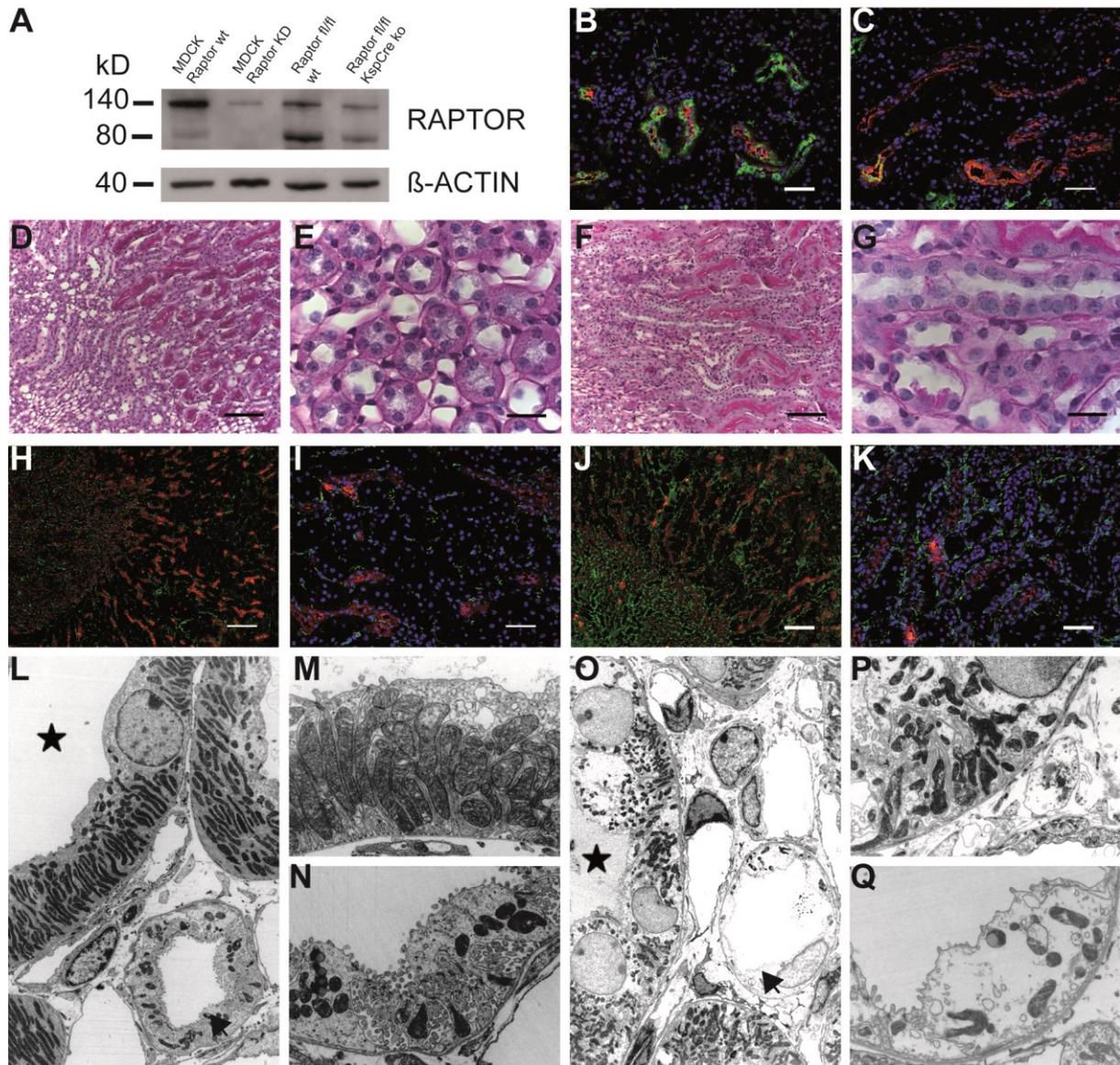


Abbildung 12 : (A) Sehr hohe RAPTOR Bandenintensitäten in den MDCK-Wildtyp-Zellen und dem Maus-Wildtyp. Im Vergleich dazu stark abgeschwächte Intensität in den induzierten Zellen und deutliche Verminderung im Maus-*knockout*. (B) Deutliche Anfärbung von PS6-Protein (grün) in den Tubuli des *Raptor*-Wildtyps. (C) Kaum grünes Signal im *Raptor*-Knockout. (D) und (E) Übersichtsaufnahme (2,5x) und Detailaufnahme (10x) des Wildtyps in der PAS-Färbung. (F) und (G) Übersichtsaufnahme (2,5x) und Detailaufnahme (10x) des *Raptor*-Knockout in der PAS-Färbung. (H) und (I) Färbung gegen Desmin (grün), Tamm-Horsfall-Protein (rot) und Zellkerne (blau) in 5x und 20x im Wildtyp. (J) und (K) Gleiche Färbung wie davor, diesmal im *Knockout*. (L) TEM Übersichtsbild (1500x) des Wildtyps mit Epithelzelle in der TAL (Stern) und im Sammelrohr(Pfeil). (M) TEM-Detailaufnahme (4000x) einer Epithelzelle in der TAL. (N) TEM-Detailaufnahme einer Hauptzelle des Sammelrohrs. (O) TEM Übersichtsbild (1500x) des *Raptor*-Knockout mit Epithelzelle in der TAL (Stern) und im Sammelrohr(Pfeil). (P) TEM-Detailaufnahme (4000x) einer Epithelzelle in der TAL. (Q) TEM-Detailaufnahme einer Epithelzelle des Sammelrohrs.

Abbildung 12A zeigt den Nachweis der *Raptor*-Deletion im Western-Blot. Zum Vergleich wurden Lysate aus MDCK-Zellen in denen ein durch Doxyzyklin induzierbarer *knockdown* von *Raptor* stattgefunden hatte, aufgetragen (Boehlke *et al.* 2010). Die Verringerung der Bandenintensität in der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Maus fällt nicht so deutlich aus wie bei den Zellen, was sich durch das Vorhandensein von anderen Geweben (z.B Bindegewebe und Blutgefäße in denen *Raptor* nicht durch den *KspCre* Promoter deletiert wurde) in den Lysaten erklären lässt. Außerdem tritt bei 80 kDa eine spezifische Bande auf, die möglicherweise ein Spaltprodukt des RAPTOR-Proteins darstellt und dementsprechend in der WT-Situation eine stärkere Bande liefert. Die Bilder 12B und 12C dienen dem Nachweis der tubulusspezifischen Deletion des *Raptor*-Gens in der Immunfluoreszenz in den *Raptor^{fl/fl}KspCre*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In diesen Immunfluoreszenzfärbungen leuchten alle Zellkerne durch den Farbstoff Hoechst 33342 blau, das von den Zellen der TAL und des distalen Tubulus sezernierte Tamm-Horsfall-Protein durch einen entsprechenden Antikörper rot und das *downstream* von mTORC1 liegende Phospho-S6-Protein (P-S6P) grün. Der Antikörper gegen PS6-P kam stellvertretend für einen RAPTOR-Antikörper zum Einsatz, da es keine in dieser Färbetechnik gut funktionierenden Antikörper gegen RAPTOR gab. Erwartungsgemäß lässt sich im Wildtyp ein starkes grünes P-S6P Signal, als Ausdruck einer vorhandenen mTORC1-Aktivität, feststellen, welches deutlich mit dem roten THP-Signal kolokalisiert. In der *Raptor^{fl/fl}KspCre*-Maus hingegen findet sich außerhalb der TAL, beispielsweise in Gefäßen auch grünes Signal, allerdings stark vermindert und es überlagert nicht mit dem THP-Signal. Dies zeigt an, dass in den Tubulusepithelzellen des *KSP*-Promoterbereichs keine Aktivierung von S6P durch mTORC1 stattfindet. Das Signal außerhalb des Promoterbereiches, wie in den angesprochenen Gefäßendothelien, entspricht dem des Wildtypen.

Die Bilder 12D, 12E, 12F und 12G zeigen die Histologie des Wildtyps und des *Raptor*-Knockouts in der PAS-Färbung. Im Wildtyp findet sich bei fünffacher und zwanzigfacher Vergrößerung des kortikomedullären Überganges das typische Bild eines gesunden Nierengewebes mit regelrecht konfigurierten, stark PAS-positiven Epithelzellen der TAL und etwas weniger intensiv gefärbten Epithelien in Sammelrohren. Beim *knockout* hingegen lässt sich eine interstitielle Bindegewebsvermehrung feststellen. Luminal finden sich abgelöste Epithelzellen und PAS-positives Material, die Basalmembran ist verdickt und es deutet sich ein verschobenes Zellkern- zu Zytosplasmaverhältnis an.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen in den darauffolgenden Bildern (Abb. 12H-12K) soll anhand eines Antikörpers gegen das Intermediärfilament Desmin überprüfen, ob eine Fibrose

des Nierengewebes vorliegt. In den fünffach vergrößerten Bildern fehlt aus Gründen der Übersicht eine Zellkernfärbung. Der Antikörper gegen Desmin liefert ein grünes Signal und das rote Signal kommt durch einen Antikörper gegen THP zustande. Im Wildtyp zeigen mäßig vorkommende grüne Signale einen normalen Gehalt an Fibroblasten beziehungsweise Myofibroblasten an, in der zwanzigfachen Vergrößerung lassen sich nur vereinzelte grüne Signale ohne spezifisches Verteilungsmuster ausmachen. Im *knockout* hingegen finden sich zahlreiche grüne Signale, die, wie in der höheren Vergrößerung sichtbar, einem peritubulären Verteilungsmuster zu folgen scheinen. Insgesamt lässt sich hier also eine deutliche Fibrosierung feststellen.

Die TEM-Bilder (Abb. 12L-12Q) zeigen in 1500x und 4000x Vergrößerung TAL- und Sammelrohrepithelien. Die TAL-Zelle (Abb. 12M) zeichnet sich durch ein hohes Vorkommen an pallisadenförmig angeordneten Mitochondrien aus. Am basalen Zellpol weist sie eine starke Faltung auf. In der Sammelrohr-Zelle (Abb. 12N) finden sich apikale Mikrovilli, die Form der Mitochondrien ist abgerundet und sie verfügt ebenfalls über basale Einfaltungen. Es zeigt sich nur eine geringe Menge an interstitiellem Bindegewebe.

Im *knockout* zeigen sich die Zellen bereits in der Übersicht (Abb. 12O) mit aufgelockertem Zytoplasma, sie wirken angeschwollen. Es imponiert eine deutliche Bindegewebsvermehrung kombiniert mit einer Rarifizierung der Mitochondrien, die kleiner und fragmentiert erscheinen. In der Vergrößerung (Abb. 12P, 12Q) ist erkennbar, dass beide Zelltypen scheinbar ihre basale Einfaltung verloren haben und es finden sich Vakuolen im Zytoplasma. Im Sammelrohr (Abb. 12Q) lässt sich eine Aufhellung des Zytoplasmas erahnen.

3.1.2. Auffälligkeiten und Makroskopie

Im täglichen Umgang mit den Tieren fiel bei den *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mäusen ein deutlich vergrößerter Urinabgang auf, der sich in einer erhöhten Menge an nassem Einstreu im Käfig bemerkbar machte. Die Quantifizierung dieses Befundes erfolgte durch Sammlung des Urins in Urin-Boxen über einen kurzen Zeitraum und anschließende Hochrechnung auf die Stunde:

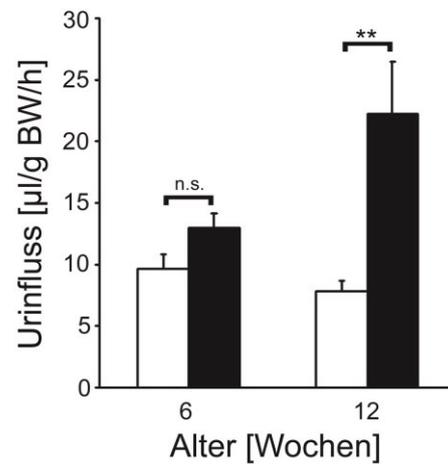


Abbildung 13: Urinfluss bei Wildtypen (weiß) und *Raptor^{fl/fl}KspCre*-Mäusen (schwarz). n=10 zu beiden Zeitpunkten.

Aus Abb. 13 kann man entnehmen, dass im Alter von sechs Wochen noch kein signifikanter Unterschied in der Menge des ausgeschiedenen Urins zwischen den Versuchstieren auftrat. Dies änderte sich im Alter von 12 Wochen: Der Knockout zeigte nun eine gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Urinausscheidung. Das morphologische Korrelat dieser gesteigerten Ausscheidung fand sich im Knockout in Form eines deutlich erweiterten Ureters wieder (Abb. 14).

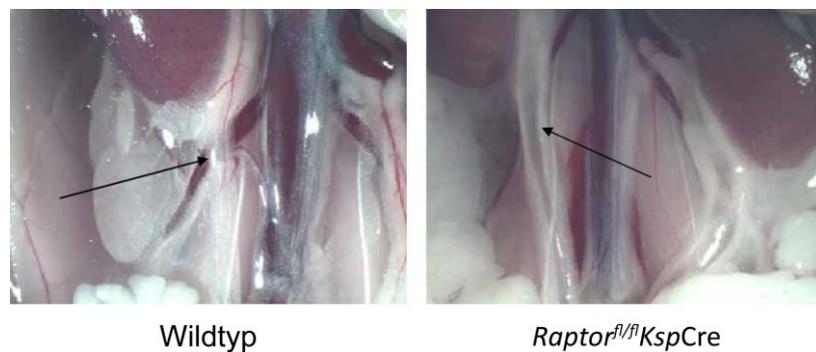


Abbildung 14: Eröffneter Retroperitonealraum mit freipräpariertem Ureter (Pfeile).

Das Ergebnis der MRT-Untersuchung der Nieren findet sich in Abb. 15:

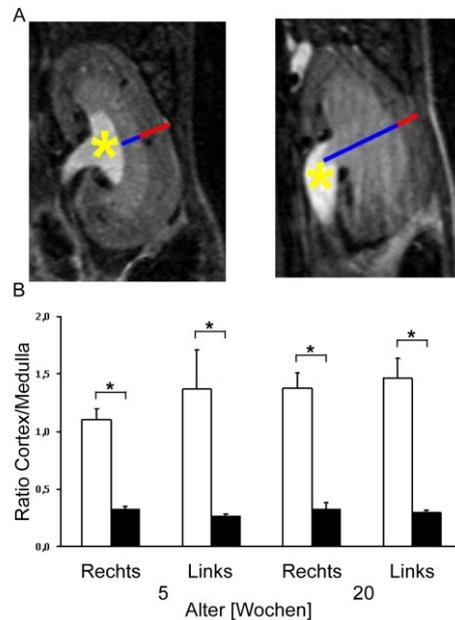


Abbildung 15: MRT Untersuchung der Niere. (A) Links: Niere des Wildtyps mit Nierenbecken (gelber Stern) Nierenmark (blauer Strich) und Nierenkortex (roter Strich). Rechts: Niere des Knockouts mit identischer Markierung. (B) Verhältnis der Dicke des Kortex zu Dicke des Mark (Wildtyp weiß, Knockout schwarz).

In der MRT-Untersuchung imponiert im *knockout* eine deutliche Dickenzunahme des Markes und eine geringe Abnahme der Dicke des Kortex. Im Diagramm zeigt sich beim Wildtyp ein konstantes Verhältnis von Mark zu Kortex, wohingegen das Verhältnis beim *knockout* aufgrund der starken Zunahme der Dicke des Marks um einen Faktor zwei bis drei niedriger ist als beim Wildtyp.

3.1.3. Untersuchung von Iontentransportern und -Kanälen im Western-Blot

Um dem Phänotyp der gesteigerten Diurese auf den Grund zu gehen, wurden aus den Nieren der Versuchstiere Lysate hergestellt. Dies sollte überprüfen, ob die Expression von für die Elektrolytresorption wichtigen Iontentransportern beziehungsweise Kanälen durch die Deletion des *Raptor* Gens verändert war und in der Folge die gestörte Elektrolytresorption zu einer gesteigerten Diurese führt.

3.1.3.1. Transporter und Ionenkanäle

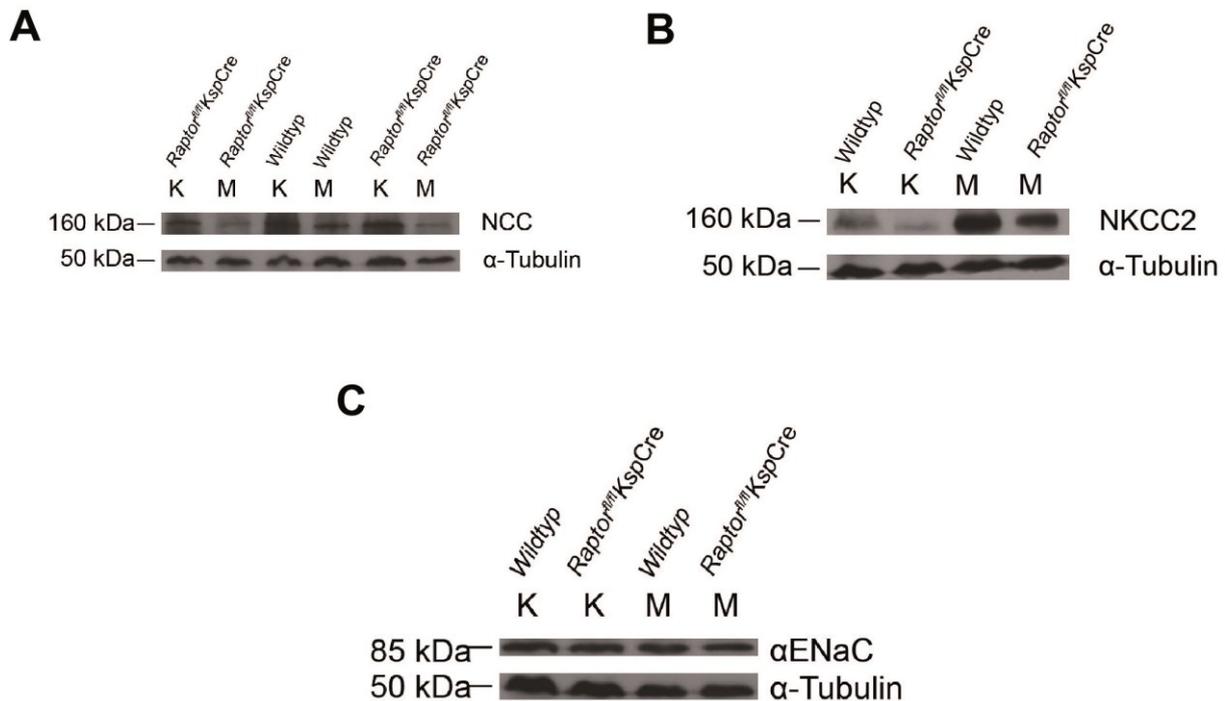


Abbildung 16: Quantifikation verschiedener Ionentransporter im Western-Blot. (A) Physiologische Bandenintensitäten für den Natrium-Chlorid-Kotransporter (NCC) in Kortex und Medulla der Wildtypen (K und M). Deutlich verminderte Bandenintensitäten in Kortex und Medulla der *knockouts* (K und M). (B) Physiologische Expressionslevel des Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters im Kortex (K) und der Medulla des Wildtyps (M), im Vergleich dazu verminderte Intensitäten sowohl im Kortex (K) als auch der Medulla des *knockouts* (M). (C) Gleiche Bandenintensitäten des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) im Kortex (K) und der Medulla (M) sowohl des Wildtyps als auch des *knockouts* (K und M).

Bedingt durch den *Ksp*-Promoter, beginnt die Cre-vermittelte Deletion des *Raptor*-Gens erst in den Zellen der TAL und erstreckt sich von dort abwärts (Shao *et al.* 2002). Aus Abb. 14A lässt sich anhand der verringerten Bandenintensitäten folgern, dass in den Bereichen, in denen ein mTORC1-Knockout vorlag, eine geringere Expression des NCC stattfand. Gleiche Bandenintensitäten in Kortex und Medulla der Wildtypen sowie im Kortex des *knockouts* weisen auf physiologische Expressionslevel hin.

Außerdem wurde der NKCC2 untersucht, welcher physiologischerweise nur in den Zellen der TAL vorkommt. Da sich die TAL überwiegend im Nierenmark befindet, zeigt sich in Abb. 16B im Kortex des Wildtypen eine schwache Bande. Im Mark hingegen erwartungsgemäß eine sehr starke. Im *knockout* sind die Bandenintensitäten in beiden Fällen niedriger und weisen so auf eine verminderte Expression des NKCC2 hin.

Die Expressionslevel des α ENaC scheinen, wie aus Abb. 16C durch gleiche Bandenintensitäten in allen Proben ersichtlich, im Wildtyp und *knockout* gleich zu sein.

3.1.3.2. Aquaporin 2

Um als Ursache des beobachteten, erhöhten Urinflusses einen Diabetes insipidus auszuschließen, erfolgte die Untersuchung von Aquaporin 2 im Western-Blot:

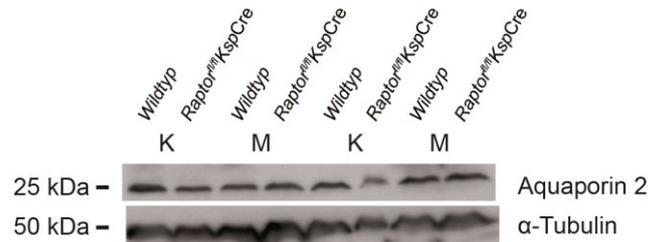


Abbildung 17: Untersuchung von Aquaporin 2 im Western-Blot. Keine verringerten Bandenintensitäten in Kortex (K) oder Medulla (M) des *knockout* im Vergleich zum Wildtyp feststellbar.

Da weder in kortikalen- noch in medullären Sammelrohren ein Unterschied in den Bandenintensitäten von Aquaporin 2 festzustellen war, deutete dies nicht auf einen Diabetes insipidus renalis als Ursache hin.

3.1.3.3. Der Mitochondrienmarker PGC1-α

Die Untersuchung des für die mitochondriale Biogenese sehr wichtigen Faktors PGC1-α (Puigserver, Spiegelman 2003) im Western-Blot, sollte möglicherweise veränderte Expressionslevel dieses Proteins aufdecken. Es kamen ausschließlich Medulla enthaltende Lysate zum Einsatz, da hier der Anteil des Gewebes mit Cre-mediiertem *Raptor-knockout* höher war.

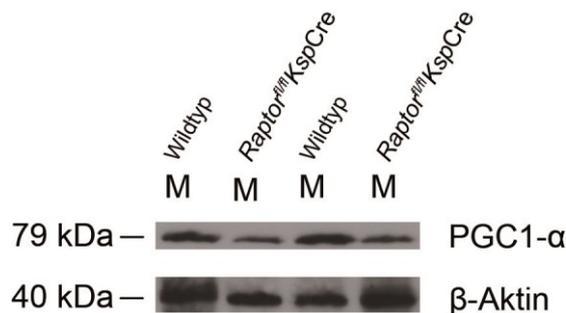


Abbildung 18: Untersuchung von PGC1-α in Medulla-Lysaten. Verminderte Bandenintensitäten bei den *knockouts*.

Abb. 18 deutet an, dass in den Geweben der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Tiere verminderte Expressionslevel von PGC1-α vorliegen könnten. Dies lieferte einen ersten Hinweis auf den, in den TEM-Bildern beobachteten mitochondrialen Phänotyp.

3.2. Die $Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre$ -Mauslinie

3.2.1.1. Physiologische Auffälligkeiten der $Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre$ -Maus

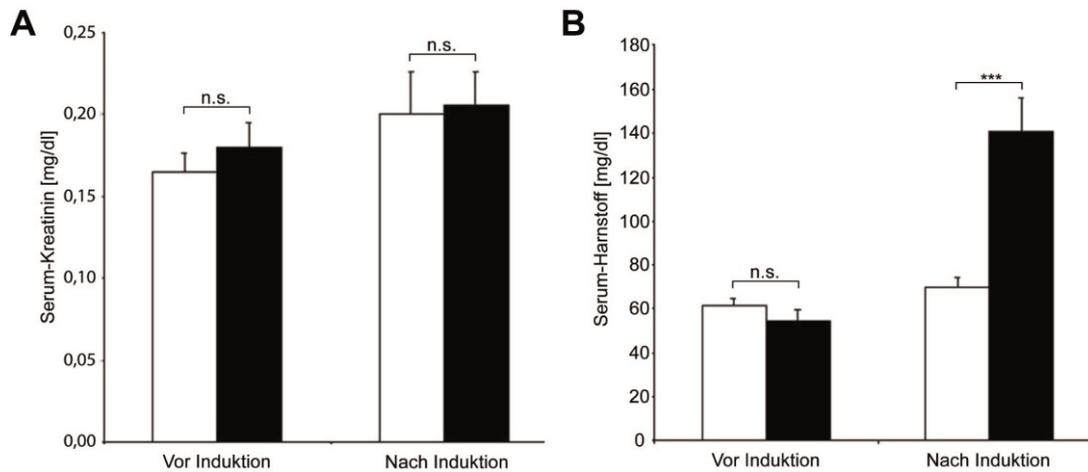


Abbildung 19: Serum Kreatinin- und Harnstoffwerte der $Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre$ -Mauslinie. Darstellung der Werte vor und nach Induktion, (*knockout* schwarz, Wildtyp weiß)

Bei der funktionellen Aufarbeitung dieser Mauslinie ließ sich am Kreatininwert als Parameter der Nierenfunktion sowohl vor Induktion des *knockouts* mit Doxyzyklin als auch nach erfolgter Induktion kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Bei der Messung des Serumharnstoffs hingegen wies ein signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöhter Serum-Harnstoffwert auf eine möglicherweise gestörte Gegenstrommultiplikation hin.

3.2.1.2. Histologische Aufarbeitung der unbehandelten Kontrolltiere

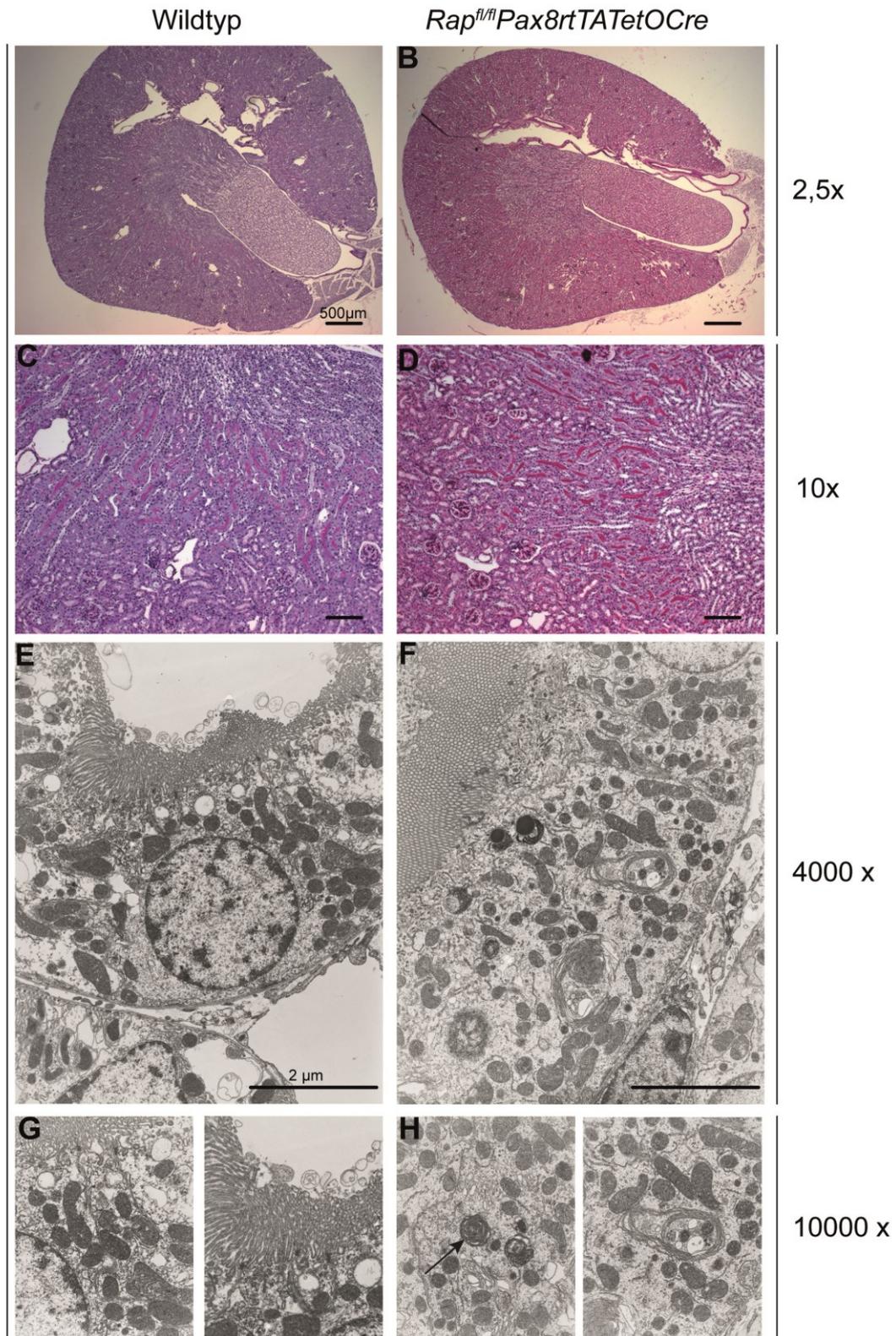


Abbildung 20: Histologische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung der unbehandelten Tiere. (A) und (B) Übersichtsaufnahmen der Nieren in der PAS-Färbung. (C) und (D) Detailaufnahmen der vorausgegangenen Bilder. (E) und (F) TEM-Übersichtsaufnahmen (4000x) einer Epithelzelle des Sammelrohres. (G) und (H) TEM-Detailaufnahmen (10000x) der vorausgegangenen Bilder.

Die histologische Untersuchung der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Tiere in der PAS-Färbung zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine Auffälligkeiten. Es findet sich das Bild eines gesunden Nierengewebes ohne morphologische Veränderungen. Bei der genaueren Untersuchung in der Elektronenmikroskopie zeigen sich im *knockout* Myelinosomen (Pfeil Abb. 20H) und ein vermeintlich verringertes Vorhandensein von Endozytosevesikeln.

3.2.1.3. Untersuchung der Rolle von mTORC1 für die Regenerationsfähigkeit anhand von I/R

Anhand der induzierbaren *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mauslinie sollte die Rolle des mTORC1-Komplexes für die Regenerationsfähigkeit des Tubulussystems untersucht werden. Hierzu wurden die Nieren ischämisch geschädigt und ermöglichten so im Anschluss die Untersuchung der Regenerationsprozesse.

3.2.1.3.1. Untersuchung des Urins

Einen ersten Hinweis auf eine höhere Schädigung bei Fehlen des mTORC1-Komplexes gab die Untersuchung des Ischämie-Markers NGAL im Urin der I/R-Tiere:

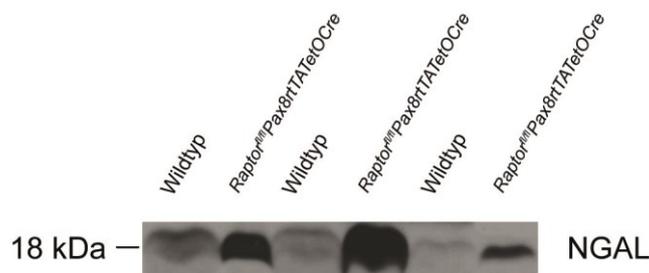


Abbildung 21: Darstellung von NGAL im Western-Blot aus Urin der I/R-Tiere.

Beim *knockout* zeigten sich deutlich höhere Bandenintensitäten von NGAL als beim Wildtyp, was auf ein größeres Vorkommen dieses Proteins im Urin hinwies und damit eine stärkere Schädigung anzeigte.

3.2.1.3.2. Histologische Aufarbeitung

Die Nieren der Versuchstiere wurden wie oben beschrieben I/R-behandelt und dann, zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, zur Aufarbeitung mittels Histologie in der PAS-Färbung und Immunfluoreszenzfärbungen entnommen.

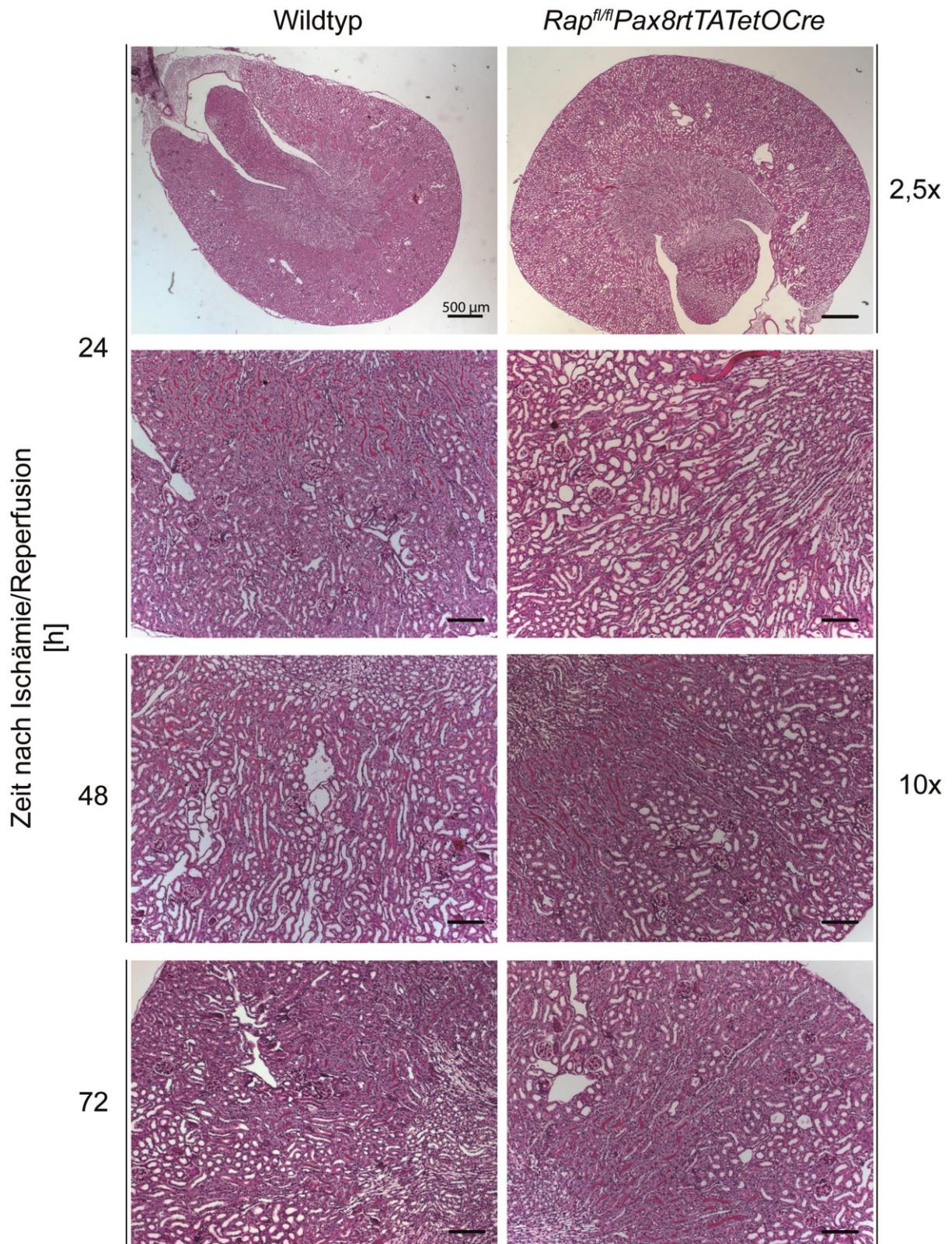


Abbildung 22: Histologie in der PAS-Färbung nach erfolgter I/R-Behandlung zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten.

24 Stunden nach der ischämischen Schädigung ließen sich im Wildtyp in den Tubuli noch Reste des Bürstensaums erkennen, das Gewebe wirkte partiell aufgelockert. Im *knockout*

hingegen sprachen abgeflachte Epithelien, der komplette Verlust des Bürstensaums sowie Zellschutt und PAS-positive Zylinder in den Tubuli für ein deutlich größeres Ausmaß des Schadens. Zum nächsten Untersuchungszeitpunkt nach 48 Stunden zeigte sich langsam regenerierendes Gewebe im Wildtyp, wobei im *knockout* nur vereinzelt Zeichen einer Regeneration auszumachen waren. Nach 72 Stunden waren die Regenerationsprozesse im Wildtyp weiter fortgeschritten und auch bei den *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Tieren ließ sich eine Regeneration beobachten, allerdings deutlich verlangsamt.

3.2.1.3.3. Untersuchung von Apoptose und Proliferation in der Immunfluoreszenz

Um zu überprüfen, ob eine Deletion von mTORC1 eine erhöhte Apoptoserate nach sich zieht und so den durch die Ischämie hervorgerufenen Schaden zusätzlich vergrößert (Lieberthal *et al.* 2001), fand eine Untersuchung des für den apoptotischen Prozess wesentlichen Enzyms *active-Caspase3* statt.

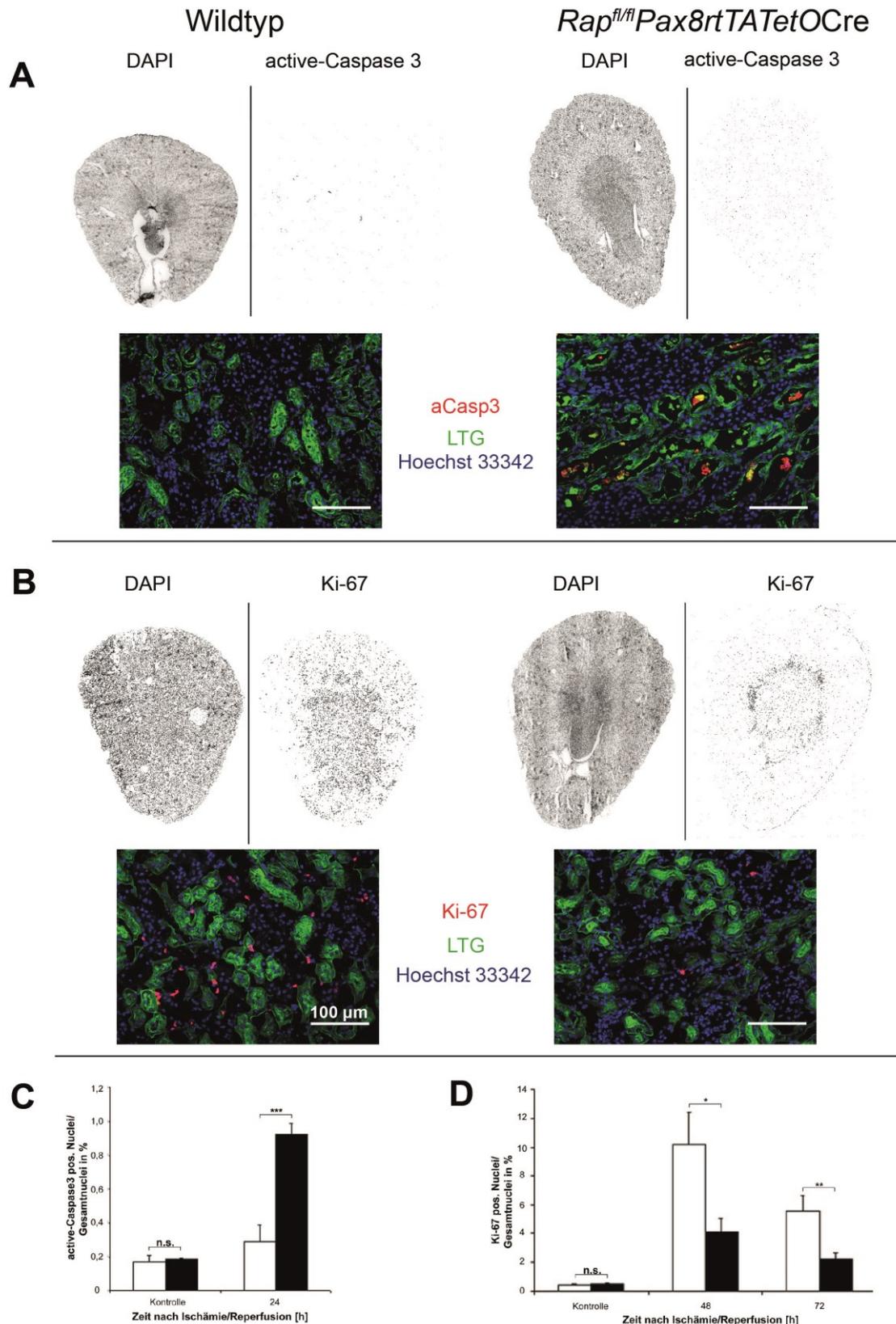


Abbildung 23: Darstellung von *active-Caspase3* und *Ki-67* in der Immunfluoreszenz sowie deren Quantifikation. (A) Vereinzelte *active-Caspase3* Signale im Wildtyp, deutliche Zunahme im Gewebe der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Tiere. (B) Hohe Anzahl von *Ki-67* Signalen im Wildtyp, geringere Anzahl von Signalen beim *knockout*. Vermehrtes Auftreten der Signale im Markbereich. (C) Auftreten einer signifikant erhöhten Zahl von *active-Caspase3*-Signalen im mTORC1-*knockout* 24 Stunden nach der ischämischen Schädigung (Wildtyp weiß; *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre* schwarz; Kontrolle n=3; 24h n=5). (D) Kein Unterschied in der Proliferationsrate unter Kontrollbedingungen, Sowohl 48 als auch 72 Stunden nach Schädigung signifikant erhöhte Proliferationsraten im Wildtyp verglichen zum *knockout* (Kontrolle n=3; 48h n=5; 72h Wt n=4 und Ko n=7).

Wie in Abb. 23A dargestellt, deutete sich beim Wildtyp eine Zunahme der Apoptoserate an. Um dies genauer zu quantifizieren, erfolgte eine softwarebasierte Auszählung der Signale (Abb. 23C). Hier bestätigte sich die höhere Zahl an *active-Caspase3* Signalen und demonstrierte die beim *knockout* höhere Apoptoserate.

Um die Rolle von mTORC1 für die Regenerationsprozesse nach der ischämischen Schädigung näher zu beleuchten, erfolgte die Beurteilung der Proliferation anhand eines Antikörpers gegen das im Zellkern vorkommende Protein *Ki-67*, welches nur in proliferierenden Zellen auftritt (Gerdes *et al.* 1983) (Abb. 23B).

Um eine möglichst objektive Aussage zu erhalten, erfolgte ebenfalls eine softwarebasierte Auswertung der Färbungen (Abb. 23D). Die Grafik illustriert, dass sich die höchste Anzahl an proliferierenden Zellen 48 Stunden nach der ischämischen Schädigung finden ließ. Im *knockout* war die Zahl jedoch signifikant niedriger. Nach 72 Stunden fand insgesamt schon weniger Zellteilung statt, in den Geweben der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäuse wiederum weniger als im Wildtyp. Die Proliferationsraten in der nicht geschädigten Niere unterschieden sich nicht.

3.3. Die *Ric^{fl/fl}* *KspCre*-Mauslinie

3.3.1.1. Morphologische Beurteilung

Anhand dieser Mauslinie sollte untersucht werden, welche Rolle der mTORC2-Komplex für die Wasser- und Salzhomöostase des distalen Tubulus spielt. Es erfolgte zunächst eine morphologische Beurteilung anhand von PAS-gefärbten Gewebeschnitten und Färbungen gegen das Intermediärfilament Desmin sowie den Proliferationsmarker *Ki-67*.

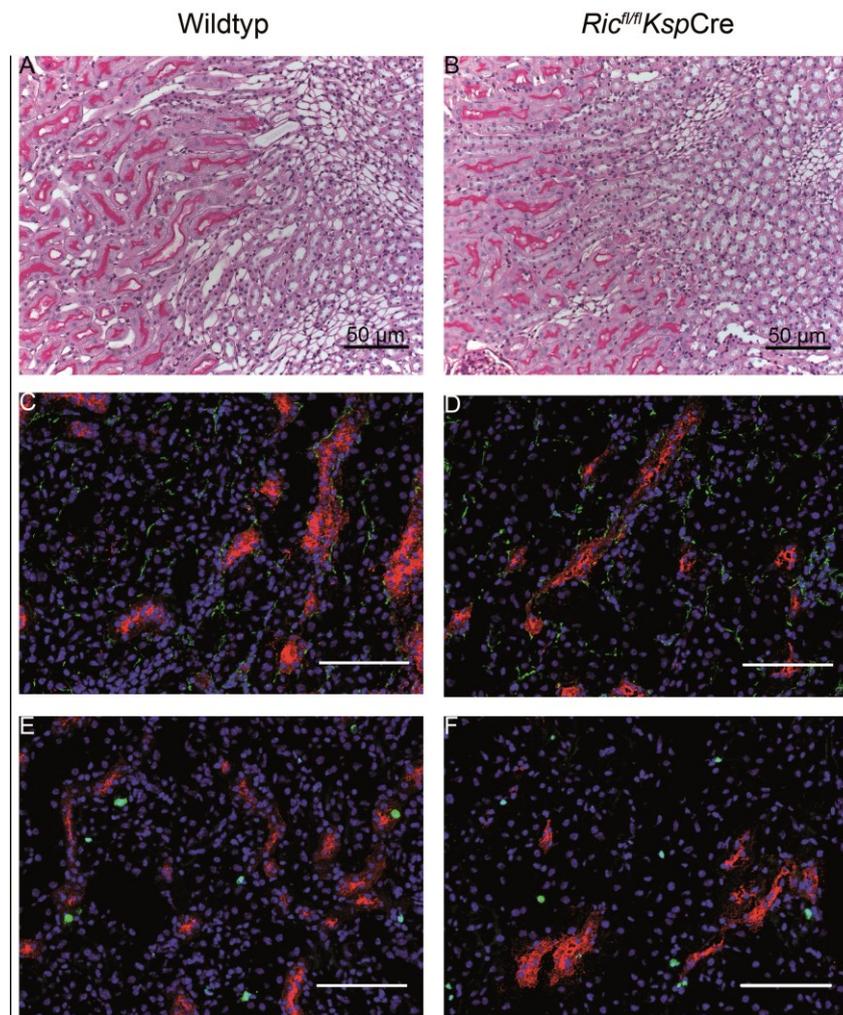


Abbildung 24: PAS-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung von Wildtypen und *Ric^{fl/fl}* *KspCre*-Gewebe. (A) und (B) Keine morphologischen Auffälligkeiten in der kortikomedullären Übergangszone sowohl im Wildtyp als auch im *knockout*. Es finden sich regelrecht konfigurierte Tubuli mit normal hohen Epithelzellen und normal ausgeprägtem Bürstensaum; keine sichtbaren morphologischen Unterschiede. (C) und (D) Keine Zunahme des Signals des Antikörpers gegen Desmin (grün) und damit keine sichtbare Nierenfibrose (Tamm-Horsfall-Protein rot, Zellkerne blau). (E) und (F) Keine Zunahme des Signals des Antikörpers gegen *Ki-67* (grün) und anhand dessen keine erhöhte oder erniedrigte Zellproliferation (blau und rot wie oben).

Die morphologische Beurteilung der *Ric^{fl/fl}* *KspCre*-Tiere in der PAS-Färbung sowie die Untersuchung des Fibrosemarkers Desmin und der Zellproliferation anhand von *Ki-67* konnten keinerlei Unterschiede zum Wildtyp hervorbringen.

3.3.1.2. Belastungstests zur Überprüfung der Tubulusfunktion

Da unter normalen Bedingungen keine Unterschiede zum Wildtyp festzustellen waren, sollten eine Niedrig-Salz-Diät und die Behandlung mit dem ENaC-Blocker Triamteren, die Fähigkeit des distalen Tubulus Natrium zu resorbieren beziehungsweise Natrium-Verlust zu kompensieren, testen. Sollte mTORC2 an der Regulation der Wasser und Salz-Homöostase beteiligt sein, müssten die Stresstests bei den *knockouts* Unterschiede hervorbringen. Dabei spielte während des Versuchszeitraums die Bestimmung des Gewichtes eine wichtige Rolle, da das Körpergewicht als Indikator für die Befindlichkeit und das Gedeihen der Mäuse herangezogen werden sollte.

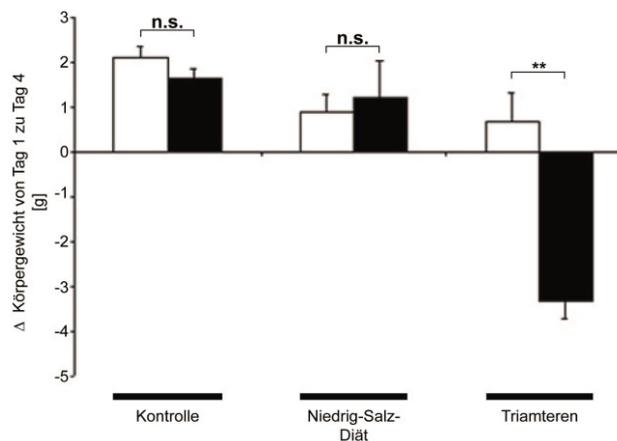


Abbildung 25: Gewichtsverlauf während der Belastungstests (Wildtyp weiß, *Ric^{fl/fl}KspCre* schwarz). Kontroll- und Niedrig-Salz-Gruppen n=4; Triamterengruppe n=12.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, trat bei der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem *knockout* auf. Ähnlich verhielt es sich bei der Niedrig-Salz-Diät Gruppe. In der Triamteren Gruppe zeigte sich ein massiver Unterschied zwischen den Wildtypen und den *Ric^{fl/fl}KspCre*-Tieren. Sie verloren über die Dauer der Behandlung signifikant an Gewicht und der Allgemeinzustand der Mäuse hatte sich rapide verschlechtert. Beim Wildtyp ließ sich kein Unterschied zu den anderen Gruppen feststellen.

3.3.1.2.1. Evaluation der *downstream targets* von mTORC2 in der Immunfluoreszenz

Es fand eine Evaluation der *downstream* von mTORC2 liegenden Substrate Akt sowie SGK1 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen an den Geweben der den Stresstests unterzogenen, Tiere statt. Akt wird von mTORC2 an ihrem *hydrophobic motif* an Ser 473 phosphoryliert (Garcia-Martinez, Alessi 2008) und es kam ein Antikörper zum Einsatz, der diese

phosphorylierte Form detektiert. Die durch Aldosteron induzierbare Kinase SGK1 wird ebenfalls von mTORC2 an ihrem *hydrophobic motif* an Ser 422 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Lu *et al.* 2010). Auch hier wurde ein Antikörper verwendet, der die phosphorylierte Form erkennt.

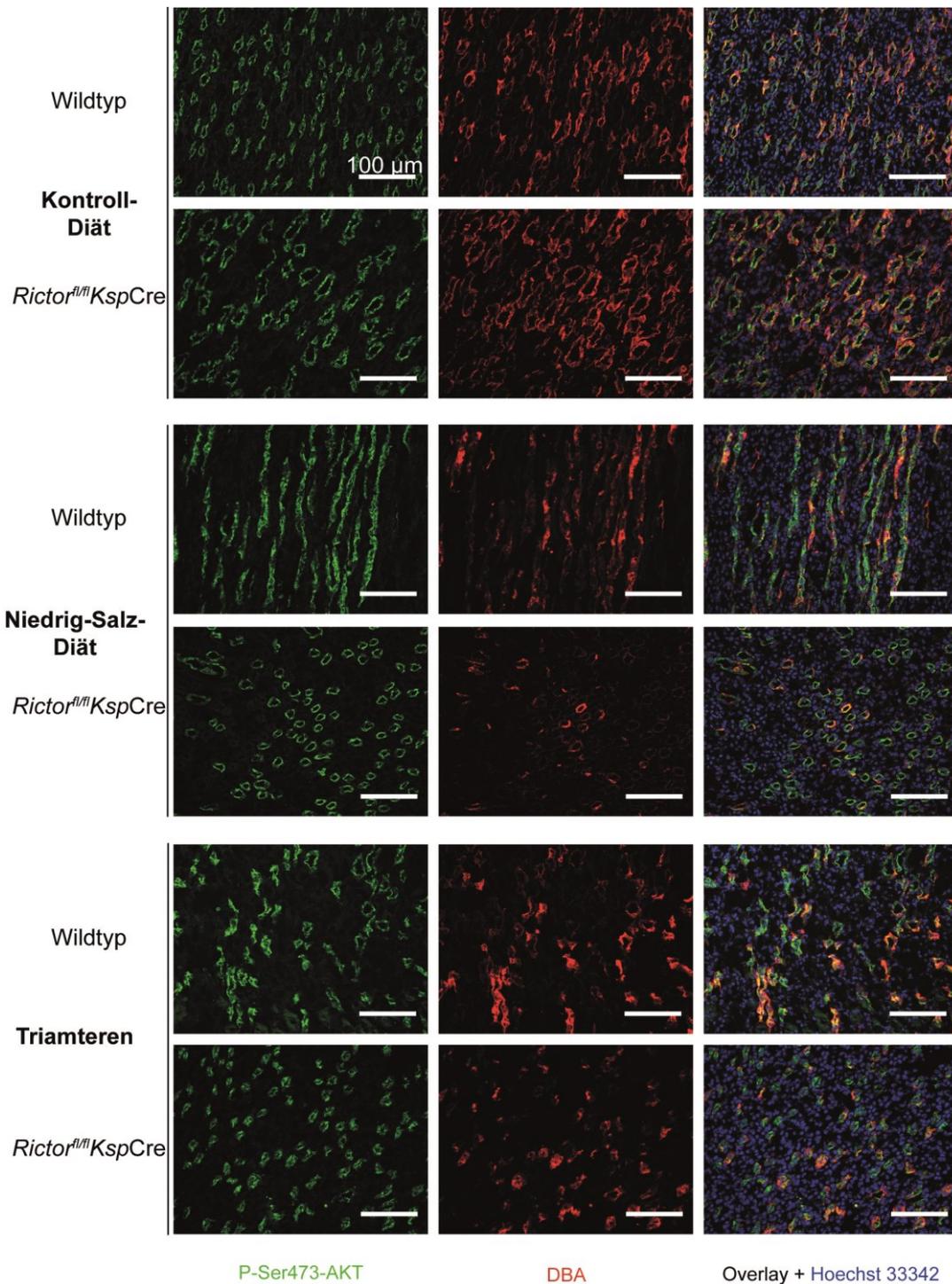


Abbildung 26: Darstellung von P-Ser473-Akt in medullären Sammelrohren in den unterschiedlichen Gruppen. Es lässt sich in allen Versuchsgruppen ein gleichstarkes P-Ser473-Signal (grün) sowohl im Wildtyp als auch bei den *Ric^{fl/fl} KspCre*-Tieren feststellen (Sammelrohre liefern anhand des Komarkers DBA ein rotes Signal, Zellkerne durch Hoechst 33342 ein blaues).

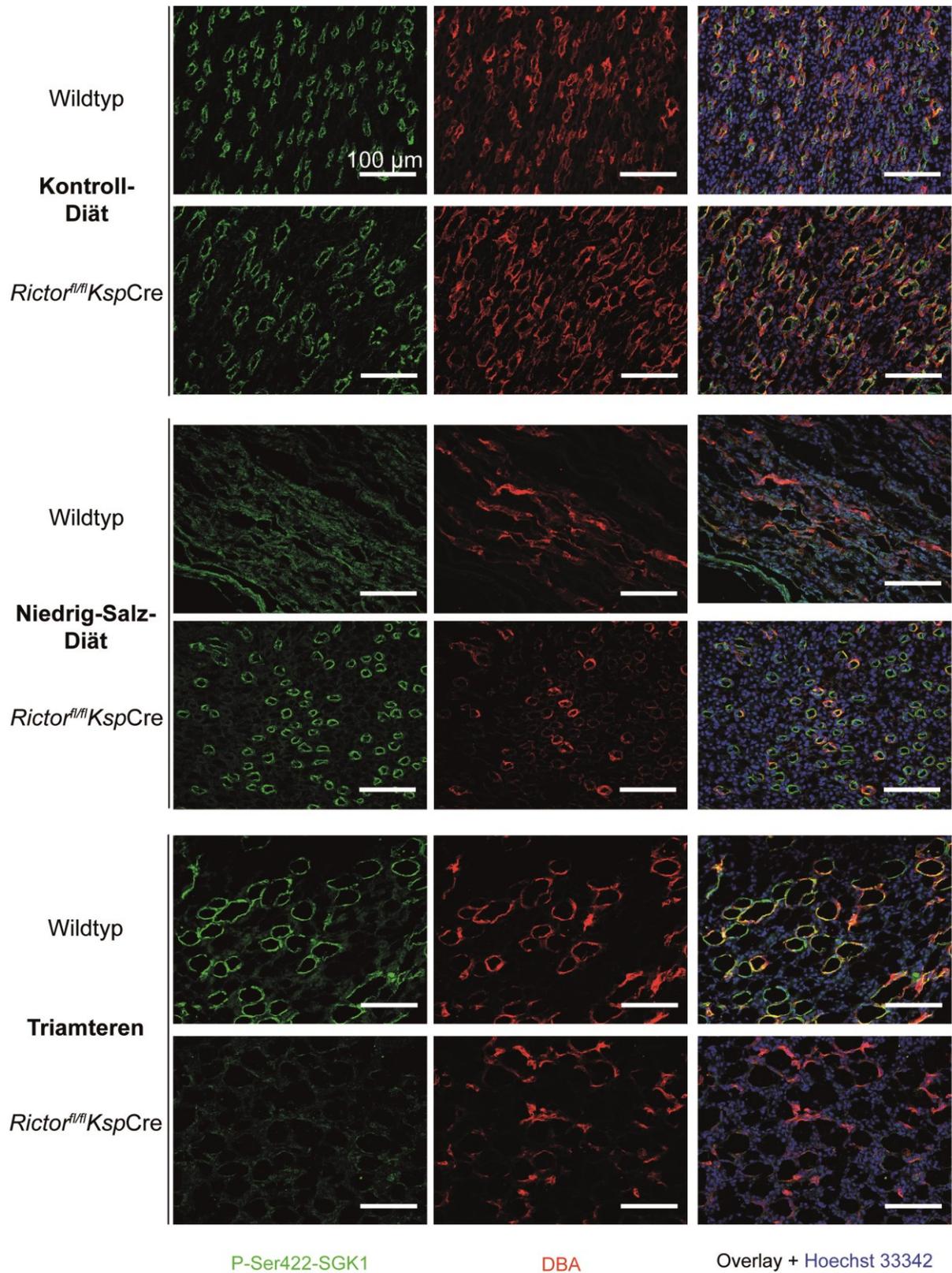


Abbildung 27: Darstellung von P-Ser422-SGK1 in medullären Sammelrohren in den unterschiedlichen Gruppen. Dabei zeigen sich die Signalintensitäten von P-Ser422-SGK1 (grün) der Kontroll- und Niedrig-Salz-Diät-Gruppe sowohl beim Wildtyp als auch beim *knockout* gleich. In der mit Triamteren behandelten Gruppe findet sich bei den *Ric^{fl/fl} KspCre*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp kaum noch ein Signal (Sammelrohre liefern anhand des Komarkers DBA ein rotes Signal, Zellkerne durch Hoechst 33342 ein blaues).

Wider Erwarten fanden sich auch in den *Ric^{fl/fl}KspCre*-Geweben deutliche P-Ser473-Akt Signale (Abb. 26). Es ließ sich in den unterschiedlichen Gruppen keine Differenz in den Signalintensitäten feststellen.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei den Färbungen gegen P-Ser422-SGK1 (Abb. 27) in den Kontroll- und Niedrig-Salz-Diät-Gruppen ab: Es traten keine Unterschiede auf. In der Triamteren-Gruppe hingegen fand sich kaum noch eine SGK1-Aktivierung in den Sammelrohrzellen des *knockout*. In starkem Kontrast dazu die Epithelzellen des Wildtyps, in dem das deutliche Signal eine normal stattfindende Phosphorylierung anzeigte und sich vom Bild wie die beiden anderen Gruppen darstellte.

3.3.1.2.2. Untersuchung der *targets* von mTORC2 sowie von ENaC im Western-Blot

Die Quantifikation der *downstream targets* von mTORC2 im Western-Blot war nur für total-AKT beziehungsweise für P-Ser473-Akt möglich, da für total-SGK1 und P-Ser422-SGK1 im Western-Blot keine zuverlässigen Antikörper zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde noch α ENaC untersucht, der durch Aldosteron reguliert wird (Masilamani *et al.* 1999).

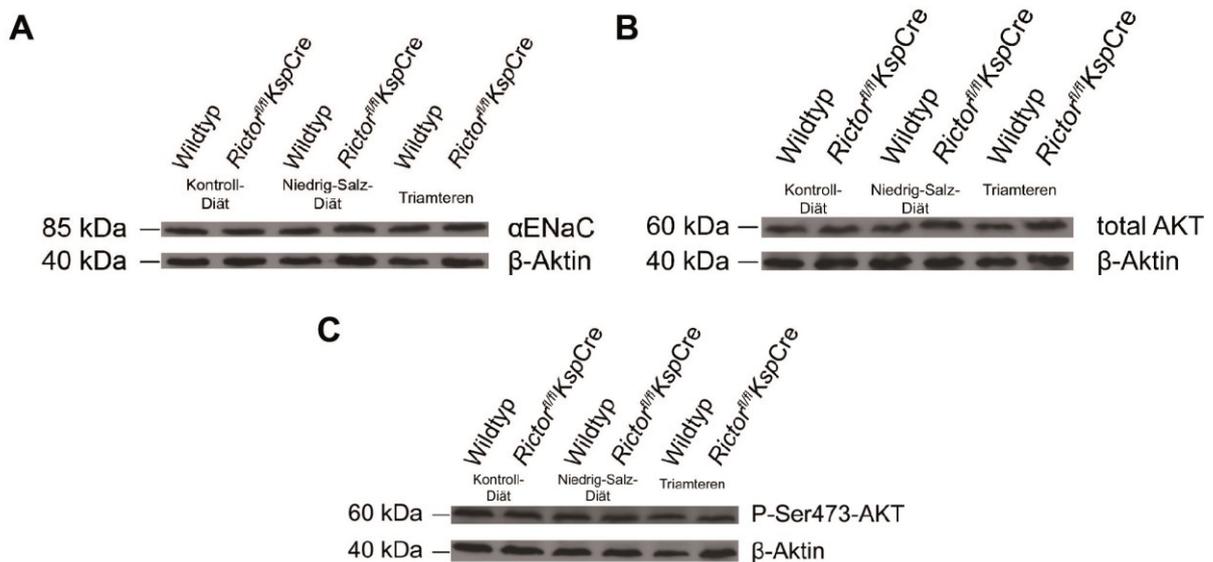


Abbildung 28: Western-Blots von α ENaC, total-AKT und P-Ser473-AKT. (A) Banden gleicher Intensität in der Darstellung von α ENaC. (B) Banden gleicher Intensität in der Darstellung von total-AKT. (C) Banden gleicher Intensität in der Darstellung von P-Ser473-AKT.

Die Intensitäten der Banden aus den unterschiedlichen Western-Blots wurden nun mit der Software LabImage1D zur besseren Vergleichbarkeit ausgewertet.

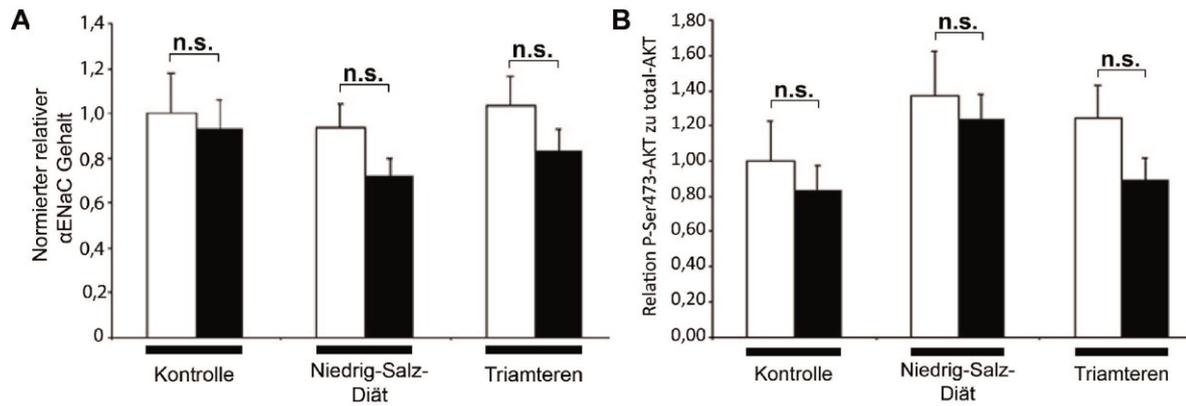


Abbildung 29: (A) Diagramm zur Darstellung des α ENaC-Gehaltes in den Lysaten, normiert auf den Wildtyp unter Kontrolldiät. (B) Anzeige des Verhältnisses von P-Ser473-Akt zu total-AKT (Wildtyp weiß, *Ric^{fl/fl}KspCre* schwarz dargestellt). n=4 in allen Gruppen.

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, bestätigte sich der Eindruck der gleichen Bandenintensitäten. Der Gehalt an α ENaC scheint zwar in allen Gruppen im mTORC2-*knockout* vermindert, jedoch ist der Unterschied statistisch nicht signifikant. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei der Phosphorylierung von P-Ser473-Akt durch mTORC2 ab. Zwar scheint die Relation beim *knockout* ebenfalls abzunehmen und so eine verminderte Phosphorylierung anzuzeigen, der Unterschied zum Wildtyp ist allerdings stets nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1. Die *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mauslinie

Der mTOR Komplex 1 als eine zentrale Schnittstelle des Energie- sowie Nährstoff- und Proteinstoffwechsels spielt in der Zelle eine herausragende Rolle. Trotz dieser wichtigen allgemeinen zellbiologischen Funktion, ist seine exakte physiologische und pathophysiologische Relevanz im Tubulusepithel der Niere kaum untersucht und weitgehend unbekannt.

Die beobachtbaren Effekte einer mTORC1-Inhibition reichten von Phosphaturie und Glukosurie sowie einem Verlust von Aminosäuren über den Urin (Kempe *et al.* 2010) über eine Hypokaliämie bei gesteigerter renaler Kaliumausscheidung und Hypophosphatämie (Morales *et al.* 2003) (Morales *et al.* 2002). Außerdem konnte eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate und ein erhöhter renaler Plasmafluss bei erhöhtem Plasma-Aldosteron, gesteigertem Urinvolumen und erhöhter Natriumexkretion beobachtet werden (Golbaekdal *et al.* 1994).

Um einen gewebespezifischen Ansatz zur Validierung der mTORC1-Funktion zu haben, kam statt einer pharmakologischen Inhibition des Komplexes die *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mauslinie als genetisches Modell zum Einsatz.

Beim Nachweis des *knockouts* im Western-Blot (Abb. 12A) fiel zunächst die im *knockout* immer noch schwach vorhandene RAPTOR Bande auf. Diese lässt sich durch Zellen, die vom *KspCre*-Promoter nicht erfasst werden, wie zum Beispiel Fibroblasten oder Endothelzellen, erklären. Insgesamt ist der Nachweis trotz diesem Restsignal als adäquat anzusehen.

Dieser Eindruck bestätigte sich in der Immunfluoreszenz (Abb. 12C), wo sich ebenfalls nur noch vereinzelte Signale gegen P-S6P finden ließen, obwohl eine alternative, kompensatorische Aktivierung über die p90RSK, als Bestandteil des ERK-1/2 Signalweges, ebenfalls denkbar gewesen wäre (Roux, Blenis 2004).

Die Bilder 12F und 12G erzeugen durch die beobachtbare interstitielle Bindegewebsvermehrung, die verdickte Basalmembran und die sich ablösenden Epithelzellen in den Tubuluslumina den Eindruck eines Gewebes im fibrotischen Umbau. Dieser Eindruck bestätigt sich in der Immunfluoreszenzfärbung gegen Desmin (Abb. 12J und 12K). Desmin wird in aktivierten, bei fibrotischen Prozessen vermehrt auftretenden Myofibroblasten exprimiert (Barnes, Gorin 2011). In Kombination mit den in der TEM rarifiziert und fragmentiert erscheinenden (Abb. 12O, P, Q) Mitochondrien könnte dies auf eine durch *reactive oxygen species* (ROS) hervorgerufene Fibrose hinweisen. Mitochondrien produzieren

kontinuierlich hochreaktive Superoxid- Anionen, die in der Lage sind, Proteine, Fette und DNA zu schädigen. Sollten Proteine der Elektronentransportkette geschädigt sein, würde sich die Situation durch gesteigerte ROS-Bildung noch weiter verschlechtern (Balaban *et al.* 2005) (Youle, van der Blik 2012). Die ROS können einerseits als Signalmoleküle über Stress-induzierbare Signalkaskaden direkt den fibrotischen Umbau induzieren, ihnen wird andererseits aber auch die Fähigkeit zugesprochen, an Fibroblasten direkt zu wirken und dort an der Transformation zum Myofibroblasten beteiligt zu sein. Der für die Umwandlung eines Fibroblasten zum Myofibroblasten wesentliche Auslöser ist der *transforming growth factor-1 β* (TGF-1 β) (Barnes, Gorin 2011), der jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Cunningham *et al.* (Cunningham *et al.* 2007) konnten zeigen, dass mTORC1 über PGC1- α die mitochondriale Funktion positiv reguliert und dass eine verringerte Aktivität des Komplexes eine deutliche Reduktion der Expression von mitochondrialen Genen zur Folge hat. Dies könnte eine mögliche Ursache für die veränderten Mitochondrien der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mäuse sein. Wie in Abb. 16 dargestellt, ist die Expression von PGC1- α in den *knockouts* erwartungsgemäß vermindert. Dieser Befund deckt sich mit den Erkenntnissen von Bentzinger *et al.* (Bentzinger *et al.* 2008), die *Raptor* im Skelettmuskel ausschalteten. Sie fanden in den untersuchten Muskeln Hinweise auf ständig ablaufende De- und Regenerationsprozesse. Auch in den hier gemachten Beobachtungen (Abb. 12G) zeigen sich in der PAS-Färbung beim *knockout* ablösende Tubulusepithelzellen bei einem sonst intakten Epithel. Außerdem konnte die Gruppe um Bentzinger *et al.* im skelettmuskelspezifischen *knockout* fibrosespezifische Marker nachweisen und die oxidative Aktivität der Zellen war eingeschränkt. Die Mitochondrien der skelettmuskelspezifischen *Raptor-knockout*-Tiere waren rarifiziert und erschienen geschwollen und formverändert. Diese Befunde traten hier in TEM-Aufnahmen von Epithelzellen der TAL (Abb. 12O) ebenfalls auf und würden die Vermutung, dass die oxidative Aktivität der Zellen analog verändert sein könnte, untermauern.

Sollten die oxidativen Eigenschaften der Tubulusepithelzellen tatsächlich verändert sein, könnte dies, durch eine verringerte Menge an verfügbaren Energieträgern, zu einer Einschränkung der Proteinbiosynthese führen. Die im Western-Blot verminderte Expression der untersuchten Kanalproteine (Abb. 16) wäre möglicherweise eine direkte Konsequenz.

Da die Dichte an Mitochondrien in der TAL am höchsten ist (Lüllmann-Rauch 2006), wären diese Zellen von einer Einschränkung des oxidativen Stoffwechsels auch stärker betroffen als beispielsweise die Zellen des Sammelrohres. Dies würde die in Abb. 16C gegenüber dem Wildtyp unveränderte Bande von α ENaC im Western-Blot unterstreichen. Eine andere

Möglichkeit wäre die direkte, differenzielle Regulation dieser Kanalproteine durch mTORC1 in der TAL, dem DCT und dem CD.

Der Effekt einer verringerten Menge an NKCC2 und NCC käme einer kombinierten diuretischen Behandlung mit Furosemid und Thiaziden sehr nahe. Der im *knockout* beobachtete, erhöhte Urinfluss wäre die logische Konsequenz. Unpublizierte Ergebnisse von PD Dr. Ferruh Artunc (Universitätsklinikum Tübingen) zeigen, dass eine diuretische Therapie der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mäuse mit Furosemid und Thiaziden kaum eine Auswirkung hat, wohingegen sie bei den Wildtypen zu einer Erhöhung des Urinflusses auf das Niveau der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Tiere führt. Die normale Expression von Aquaporin 2 in *knockout* (Abb. 17) kombiniert mit unpublizierten Daten von PD Dr. Ferruh Artunc, der in diesen Mäusen keine veränderten ADH-Spiegel sowie eine partiell erhaltene Konzentrierung des Urins bei Wasserentzug zeigen konnte, schließen einen renalen Diabetes insipidus als alternative, mögliche Ursache des erhöhten Urinflusses aus.

Der erhöhte Urinfluss ist wahrscheinlich die Ursache für den erweiterten Ureter (Abb. 14). Sung *et al.* (Sung, Lin 2011) konnten bei einem Patienten mit angeborenem Diabetes insipidus und Urinmengen von 12 bis 15l/Tag bilaterale Megaureter und eine ausgeprägte Hydronephrose mit entsprechenden Veränderungen der intrarenalen Geometrie beobachten. Bei den *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mäusen lässt sich eine Zunahme des Markes feststellen, wobei die Dicke des Kortex unverändert (Abb. 15) ist. Möglicherweise stellt dies den Versuch einer Kompensation dar: Durch die verringerte Transportkapazität in der TAL und dem DCT kommt es zu einer Hyperplasie der medullär gelegenen Tubulusabschnitte mit dem Ziel, die aufgrund der verringerten Expression des NKCC2 und NCC gesteigerte Diurese einzudämmen.

4.2. Die *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mauslinie

Die bereits angesprochenen Ergebnisse von Lieberthal *et al.* (vgl. Seite 45) bescheinigen Sirolimus als mTORC1-Inhibitor gravierende Effekte bei der Schwere des Schadens durch Ischämie/Reperfusion. Klinische Studien an Nierentransplantierten konnten diese Effekte auch beim Menschen zeigen. So stellten McTaggart *et al.* (McTaggart *et al.* 2003) eine hohe Assoziation zwischen einer verzögerten Organfunktion (= *delayed graft function*, DGF) und der Verwendung von Sirolimus her. Sie postulierten eine verzögerte Heilung einer geschädigten Niere durch Rapamycin und stellten die Hypothese auf, dass die Zeitdauer der DGF nicht die Schwere der Schädigung anzeigt, sondern die Geschwindigkeit der Erholung von der Schädigung, welche durch den mTORC1-Inhibitor reduziert wird. Diese Befunde

wurden von Smith *et al.* (Smith *et al.* 2003) bestätigt, der zusätzlich ein steigendes Risiko für DGF bei erhöhter Dosis feststellen konnte. Bei den Patienten, die zusätzlich zu Cyclosporin A noch Sirolimus erhielten und eine DGF hatten, fielen in der Biopsie intratubuläre, wahrscheinlich Epithelzellen enthaltende Zylinder auf. Die Gruppe um Fuller *et al.* (Fuller *et al.* 2003) beobachtete an Ratten ebenfalls, dass Sirolimus die Fähigkeit zur Regeneration einer I/R-geschädigten Niere einschränkt. Sie stellten an behandelten Tieren einen im Vergleich erhöhten Schaden fest und attribuierten dies den anti-proliferativen Effekten des Medikaments.

Der Ansatz dieser Arbeit war kein pharmakologischer, sondern die Verwendung einer induzierbaren, gewebespezifischen *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mauslinie. Der genetische Ansatz würde nicht vor die Probleme der Pharmakokinetik gestellt werden und so eine objektivere Aussage ermöglichen. Es war das Ziel herauszufinden, ob ein Fehlen von mTORC1 in den Tubulusepithelzellen die bei I/R entstehenden Schäden vergrößert oder die Schädigung aufgrund einer verlangsamt stattfindenden Regeneration gravierender ist. Des Weiteren sollte eruiert werden, ob diese Beobachtungen auf einem zellintrinsic Effekt beruhen oder andere Faktoren, wie beispielsweise die Abräumung von Zellresten durch Zellen des Immunsystems, einen Einflussfaktor darstellen. Hierzu wurde in dieser Arbeit ein neuer, sehr objektiver Ansatz verwendet.

Da der Prozess der Apoptose wesentlich über das Ausmaß der Nierenschädigung entscheidet (Havasi, Borkan 2011), sollte eine Quantifizierung des Enzyms *activated-Caspase3* erfolgen. Die Proliferationsrate, bestimmt durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen *Ki-67*, sollte zur Beurteilung der Regenerationsprozesse herangezogen werden. Die Objektivität wurde dadurch erreicht, dass pro Tier jeweils 3 komplette Nierenschnitte computerbasiert ausgewertet und dann gemittelt wurden. So wurden Effekte wie beispielweise eine schlechtere Reperfusion aufgrund von bestehenden Thrombi ausgeglichen.

Einen ersten Hinweis auf eine höhere Schädigung nach erfolgter I/R-Behandlung lieferte die Untersuchung des Markers für ischämische und nephrotoxische Verletzungen NGAL, anhand von Western-Blot, im Urin der Mäuse (Abb. 21). Hier zeigten deutlich intensivere Banden im *knockout* ein höheres Schadensausmaß an als im Wildtyp.

Eine Überprüfung dieser Ergebnisse in der PAS-Färbung bestätigte den Befund: Das einen Tag nach I/R entstandene Bild im *knockout* (Abb. 22) zeigte einen deutlich größeren Schaden. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von Lieberthal *et al.* (Lieberthal *et al.* 2006), der zwei Tage nach Schädigung ein vergleichbares Schadensausmaß zwischen Wildtyp und *knockout* feststellte. Dies ist möglicherweise in den unterschiedlichen Zeitpunkten oder der höheren

Dauer der Ischämie (30 Minuten in dieser Arbeit vs. 40 Minuten bei Lieberthal *et al.*) begründet. Die in dieser Gruppe gemachten histologischen Befunde der verzögert ablaufenden Regeneration stimmen mit den hier gemachten Befunden in den *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mäusen überein.

Die Untersuchung und Auswertung der weiter oben genannten Parameter in der Immunfluoreszenz bestätigte die in der Literatur beschriebenen Befunde: Die Apoptoserate im *knockout* ist einen Tag nach erfolgter Schädigung höher als im Wildtyp (Abb. 23A, C). Die Befunde zur Regeneration zeigen zwei Tage nach erfolgtem Eingriff eine hohe Proliferationsrate im Wildtyp, die einen Tage später aber schon zurückgeht. Dieser Befund deckt sich ebenfalls mit dem von Lieberthal *et al.* (Lieberthal *et al.* 2006) gemachten, der die höchste Regeneration zum gleichen Zeitpunkt beobachten konnte. In den *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Tieren hingegen ist die Proliferationsrate zu den untersuchten Zeitpunkten stets niedriger als im Wildtyp und gelangt, anders als in der anderen Arbeit, nie auf das Niveau des Wildtypen. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Ausschaltung von mTORC1 begründet, sodass keine, wie dort beschrieben, Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber Rapamycin auftreten kann.

Zusammenfassend zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse also, dass das Ausmaß der Schädigung durch I/R in der *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre*-Mauslinie zunächst durch eine gesteigerte Apoptose vergrößert wird und die sich anschließende Regeneration deutlich verlangsamt stattfindet. Die Ursache hierfür liegt sicherlich in der essentiellen Funktion von mTORC1 für die über Wachstumsfaktoren vermittelten, anti-apoptischen und proliferativen Effekte (Lieberthal *et al.* 2001).

Die in der TEM-gemachten Befunde der Myelinosomen im *knockout* (Abb. 20H) könnten auf eine, im Zusammenhang mit dem Fehlen des mTOR-1-Komplexes stehende, gestörte Autophagozytose hinweisen. Zur Evaluation der ebenfalls beobachteten Verringerung von Endozytosevesikeln, wären weiterführende Endozytose-Essays angezeigt. Das Fehlen des in der *Rap^{fl/fl}KspCre*-Mauslinie festgestellten mitochondrialen Phänotypes könnte auf eine Induktion des Cre-Systems nach abgeschlossener Entwicklung zurückzuführen sein oder die Wahl der Zeitspanne bis zur Untersuchung der Tiere war möglicherweise zu kurz. Das Auftreten von signifikant erhöhten Harnstoffwerten nach Induktion des *Raptor-knockout* könnte möglicherweise ein frühes Zeichen für eine gestörte Gegenstrommultiplikation sein. Diese können die Tiere jedoch kompensieren und es kommt nicht zu einer Polyurie (unpublizierte Daten Dr. F. Grahmmer, Universitätsklinik Freiburg). Unter Umständen lässt sich dies durch eine Regulation des NKCC2 in der TAL direkt durch mTORC1 oder eine

zwischen geschaltete Kinase erklären. Hier könnte eine Untersuchung der Transportraten des Kanals in heterologen Expressionssystemen (z.B. *X. laevis* Oozyten) helfen, den Sachverhalt zu klären.

4.3. Die *Ric^{fl/fl}KspCre*-Mauslinie

Bei der initialen Aufarbeitung dieser Mauslinie ließen sich zunächst keine funktionellen und morphologischen Auffälligkeiten feststellen. Die Histologie der Niere war im Vergleich zu den Wildtypen nicht verändert (Abb. 24), es war keine Fibrose feststellbar, es war weder eine erhöhte noch erniedrigte Zellproliferationsrate erkennbar und auch sonst traten keine Auffälligkeiten auf. Eine Skelettmuskel-spezifische Deletion von *Rictor* hatte ein ähnliches Ergebnis – auch hier waren keine Unterschiede zum Wildtyp feststellbar (Bentzinger *et al.* 2008). Um die Rolle von mTORC2 hinsichtlich der Salzausscheidung besser zu charakterisieren, erfolgten Belastungstests des distalen Tubulus. Eine Niedrig-Salz-Diät sollte die Fähigkeit zur Na^+ -Resorption überprüfen und die Behandlung mit dem ENaC-Blocker Triamteren die Fähigkeit den Na^+ -Verlust zu kompensieren. Dabei wurden Veränderungen des Körpergewichts der Mäuse als Allgemeinzustandsparameter eingesetzt.

In den unterschiedlichen Gruppen sollte AKT/Proteinkinase B, welches von mTORC2 an Ser473 phosphoryliert wird (Sarbasov *et al.* 2005), als Aktivitätsmarker untersucht werden. Des Weiteren sollte die für die Salzhomöostase essentielle Serum – und Glukokortikoidinduzierbare Kinase 1 (SGK1) betrachtet werden. Diese wird ebenfalls von mTORC2 kontrolliert: Für die volle Aktivität ist zunächst eine Phosphorylierung an Ser422 durch mTORC2 nötig. Dieser Schritt ermöglicht in der Folge die Assoziation mit PDK1 (3-phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1), durch die eine Phosphorylierung von SGK1 an T256 erfolgen kann, was zur vollen Aktivität der Kinase führt (Lu *et al.* 2010). Der für die Na^+ -Aufnahme verantwortliche αENaC wurde im Western-Blot beurteilt.

Wie aus Abb. 25 ersichtlich, ließ sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Niedrig-Salz-Diät-Gruppe hinsichtlich des Gewichtsverlaufs kein Unterschied zwischen dem *knockout* und den Wildtypen feststellen. Drastischer fiel der Unterschied in der Triamteren-Gruppe aus: Hier verloren die *Ric^{fl/fl}KspCre*-Mäuse massiv an Gewicht wohingegen sich das Gewicht des Wildtypen auf dem Gewichtsniveau der anderen Gruppen bewegte. Zusätzlich hatte sich der Allgemeinzustand dieser Mäuse merklich verschlechtert. Dieser Phänotyp ähnelt stark dem der von Wulff *et al.* (Wulff *et al.* 2002) beschriebenen SGK1-*knockout*-Maus unter einer Natrium-freien Diät. Diese Mäuse waren unter einer normalen Diät bis auf leicht erhöhte Aldosteron-Level und erhöhte K^+ -Serumspiegel unauffällig, zeigten aber unter einer Stress-

Diät ebenfalls einen Gewichtsverlust und verschlechterten sich im Allgemeinzustand. Die Autoren folgerten, dass die gesteigerte Aldosteron-Sekretion in Kombination mit kompensatorischen, möglicherweise die SGK2/3 involvierenden, Signalwegen unter Normbedingungen in der Lage sei, die Natrium-Homöostase aufrecht zu erhalten. Unter Stressbedingungen würde jedoch die Unfähigkeit des distalen Tubulus zur Natrium-Regulation demaskiert.

Die in Abb. 26 gemachte Feststellung, dass in allen Gruppen ein deutliches P-Ser473-Akt Signal zu detektieren war, zeigt an, dass die Phosphorylierung an dieser Stelle nicht allein durch den mTORC2-Komplex vermittelt sein kann. Dieser Befund bestätigte sich im Western-Blot, wo ein annähernd gleiches Verhältnis von P-Ser473-AKT zu total-AKT (Abb. 28B/C und 29B) ebenfalls keine eingeschränkte Phosphorylierung anzeigte. Einen möglichen, alternativen Aktivierungsweg in der Niere stellt die Kinase LRRK2 dar (Herzig *et al.* 2011).

Die in Abb. 27 gemachte Erkenntnis, dass die eigentlich durch mTORC2 vermittelte Phosphorylierung der SGK1 an Ser422 in den *knockouts* der Normal- und Niedrig-Salz-Diät-Gruppe trotzdem stattfindet, ist überraschend. Sie zeigt auf, dass unter diesen Bedingungen noch andere Wege der SGK1-Aktivierung existieren müssen und könnte auch erklären, wieso es trotz Stressbedingungen nicht zu Funktionseinschränkungen dieser Tiere kommt. Durch die aus bisher nicht bekannten Gründen nicht stattfindende Phosphorylierung an Ser422 im *knockout* unter Triamteren, kann die SGK1 nicht ihre volle Aktivität entfalten und der resultierende Phänotyp ähnelt, möglicherweise aus diesem Grund, stark dem des SGK1-*knockouts*.

Die von einem Gewichtsverlust begleitete Verschlechterung des Allgemeinzustandes bei den *Ric^{fl/fl}KspCre*-Mäusen unter Triamteren ließe sich unter Umständen durch die fehlende Kompensationsmöglichkeit des Natriumverlustes erklären: Bedingt durch einen Na⁺-getragenen Volumenverlust könnte es zu einem akuten, prärenalen Nierenversagen kommen. Da durch den blockierten ENaC die Triebkraft zur K⁺-Exkretion fehlen würde, würde der Zustand des ANV durch eine zusätzliche Hyperkaliämie verschlimmert.

Dieser Befund ist von besonderer klinischer Relevanz, da sich im Moment eine neue Klasse von mTORC-Inhibitoren zum Einsatz bei verschiedenen Tumoren in klinischer Erprobung befindet. Diese Medikamente würden sowohl mTORC1 als auch mTORC2 inhibieren (Khokhar *et al.* 2011). Käme es zu einer Kombination dieser neuen therapeutischen Möglichkeit mit kaliumsparenden, den ENaC betreffenden Diuretika, wären die Folgen für den Patienten möglicherweise gravierend. Da die AWMF-Richtlinien den Einsatz dieser Diuretika unter anderem bei Herzinsuffizienz (NYHA III-IV), Leberzirrhose und arterieller

Hypertonie empfehlen, erscheint die Möglichkeit einer inzidenten Kombination als durchaus realistisch.

5. Zusammenfassung

Die hier durchgeführte Arbeit diente dem Ziel, die mTOR-Komplexe im Tubulussystem der Niere zu untersuchen. Dabei standen die Salz – und Wasserhomöostase (mTORC1 und 2) sowie die Rolle des mTORC1 bei ischämischer Schädigung und den nachfolgenden Regenerationsprozessen im Fokus. Zu diesem Zweck wurden in Form der *Rap^{fl/fl}KspCre*-, *RapPax8rtTATetOCre*- und *Ric^{fl/fl}KspCre*-Mauslinien generiert, die eine tubulusspezifische Deletion von mTORC1 respektive mTORC2 aufwiesen. Anhand von physiologischen Messungen, Western-Blots und Immunfluoreszenzfärbungen fand eine Untersuchung der Mäuse im Hinblick auf die postulierten Fragen statt.

Die gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass der mTORC1 seine Funktion für die Wasser- und Salzregulation im Tubulussystem über eine Modulation der mitochondrialen Funktion anhand seines *downstream targets* PGC1- α ausübt. Ein Fehlen des Komplexes führt zu formveränderten Mitochondrien, fibrotischen Umbauprozessen, einer veränderten intrarenalen Geometrie sowie einer verminderten Expression der für die Wasserhomöostase essentiellen Ionenporter und damit schließlich zu einem erhöhten Wasserverlust.

Drastische Allgemeinzustandsveränderungen und ein massiver Gewichtsverlust der Mäuse unter Blockade des ENaC illustrieren die kritische Rolle des mTORC2 in der distalen Salzregulation. Als Ziel unterschiedlichster Regulationskaskaden scheint er seine Wirkung vornehmlich über die Aktivierung der SGK1 auszuüben, die einen der zentralen Spieler der ENaC-Regulation darstellt. Dies ist von besonderer klinischer Relevanz für zukünftige onkologische Patienten, die möglicherweise einer gleichzeitigen Inhibition des mTORC2 und des ENaC ausgesetzt sind.

Die an den *Rap^{fl/fl}Pax8rtTATetOCre* durchgeführten I/R-Versuche bestätigten die bereits vermutete, tragende Rolle von mTORC1 sowohl beim Zustandekommen des Schadens als auch der nachfolgenden Regeneration. Ein objektiver, computerbasierter Ansatz konnte zeigen, dass ein Fehlen des mTORC1 zur Vergrößerung des Schadens durch eine gesteigerte Apoptoserate führt und dass die nachfolgende Regeneration durch verminderte Proliferationsfähigkeit des überlebenden Gewebes stark eingeschränkt ist. Da mTORC-Inhibitoren inzwischen bei zahlreichen neoplastischen Erkrankungen Bestandteil des therapeutischen Regimes sind und es dort häufig zu einem akuten Nierenversagen kommen kann, untermauern diese Ergebnisse die Notwendigkeit zur größten Vorsicht bei der Gabe dieser Medikamente.

6. Literaturverzeichnis

Arroyo J. P., Ronzaud C., Lagnaz D., Staub O., Gamba G. (2011) *Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron*, *Physiology (Bethesda)* 26: 115-23

Bachmann S., Bostanjoglo M., Schmitt R., Ellison D. H. (1999) *Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects*, *Anat Embryol (Berl)* 200: 447-68

Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. (2005) *Mitochondria, oxidants, and aging*, *Cell* 120: 483-95

Barnes J. L., Gorin Y. (2011) *Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases*, *Kidney Int* 79: 944-56

Bartter F. C., Pronove P., Gill J. R., Jr., Maccardle R. C. (1962) *Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome*, *Am J Med* 33: 811-28

Bentzinger C. F., Romanino K., Cloetta D., Lin S., Mascarenhas J. B., Oliveri F., Xia J., Casanova E., Costa C. F., Brink M., Zorzato F., Hall M. N., Ruegg M. A. (2008) *Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy*, *Cell Metab* 8: 411-24

Biber J., Hernando N., Forster I., Murer H. (2009) *Regulation of phosphate transport in proximal tubules*, *Pflugers Arch* 458: 39-52

Boehlke C., Kotsis F., Patel V., Braeg S., Voelker H., Brecht S., Beyer T., Janusch H., Hamann C., Godel M., Muller K., Herbst M., Hornung M., Doerken M., Kottgen M., Nitschke R., Igarashi P., Walz G., Kuehn E. W. (2010) *Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1*, *Nat Cell Biol* 12: 1115-22

Bonegio R., Lieberthal W. (2002) *Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure*, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 301-8

- Bonventre J. V. (2003) *Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure*, J Am Soc Nephrol 14 Suppl 1: S55-61
- Bonventre J. V., Yang L. (2011) *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*, J Clin Invest 121: 4210-21
- Bostanjoglo M., Reeves W. B., Reilly R. F., Velazquez H., Robertson N., Litwack G., Morsing P., Dorup J., Bachmann S., Ellison D. H. (1998) *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules*, J Am Soc Nephrol 9: 1347-58
- Cunningham J. T., Rodgers J. T., Arlow D. H., Vazquez F., Mootha V. K., Puigserver P. (2007) *mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex*, Nature 450: 736-40
- Dagher P. C. (2000) *Modeling ischemia in vitro: selective depletion of adenine and guanine nucleotide pools*, Am J Physiol Cell Physiol 279: C1270-7
- Dimke H. (2011) *Exploring the intricate regulatory network controlling the thiazide-sensitive NaCl cotransporter (NCC)*, Pflugers Arch 462: 767-77
- Dimke H., Hoenderop J. G., Bindels R. J. (2010) *Hereditary tubular transport disorders: implications for renal handling of Ca²⁺ and Mg²⁺*, Clin Sci (Lond) 118: 1-18
- Eltzschig H. K., Eckle T. (2011) *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*, Nat Med 17: 1391-401
- Eremina V., Jefferson J. A., Kowalewska J., Hochster H., Haas M., Weisstuch J., Richardson C., Kopp J. B., Kabir M. G., Backx P. H., Gerber H. P., Ferrara N., Barisoni L., Alpers C. E., Quaggin S. E. (2008) *VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy*, N Engl J Med 358: 1129-36

- Fuller T. F., Freise C. E., Serkova N., Niemann C. U., Olson J. L., Feng S. (2003) *Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury*, *Transplantation* 76: 1594-9
- Garcia-Martinez J. M., Alessi D. R. (2008) *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase I (SGK1)*, *Biochem J* 416: 375-85
- Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. (1983) *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*, *Int J Cancer* 31: 13-20
- Gitelman H. J., Graham J. B., Welt L. G. (1966) *A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia*, *Trans Assoc Am Physicians* 79: 221-35
- Golbaekdal K., Nielsen C. B., Djurhuus J. C., Pedersen E. B. (1994) *Effects of rapamycin on renal hemodynamics, water and sodium excretion, and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide, and vasopressin in pigs*, *Transplantation* 58: 1153-7
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W., Bujard H. (1995) *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*, *Science* 268: 1766-9
- Greger R. (2000) *Physiology of renal sodium transport*, *Am J Med Sci* 319: 51-62
- Guder W. G., Hoffmann G. E., Hubbuch A., Poppe W. A., Siedel J., Price C. P. (1986) *Multicentre evaluation of an enzymatic method for creatinine determination using a sensitive colour reagent*, *J Clin Chem Clin Biochem* 24: 889-902
- Guertin D. A., Stevens D. M., Thoreen C. C., Burds A. A., Kalaany N. Y., Moffat J., Brown M., Fitzgerald K. J., Sabatini D. M. (2006) *Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1*, *Dev Cell* 11: 859-71
- Havasi A., Borkan S. C. (2011) *Apoptosis and acute kidney injury*, *Kidney Int* 80: 29-40

Herzig M. C., Kolly C., Persohn E., Theil D., Schweizer T., Hafner T., Stemmelen C., Troxler T. J., Schmid P., Danner S., Schnell C. R., Mueller M., Kinzel B., Grevot A., Bolognani F., Stirn M., Kuhn R. R., Kaupmann K., van der Putten P. H., Rovelli G., Shimshek D. R. (2011) *LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice*, Hum Mol Genet 20: 4209-23

Huang J., Manning B. D. (2009) *A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes*, Biochem Soc Trans 37: 217-22

Kempe D. S., Dermaku-Sopjani M., Frohlich H., Sopjani M., Umbach A., Puchchakayala G., Capasso A., Weiss F., Stubs M., Foller M., Lang F. (2010) *Rapamycin-induced phosphaturia*, Nephrol Dial Transplant 25: 2938-44

Kennedy S. E., Erlich J. H. (2008) *Murine renal ischaemia-reperfusion injury*, Nephrology (Carlton) 13: 390-6

Khokhar N. Z., Altman J. K., Platanias L. C. (2011) *Emerging roles for mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of solid tumors and hematological malignancies*, Curr Opin Oncol 23: 578-86

Kriz W., Bankir L. (1988) *A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS)*, Kidney Int 33: 1-7

Lambers T. T., Bindels R. J., Hoenderop J. G. (2006) *Coordinated control of renal Ca²⁺ handling*, Kidney Int 69: 650-4

Leviel F., Hubner C. A., Houillier P., Morla L., El Moghrabi S., Brideau G., Hassan H., Parker M. D., Kurth I., Kougioumtzes A., Sinning A., Pech V., Riemondy K. A., Miller R. L., Hummler E., Shull G. E., Aronson P. S., Doucet A., Wall S. M., Chambrey R., Eladari D. (2010) *The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice*, J Clin Invest 120: 1627-35

- Lieberthal W., Fuhro R., Andry C., Patel V., Levine J. S. (2006) *Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance*, Transplantation 82: 17-22
- Lieberthal W., Fuhro R., Andry C. C., Rennke H., Abernathy V. E., Koh J. S., Valeri R., Levine J. S. (2001) *Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells*, Am J Physiol Renal Physiol 281: F693-706
- Lieberthal W., Levine J. S. (2012) *Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway*, Am J Physiol Renal Physiol 303: F1-10
- Loffing J., Korbmayer C. (2009) *Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC)*, Pflügers Arch 458: 111-35
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J Biol Chem 193: 265-75
- Lu M., Wang J., Jones K. T., Ives H. E., Feldman M. E., Yao L. J., Shokat K. M., Ashrafi K., Pearce D. (2010) *mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1*, J Am Soc Nephrol 21: 811-8
- Lüllmann-Rauch R. (2006) *Taschenlehrbuch Histologie*, 2., komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart New York, S. 437-452, S. 596
- Markadieu N., Bindels R. J., Hoenderop J. G. (2011) *The renal connecting tubule: Resolved and unresolved issues in Ca(2+) transport*, Int J Biochem Cell Biol 43: 1-4
- Masilamani S., Kim G. H., Mitchell C., Wade J. B., Knepper M. A. (1999) *Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney*, J Clin Invest 104: R19-23
- McTaggart R. A., Gottlieb D., Brooks J., Bacchetti P., Roberts J. P., Tomlanovich S., Feng S. (2003) *Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation*, Am J Transplant 3: 416-23

- Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J., Devarajan P. (2003) *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*, J Am Soc Nephrol 14: 2534-43
- Morales J. M., Andres A., Dominguez-Gil B., Sierra M. P., Arenas J., Delgado M., Casal M. C., Rodicio L. (2003) *Tubular function in patients with hypokalemia induced by sirolimus after renal transplantation*, Transplant Proc 35: 154S-156S
- Morales J. M., Wramner L., Kreis H., Durand D., Campistol J. M., Andres A., Arenas J., Negre E., Burke J. T., Groth C. G. (2002) *Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients*, Am J Transplant 2: 436-42
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1992) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986*, Biotechnology 24: 17-27
- Oh W. J., Jacinto E. (2011) *mTOR complex 2 signaling and functions*, Cell Cycle 10: 2305-16
- Pearce L. R., Sommer E. M., Sakamoto K., Wullschlegel S., Alessi D. R. (2011) *Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney*, Biochem J 436: 169-79
- Polak P., Cybulski N., Feige J. N., Auwerx J., Ruegg M. A., Hall M. N. (2008) *Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration*, Cell Metab 8: 399-410
- Puigserver P., Spiegelman B. M. (2003) *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator*, Endocr Rev 24: 78-90
- Roux P. P., Blenis J. (2004) *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*, Microbiol Mol Biol Rev 68: 320-44

San-Cristobal P., Dimke H., Hoenderop J. G., Bindels R. J. (2010) *Novel molecular pathways in renal Mg²⁺ transport: a guided tour along the nephron*, Curr Opin Nephrol Hypertens 19: 456-62

Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M., Sabatini D. M. (2005) *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*, Science 307: 1098-101

Sauer B. (1998) *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system*, Methods 14: 381-92

Schaefer L. H., Schuster D., Schaffer J. (2004) *Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach*, J Microsc 216: 165-74

Schmidt R., Lang F., Heckmann M. (2010) *Physiologie des Menschen*, 31. neu bearb. u. aktual. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, S. 630 und 640

Shao X., Somlo S., Igarashi P. (2002) *Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract*, J Am Soc Nephrol 13: 1837-46

Smith K. D., Wrenshall L. E., Nicosia R. F., Pichler R., Marsh C. L., Alpers C. E., Polissar N., Davis C. L. (2003) *Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use*, J Am Soc Nephrol 14: 1037-45

Soundararajan R., Lu M., Pearce D. (2012) *Organization of the ENaC-regulatory machinery*, Crit Rev Biochem Mol Biol 47: 349-59

Sung C. C., Lin S. H. (2011) *Images in clinical medicine. Nonobstructive hydronephrosis with secondary polycythemia*, N Engl J Med 365: e1

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*, Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350-4

Traykova-Brauch M., Schonig K., Greiner O., Miloud T., Jauch A., Bode M., Felsher D. W., Glick A. B., Kwiatkowski D. J., Bujard H., Horst J., von Knebel Doeberitz M., Niggli F. K., Kriz W., Grone H. J., Koesters R. (2008) *An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice*, Nat Med 14: 979-84

Wulff P., Vallon V., Huang D. Y., Volkl H., Yu F., Richter K., Jansen M., Schlunz M., Klingel K., Loffing J., Kauselmann G., Bosl M. R., Lang F., Kuhl D. (2002) *Impaired renal Na(+) retention in the sgkl-knockout mouse*, J Clin Invest 110: 1263-8

Wullschleger S., Loewith R., Hall M. N. (2006) *TOR signaling in growth and metabolism*, Cell 124: 471-84

Youle R. J., van der Bliek A. M. (2012) *Mitochondrial fission, fusion, and stress*, Science 337: 1062-5

Zhu Z., Zheng T., Lee C. G., Homer R. J., Elias J. A. (2002) *Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling*, Semin Cell Dev Biol 13: 121-8

7. Lebenslauf

Die Seite 96 enthält persönliche Daten (Lebenslauf). Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online Veröffentlichung.

8. Danksagung

Die Seiten 97-98 enthalten persönliche Daten (Danksagung). Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Die Seiten 97-98 enthalten persönliche Daten (Danksagung). Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).