

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Charakterisierung des Mausmodells

4.1.1 Verifizieren des THP-Knockout Modells

Alle Versuchstiere wurden genotypisiert und somit als homozygote THP^{-/-} oder Wildtypiere verifiziert. Mit Hilfe von Immunohistochemie, Western blot, RT-PCR und In-situ-Hybridisierung wurde festgestellt, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten THP^{-/-} Mäusen weder THP-mRNS noch THP exprimiert wird. Wildtypiere zeigten dabei das übliche THP-Expressionsmuster (Abb. 9).

4.1.2 Ultrastrukturelle Untersuchung der THP^{-/-} vs. wt Mäuse

Bei der Licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung der THP^{-/-} Nierenschnitte konnten in den Glomeruli und im renalen Tubulussystem keine morphologischen Änderungen detektiert werden. Die TAL-Zellen (Ort der THP-Synthese) wiesen einen morphologisch unveränderten Aufbau auf mit typischen basolateralen Membraninterdigitationen und einem gut entwickelten subapikalen vesikulären Kompartiment (Abb. 10). Bei wt Mäusen ließ sich mit Hilfe der immunelektronenmikroskopie ein positives Signal für THP im subapikalen vesikulären Kompartiment, in der apikalen Membran, in den exozytotischen Vesikeln sowie in geringerem Ausmaß in der basolateralen Membran detektieren. Die THP^{-/-} Mäuse wiesen keine THP-Expression auf. Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Urothels der THP^{-/-} Mäuse lieferte keine Zeichen inflammatorischer Prozesse (Abb. 10).

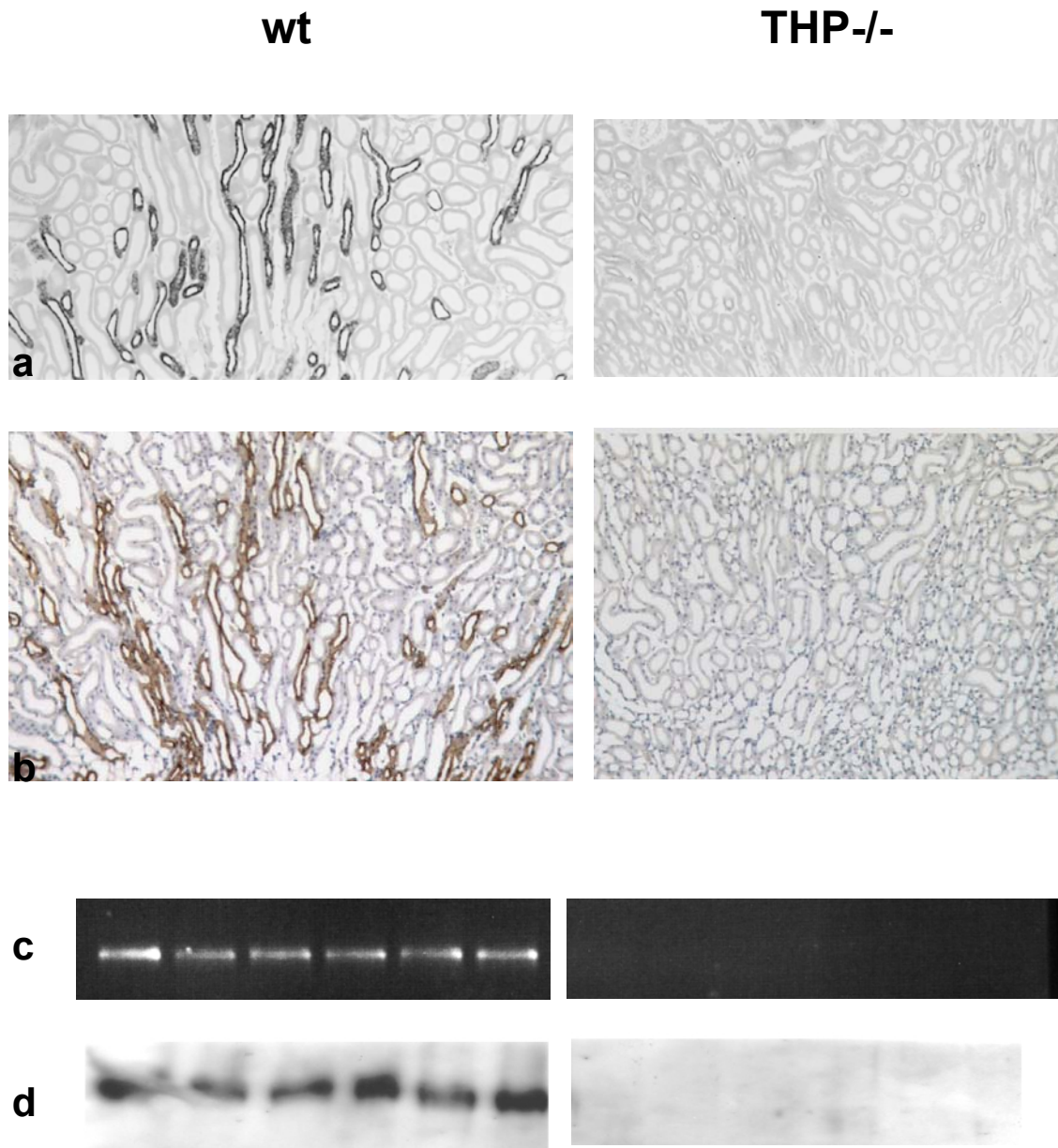


Abbildung 9. Nachweis der kompletten THP-Geninaktivierung im untersuchten Mausmodell. THP^{-/-} Mäuse (rechts) weisen weder ein positives Signal für THP-mRNS (in-situ Hybridisierung – **a** und RT-PCR – **c**), noch für das THP (Immunohistochemie – **b** und Western Blot – **d**) auf. Im Gegensatz dazu zeigten wt Mäuse (links) eine intensive THP-mRNS (**a**, **c**) sowie THP (**b**, **d**) Expression.

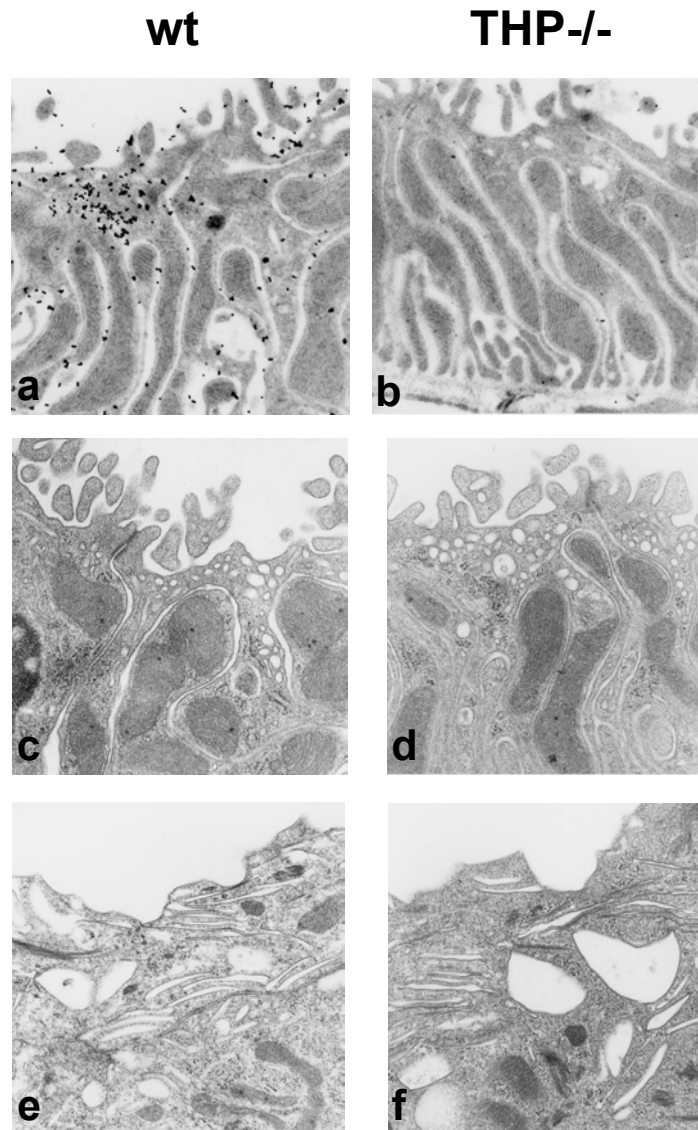


Abbildung 10. Ultrastrukturelle Auswertung der THP-/- vs. wt Mäuse. Bei der intrazellulären Lokalisation von THP mittels Immunelektronenmikroskopie wird THP bei wt Mäusen vorwiegend im apikalen vesikulären Anteil und in den exozytotischen Vesikeln detektiert. Ein schwächeres Signal findet sich in der basolateralen Membran (a). THP-/- Mäuse zeigen kein positives Signal für THP (b). In der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnten weder morphologische Änderungen im TAL (c und d) noch Zeichen der Inflammation im Urothel (e und f) gefunden werden.

4.2 Physiologische Untersuchung der THP-/- vs. wt Mäuse

4.2.1 Kontrollzustand

Es wurden zwei Gruppen von je 8 Mäusen (THP-/- vs. wt) verglichen. Im Kontrollzeitraum hatten die Mäuse Wasser und Futter ad libitum. 24h-Urin wurde während des Aufenthaltes der Tiere in Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Urinmenge, Osmolalität, Natrium, Kalium, Chlor, Kreatinin und Harnsäure des Urins sowie die Trinkmenge wurden bestimmt. Alle Werte (mit Ausnahme der Osmolalität) wurden pro Gramm Körpergewichtes pro 24 Stunden berechnet. Unter Normalbedingungen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den oben aufgelisteten Urinparametern zwischen beiden Gruppen (Tabelle 3.A, Abb. 11).

4.2.2 Durstversuch

Es wurden dieselben zwei Gruppen von je 8 Tieren (THP-/- vs. wt) auf die oben genannten Urinparameter untersucht. Im 24h-Durstversuch zeigten die wt Mäuse eine Reduktion der Urinmenge auf 47,8%. Die osmolare Ausscheidung war bei wt Mäusen auf 68% signifikant reduziert. Drei von acht wt Mäusen schieden keine messbaren Urinmengen aus und wurden daher aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die THP-/- Tiere zeigten ebenfalls eine Verminderung der Urinmenge, aber in geringerem Ausmaß, als die wt Mäuse (72,3% der Kontrollwerte). Sie zeigten keine signifikante Verminderung der osmolaren Ausscheidung. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen traten in den Urinmengen im 24-stündigen Durstversuch auf ($41,3 \mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$ bei THP-/- vs. $27,6 \mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$ bei wt, $p < 0,05$). Die durchschnittlichen Werte der Urinparameter sind in Tabelle 3.A aufgelistet sowie in Abbildung 11 dargestellt. THP-/- Mäuse zeigten im 24h Durstversuch eine geringere Harnkonzentrierungsfähigkeit als wt Mäuse.

4.2.3 Volumenbelastung

Die Versuchstiere wurden zum intensiven Trinken stimuliert, indem den Mäusen anstatt Leitungswasser eine 300 mMol Sucroslösung angeboten wurde. Die Trinkmenge erhöhte sich dabei erwartungsgemäß um das ca. dreifache des

Kontrollzustandes. Der Vergleich der Urinmenge, der osmolaren Ausscheidung, der Natriumausscheidung sowie aller anderen Urinparameter während Volumenbelastung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den wt und THP-/- Gruppen (Tabelle 3.B, Abb. 11).

Tabelle 3. Charakterisierung der physiologischen Nierenfunktion (THP-/- vs. wt): A – Physiologische Urinparameter bei Wasser und Futter ad libitum (**Ad libitum**) vs. Durstversuch bei dem freien Zugang zum Futter (**Durstversuch**); **B** – Urinparameter bei Volumenbelastung; **C** – Creatinin-Clearance und PRA unter Kontrollbedingungen. Es sind durchschnittliche Werte \pm SEMs angegeben. 24h-Sammelzeit für alle Urinparameter.

KG – Körpergewicht, NG – Nierengewicht.

§, $p < 0.05$ innerhalb der Gruppe (Ad libitum vs. Durstversuch).

*, $p < 0.05$ zwischen den Gruppen (wt gegen THP-/-).

A

	wt (n=8)		THP-/- (n=8)	
	Ad libitum	Durstversuch	Ad libitum	Durstversuch
Trinkmenge (Wasser), $\mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	134 \pm 21	–	157 \pm 47	–
Urinmenge, $\mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	57,8 \pm 9,3	27,6 \pm 3,8 §	57,1 \pm 3,8	41,3 \pm 4,8§ *
Urin Osmolalität, mOsmol/kg H ₂ O	2560 \pm 122	3016 \pm 160	2635 \pm 139	2857 \pm 83
Osm. Ausscheidung, $\mu\text{osmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	159 \pm 14	108 \pm 8 §	151 \pm 13	119 \pm 16
Natriumausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	9,3 \pm 0,8	7,1 \pm 0,6	9,1 \pm 1,0	8,9 \pm 1,0
Chloridausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	15,1 \pm 1,2	11,5 \pm 1,6	14,8 \pm 1,8	14,4 \pm 1,9
Kaliumausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	46,9 \pm 3,2	46,8 \pm 7,0	47,3 \pm 4,5	46,1 \pm 6,5
Creatininausscheidung, $\text{nmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	196 \pm 12	124 \pm 16 §	215 \pm 13	179 \pm 18*
Harnsäureausscheidung, $\text{nmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	54 \pm 6	37 \pm 6 §	49 \pm 5	43 \pm 8

B

	wt (n=5)	THP-/- (n=8)
Trinkmenge (Sucroslösung), $\mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	426 \pm 41	353 \pm 106
Urinmenge, $\mu\text{l} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	181 \pm 37	163 \pm 71
Osmolare Ausscheidung, $\mu\text{osmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	108 \pm 9	92 \pm 5
Natriumausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	7.8 \pm 0.3	6.3 \pm 0.7
Chloridausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	8.3 \pm 1.0	5.5 \pm 0.9
Kaliumausscheidung, $\mu\text{mol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	30 \pm 4	32 \pm 10
Creatininausscheidung, $\text{nmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	1.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
Harnsäureausscheidung, $\text{nmol} \cdot \text{g} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$	27 \pm 3	26 \pm 3

C

	wt (n=5)	THP-/- (n=6)
Plasma-Creatinin, $\mu\text{mol/l}$	9,00 \pm 3,18	16,00 \pm 3,15
Urin-Creatinin, $\mu\text{mol}/24\text{h}$	5,48 \pm 0,68	4,27 \pm 0,59
Gesamtes Nierengewicht, mg	348 \pm 9	310 \pm 8
Creatinin-Clearance, $\text{ml} \cdot 24\text{h}^{-1} \cdot \text{mg NG}^{-1}$	2,70 \pm 0,63	1,00 \pm 0,24*
PRA, $\text{ANG I} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	16,2 \pm 3,1	11,8 \pm 3,4

4.2.4 Creatinin-Clearance

Die Creatinin-Werte im 24h-Urin zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den THP-/- und den wt Mäusen, jedoch eine tendenzielle Verminderung in der THP-/- Gruppe. Die Plasma-Creatininwerte der THP-/- Mäuse zeigten tendenziell einen Anstieg im Vergleich zu den wt Tieren, der allerdings statistisch nicht signifikant war. Die Nierengewichte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Berechnung der Creatinin-Clearance pro einem mg Nierengewicht ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die THP-/- Mäuse zeigten einen Abfall der Creatinin-Clearance auf 37 % des gesunden Ausgangswertes (Tabelle 3C).

4.2.5 Reninaktivität im Plasma

Die Bestimmung der Reninaktivität im Plasma (PRA) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den THP-/- und wt Gruppen. Es zeigte sich allerdings der Hinweis einer verminderten PRA bei den THP-/- Mäusen (Tabelle 3C).

4.3 Expression der Ionenporter unter Kontrollbedingungen**4.3.1 RT-PCR**

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die mRNS-Expression von relevanten Ionen-transportproteinen in der Niere von THP-/- (n=6) relativ zu der von wt Mäusen (n=6) unter Kontrollbedingungen charakterisiert. Es konnte eine Steigerung der mRNS-Expression von distalen Ionenportern bei den THP-/- im Vergleich zu den wt Tieren nachgewiesen werden. Das Housekeeping-Gen (GAPDH) sowie proximal-tubuläre Genprodukte (NaPi-IIa und NKAb) zeigten keine Unterschiede der mRNS-Expression zwischen den Gruppen. THP-/- Mäuse

exprimierten keine THP-mRNS, während bei den Kontrolltieren ein intensives Signal für die THP-mRNS detektiert wurde. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in der Tabelle 4 sowie in Abbildungen 12 und 13 zusammengefaßt.

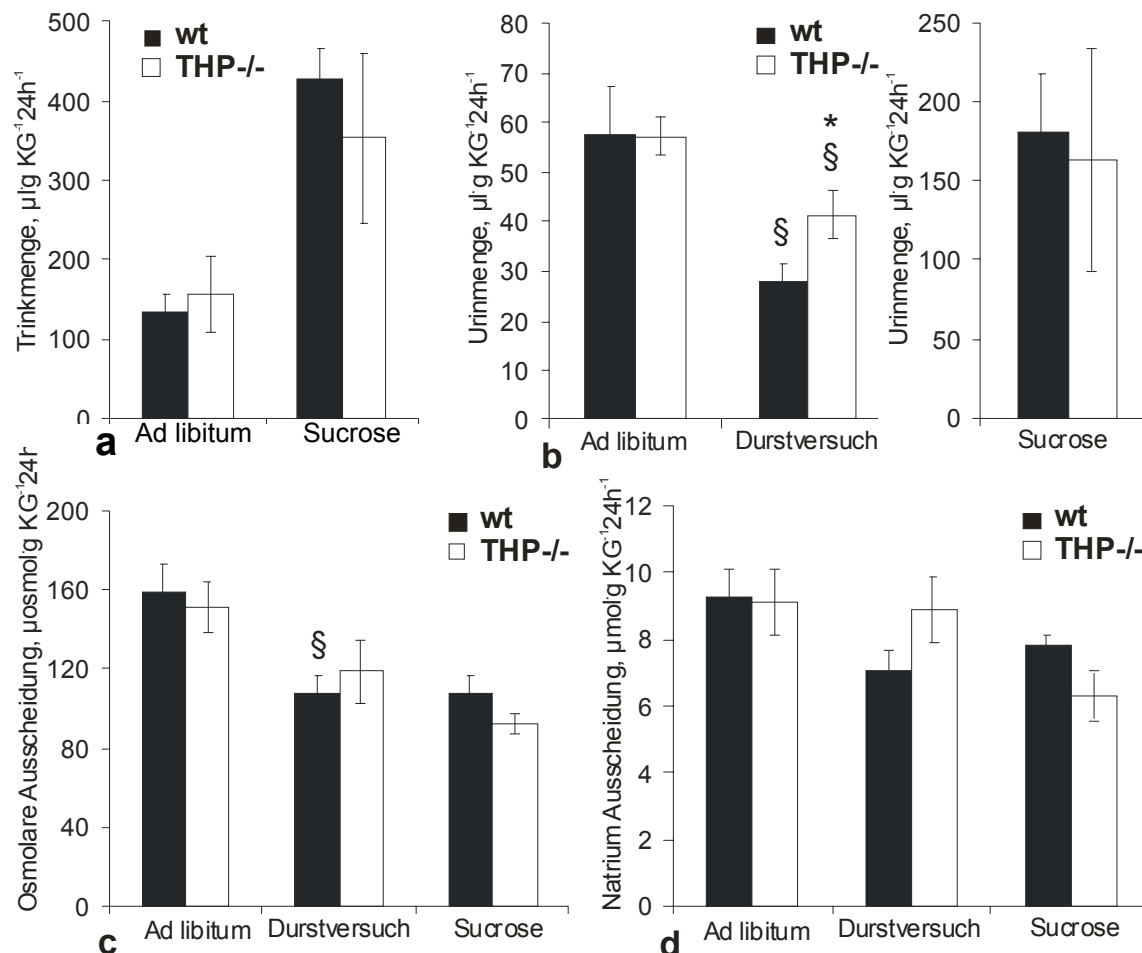


Abbildung 11. Auswertung des physiologischen Wasser- und Elektrolythaushaltes: Trinkmenge (a), Urinmenge (b), osmolare Ausscheidung (c) und Natriumausscheidung (d) unter Normalbedingungen (**Ad libitum**), im Durstversuch (**Durstversuch**) sowie unter Volumenbelastung (**Sucrose**).

§, $p < 0,05$ innerhalb der Gruppe (Ad libitum vs. Durstversuch).

*, $p < 0,05$ zwischen den Gruppen (wt gegen THP-/-).

4.3.2 Western blot

Um die translationale Regulation der Ionentransporter unter Kontrollbedingungen bei THP-/- Mäusen zu charakterisieren, wurden Nierenhomogenate von 6 wt und 6 THP-/- Mäusen für die Western blot Analyse

eingesetzt. Die densitometrische Auswertung zeigte eine signifikante Steigerung der Expression von distalen Ionentransportern bei den THP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Expression der proximal-tubulären Proteine (NaPi-IIa und AQP1) sowie des Housekeeping-Gens (b-Actin) war bei den THP^{-/-}-Mäusen unverändert. Es konnte kein THP bei den THP^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden, während die Kontrolltiere ein intensives Signal für THP aufwiesen. Die Ergebnisse des Western blots sind in Tabelle 4 sowie in den Abbildungen 12 und 14 zusammengefaßt.

Tabelle 4. Expression der distalen Ionentransportproteine, proximal-tubulärer Genprodukte sowie der parakrinen Parameter des JGA bei den THP^{-/-}- vs. wt Mäusen auf mRNA- und Proteinebene. Die bei den wt Mäusen densitometrisch bestimmten Expressionsraten der Genprodukte sind als 100% gesetzt. Die Expressionsraten bei den THP^{-/-}-Mäusen werden im Prozentsatz relativ der Expressionsraten bei den wt Mäusen ausgedrückt.

n.s. – Keine statistisch signifikanten Unterschiede

-, der Parameter wurde nicht untersucht

Produkt	RT-PCR	Western blot
NaPi	n.s.	n.s.
AQP1	-	n.s.
NKAa	+36%	+40%
NKAb	n.s.	-
NKCC2	+33%	+60%
NHE3	+83%	+72%
Barttin	+180%	+29%
CLC-K2	+150%	-
ROMK	+260%	+82%
COX-2	-51%	-54%
Renin	n.s.	n.s.
NCC	+290%	+30%
ENaCa	+80%	-
GAPDH	n.s.	-
b-Actin	-	n.s.

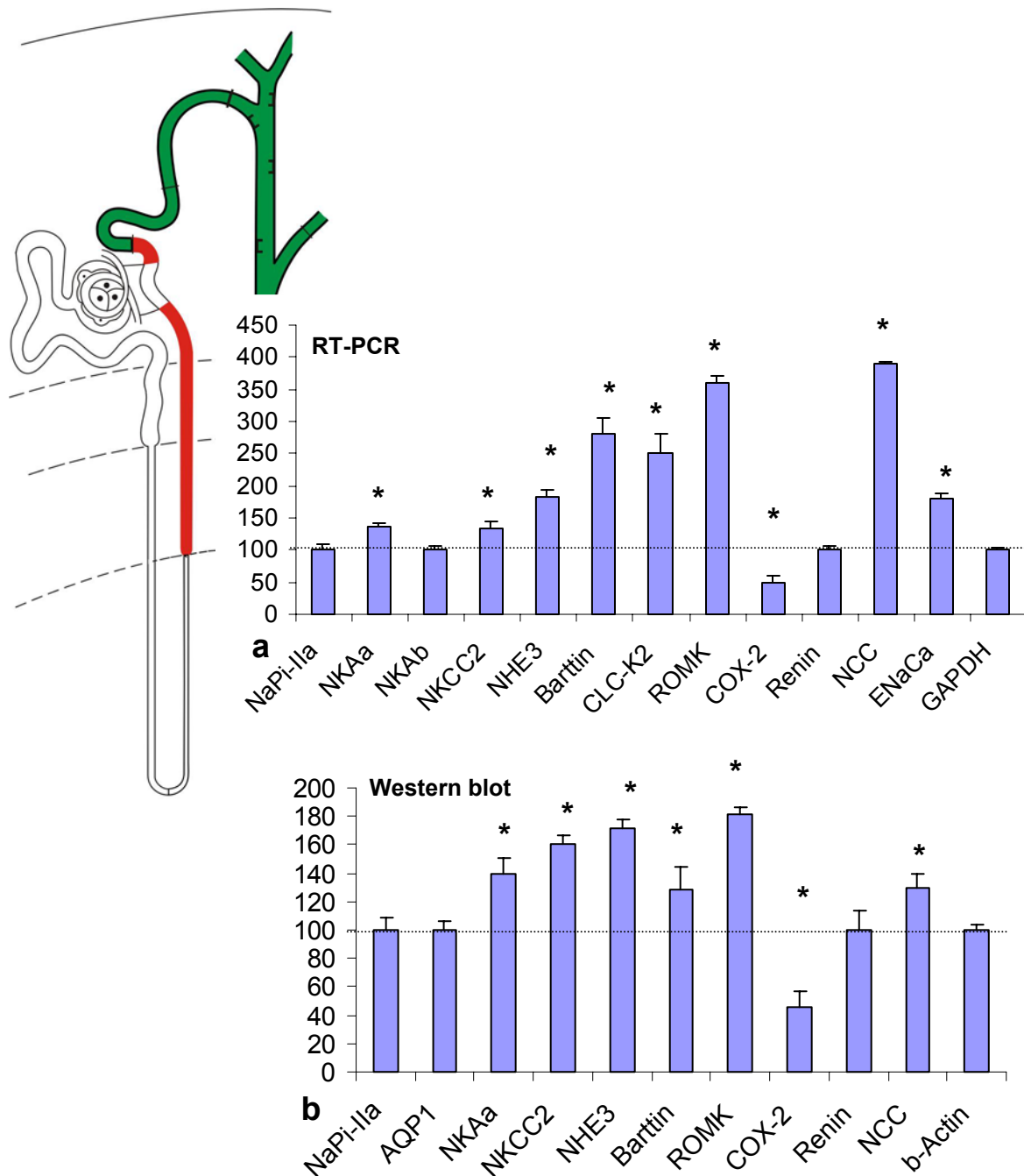


Abbildung 12. Expressionsprofil der proximalen und distalen Transportproteine sowie der JGA Regelparameter mit RT-PCR (a) und Western blot (b) analysiert. Die punktierte Linie zeigt die Expression bei den wt Mäusen (Kontrollebene, 100%). Die blauen Säulen zeigen die relativen Expressionsraten bei den THP^{-/-} Mäusen im Prozentsatz. Auf dem Nephronschema (links) ist die Lokalisation der untersuchten distalen Genprodukte in den entsprechenden Nephronsegmenten mit Farben markiert: TAL für NHE3, NKCC2, ROMK, CLC-K2 sowie Barttin (rot) und die sich distal anschließenden Segmente (DCT, CNT und CD) für NCC sowie ENaCa (grün).

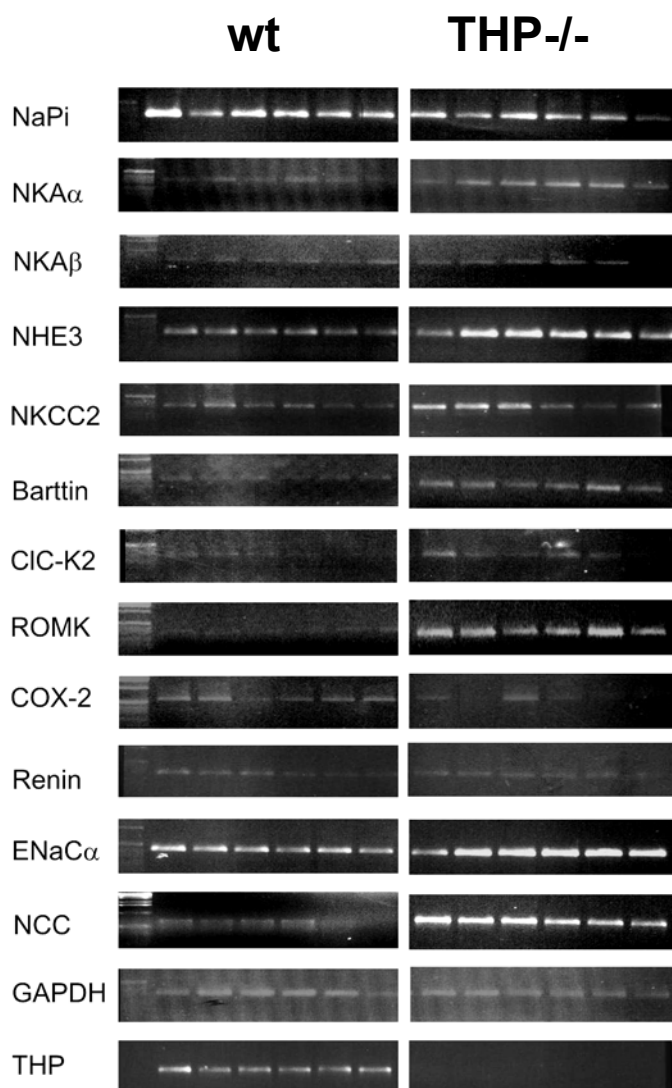


Abbildung 13. Ergebnisse der RT-PCR. RT-PCR Produkte in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Signale wurden densitometrisch ausgewertet und zwischen den **wt** und **THP-/-** Gruppen verglichen (Tab 4, Abb 12). Renin, GAPDH, proximaler NaPi und die vorwiegend im proximalen Tubulus vorkommende NKA β zeigten die gleiche Expression bei den wt und THP-/- Mäusen, während distale Ionentransportproteine eine signifikante Expressionssteigerung in der THP-/- Gruppe aufwiesen. COX-2-Expression war vermindert.

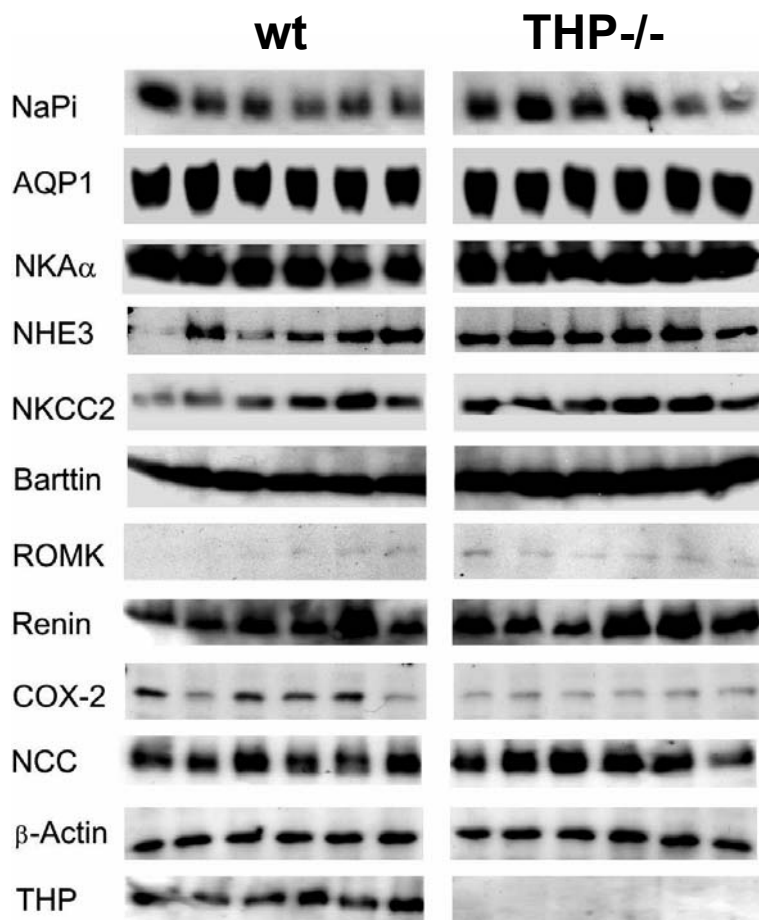


Abbildung 14. Ergebnisse der Western blot Analyse. Die Expression der proximalen und distalen Transportproteine sowie der parakrinen JGA Parameter wurde unter Kontrollbedingungen untersucht. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper konnten immunoreaktive Banden entsprechend den publizierten Proteingrößen detektiert werden. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet und zwischen den **wt** und **THP-/-** Gruppen verglichen (Tab 4, Abb 12). Bei den THP-/- Mäusen konnte kein positives Signal für THP nachgewiesen werden. Die Expression des Housekeeping-Gens β -Actins zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Variabilität der β -Actin-Expression innerhalb der Gruppen war kleiner als 10%. Die im proximalen Tubulus exprimierten Proteine NaPi und AQP1 sowie der JGA-Parameter Renin zeigten die gleiche Expression bei den wt und THP-/- Mäusen, während distale Ionentransportproteine (NKA α , NHE3, NKCC2, Barttin, ROMK und NCC) eine signifikante Steigerung in der THP-/- Gruppe aufwiesen. Die COX-2-Expression war vermindert in der THP-/- Gruppe.

4.4 Juxtaglomeruläre parakrine Parameter

Die semiquantitative Auswertung der NADPH-d- sowie der immunohistochemisch NOS1-positiven MD-Zellen (bezogen auf die Glomerulizahl bei 4 wt und 4 THP-/- Mäusen mit je 4 Gewebsschnitten pro Tier) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den wt und THP-/- Gruppen (Abb 15, 17).

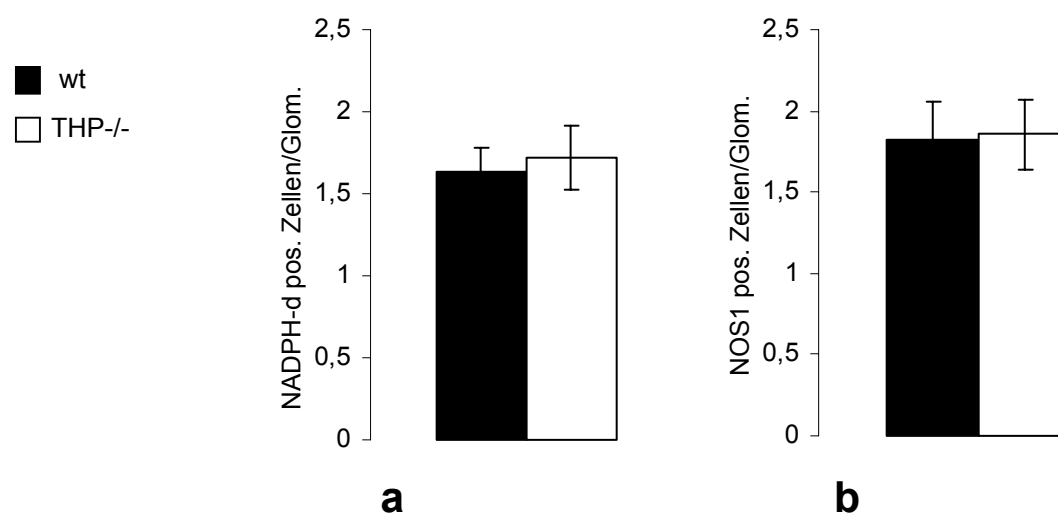


Abbildung 15. Semiquantitative Auswertung der NADPH-d und NOS1 Aktivität in der MD. Es haben sich keine Unterschiede in den NADPH-d- (a) oder NOS1 IHC-positiven (b) MD-Zellen/Glomerulizahl-Verhältnisse zwischen den wt und THP-/- Gruppen ergeben.

Die Quantifizierung der COX-2-mRNS mittels RT-PCR zeigte eine signifikante Verminderung der COX-2-mRNS-Expression um 51% bei den THP-/- im Vergleich zu den wt Mäusen (Abb. 12, 13, Tabelle 4). Die COX-2-Immunreaktivität über Western blot reduzierte sich auf 46% bei den THP-/- Mäusen (Abb. 12, 14, Tabelle 4). Die semiquantitative Auswertung der COX-2-immunoreaktiven Zellen bei den THP-/- und wt Mäusen (bezogen auf die Glomerulizahl) zeigte eine signifikante Verminderung der COX-2-Proteinexpression um 46% in der THP-/- Gruppe (Abb. 16c, 17). Die Quantifizierung von Renin-mRNS mittels RT-PCR, Renin-Protein über Western blot, sowie die semiquantitative Auswertung von Renin-immunreaktiven arteriolen Abschnitte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den wt und THP-/- Gruppen (Abb 12, 13, 14, 16a, 17, Tabelle 4). Die Semiquantitative Auswertung der Renin-mRNS-positiven arteriolen Portionen

mittels In-situ-Hybridisierung ergab jedoch eine signifikante Verminderung der Renin-mRNS-Expression um 32% in der THP-/- Gruppe (Abb 16b, 17).

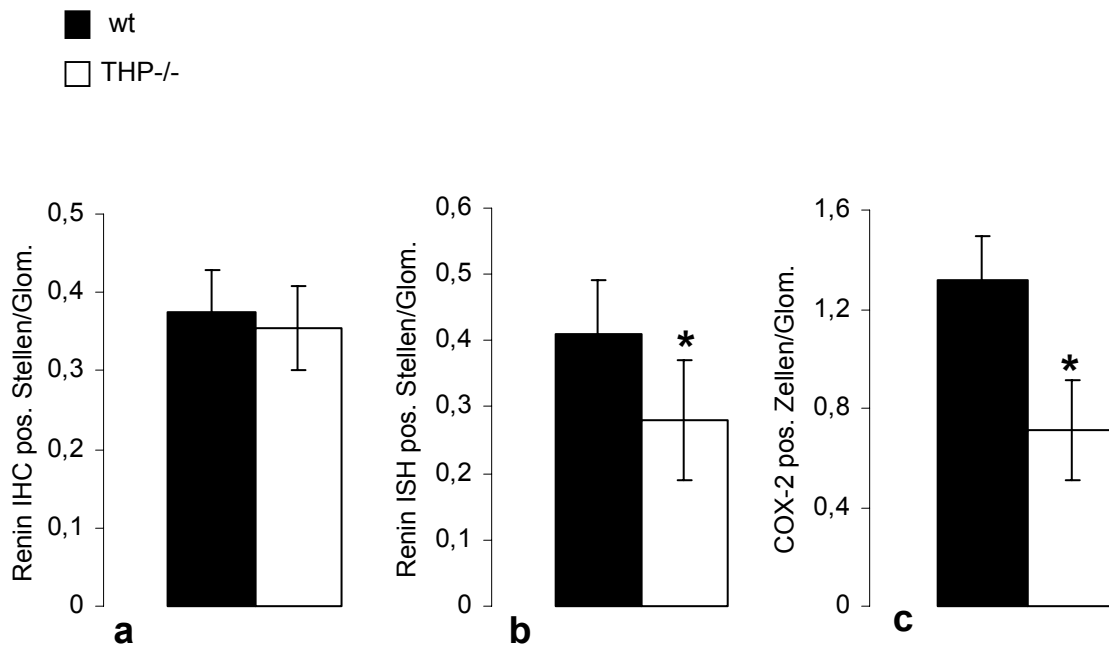


Abbildung 16. Semiquantitative Auswertung der Renin- und COX-2-Expression in der MD.

a – Auswertung der Renin-immunoreaktiven arteriölen Portionen zeigte keine Unterschiede zwischen den THP-/- und wt Gruppen. **b** – Auswertung der Renin-mRNS-Produktion mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung detektierte eine signifikant verminderte Renin-mRNS-Synthese (um 32%) bei den THP-/- Mäusen im Vergleich zu den wt Tieren. **c** – Auszählung der COX-2-immunoreaktiven MD-Zellen zeigte eine signifikante Verminderung um 46% in der THP-/- Gruppe gegenüber der wt Gruppe.

* $p < 0,05$

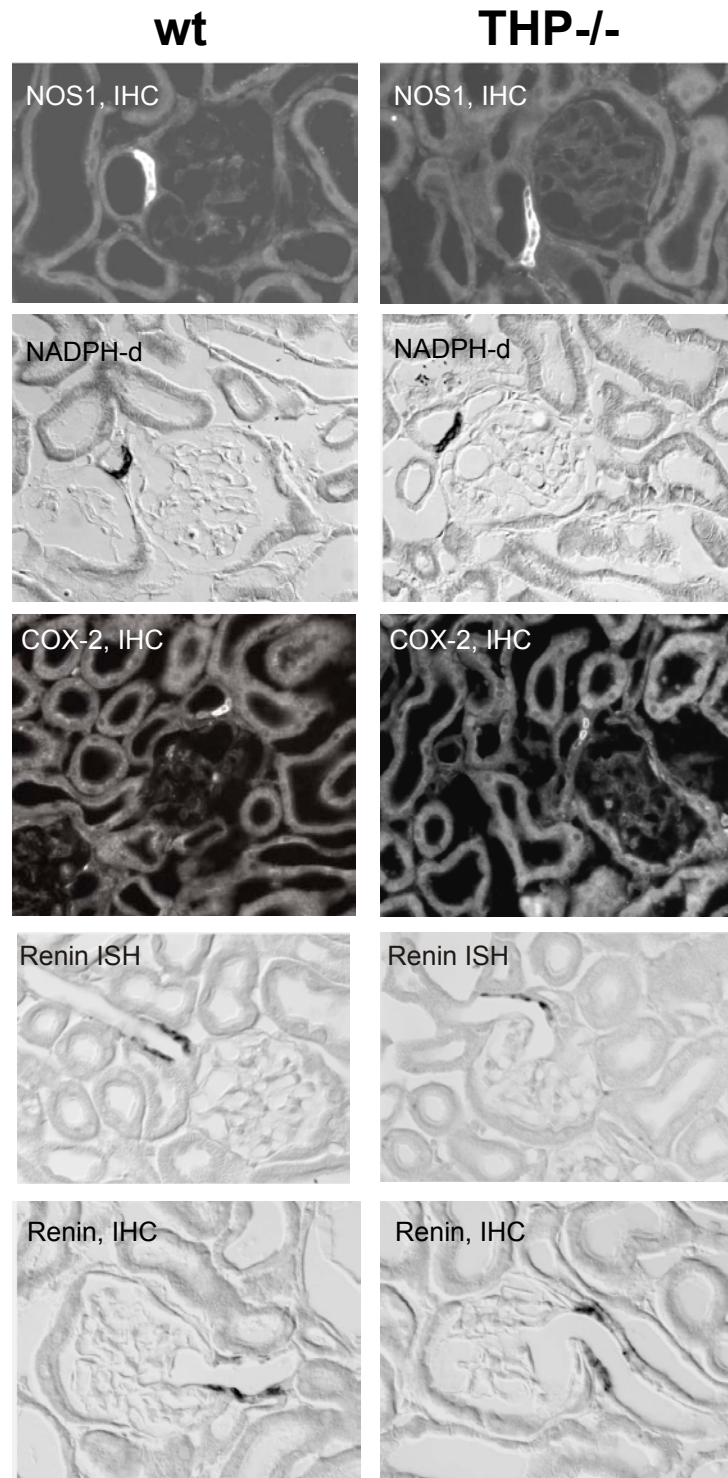


Abbildung 17. Representative Gewebeschnitte aus der semiquantitativen Auswertung der JGA-Parameter. IHC – Immunohistochemie, ISH – In-situ-Hybridisierung.