

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin und  
dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums  
Hamburg-Eppendorf

# **Physiologische Funktion des Anionen-Bikarbonat-Transporters AE4 in der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Mirijam Koch**

Tierärztin

aus Erfurt

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4101

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

*mice, kidney, urine, glomerular filtration, renal function, physiology, enzym immunoassay,  
SDS-Page*

**Tag der Promotion:** 18.03.2019

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau des Nephrons und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	2
1.2	NaCl-Resorption sowie HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transport entlang des Nephrons	3
1.2.1	PCT, TAL und DCT1	3
1.2.2	ASDN und die Rolle der β-Schaltzellen	5
1.2.2.1	Pendrin (SLC26A4) und Pendred Syndrome	8
1.2.2.2	NDCBE (SLC4A8) und NDCBE-Gendefizienz	11
1.2.2.3	AE4 (SLC4A9)	12
1.3	Hormonelle Regulation der NaCl-Resorption und Volumenhomöostase	13
1.4	Regulation des Säure-Basen-Haushalts über die Anpassung des renalen HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transports und der H <sup>+</sup> -Sekretion	14
1.5	Fragestellung der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Materialien	17
2.1.1	Geräte, Instrumente	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien, Substanzen	19
2.1.4	Hergestellte Lösungen, Puffer	21
2.1.5	DNA-, Proteinmarker	23
2.1.6	Enzyme, Inhibitoren	23
2.1.7	Antikörper, Kits	23
2.1.8	Primer	24
2.1.9	Futter	24
2.1.10	Software	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Tierversuch	25
2.2.1.1	Verwendete Mauslinie	25
2.2.1.2	Haltung und Mausvisiten	25
2.2.1.3	Diätfutter	26
2.2.1.4	Narkose und Euthanasie	26
2.2.2	Genotypisierung	27
2.2.2.1	Lysierung der Ohrproben	27
2.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.2.3	Gelelektrophorese	29
2.2.3	Uringewinnung durch metabolischen Käfig und Blasenpunktion sowie Urinmessungen	30

2.2.3.1	Elektrolytmessung im Urin .....	31
2.2.3.2	Kreatininmessung im Urin.....	32
2.2.4	Transkutane Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels FITC-Sinistrin.....	33
2.2.5	Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue .....	35
2.2.6	Bestimmung der Konzentration des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (BUN).....	36
2.2.7	Plasmahormonbestimmung .....	37
2.2.7.1	Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung der Reninaktivität und des Aldosterons im Plasma .....	38
2.2.8	Retrobulbäre Blutentnahme und Blutgasanalyse (BGA).....	39
2.2.9	Organentnahme.....	40
2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot .....	40
2.2.10.1	Proteinpräparation .....	40
2.2.10.2	Proteinbestimmung.....	41
2.2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
2.2.10.4	Western Blot.....	43
2.2.11	Statistik.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1	Normaldiät.....	46
3.1.1	Elektrolyt- und Volumenhaushalt .....	46
3.1.1.1	Plasmaelektrolyte .....	46
3.1.1.2	Hämatokrit.....	47
3.1.1.3	Urinelektrolyte.....	47
3.1.2	Säure-Basen-Haushalt.....	48
3.2	NaCl-Mangeldiät.....	49
3.2.1	Elektrolyt- und Volumenhaushalt .....	49
3.2.1.1	Plasmaelektrolyte .....	49
3.2.1.2	Plasmavolumen, Hämatokrit und BUN.....	50
3.2.1.3	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	50
3.2.1.4	Urinelektrolyte unter Diätwechsel und nach 10 Tagen .....	51
3.2.2	Kompensatorische Aktivierung des RAAS .....	53
3.2.3	Kompensatorische Aktivierung anderer renaler Na <sup>+</sup> -Transportwege.....	55
3.2.3.1	Western Blot Analysen .....	55
3.2.3.2	Blockade einzelner Transportwege mittels Diuretika.....	59
3.2.4	Säure-Basen-Haushalt.....	61
3.3	NaCl-Mangeldiät und NH <sub>4</sub> Cl.....	62
3.3.1	Elektrolyt- und Volumenhaushalt .....	63
3.3.1.1	Plasmaelektrolyte .....	63

3.3.1.2	Hämatokrit .....	64
3.3.2	Säure-Basen-Haushalt.....	64
3.4	NaCl-Mangeldiät und NaHCO <sub>3</sub> .....	65
3.4.1	Elektrolyt- und Volumenhaushalt .....	66
3.4.1.1	Plasmaelektrolyte .....	66
3.4.1.2	Plasmavolumen, Hämatokrit und BUN.....	68
3.4.1.3	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	68
3.4.1.4	Urinelektrolyte unter Diätwechsel und nach 7 Tagen .....	69
3.4.2	Säure-Basen-Haushalt.....	71
3.4.3	Mögliche Ursache der Alkalose von <i>Ae4<sup>-/-</sup></i> durch NHE3 .....	73
3.4.3.1	NHE3 und pNHE3 Ser552 .....	73
3.4.4	Kompensatorische Aktivierung des RAAS .....	75
3.4.5	Kompensatorische Aktivierung anderer renaler Na <sup>+</sup> -Transportwege aufgrund des Na <sup>+</sup> -Verlusts von <i>Ae4<sup>-/-</sup></i> .....	75
3.4.5.1	NCC und pNCC Thr60.....	76
3.4.5.2	ENaC.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
4.1	Die Rolle des AE4 im Na <sup>+</sup> - und Volumenhaushalt .....	80
4.2	Die Rolle des AE4 im Säure-Basen-Haushalt.....	84
4.3	Schlussfolgerung zur physiologischen Funktion des AE4.....	91
4.4	Ausblick.....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
12.1	Poster.....	111
<b>13</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>112</b>

## 1 Einleitung

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ des Harnsystems und übernimmt zahlreiche lebenswichtige Aufgaben im Körper. Neben einer bedeutsamen Rolle bei der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie beim Säure-Basen-Haushalt dient sie der Elimination von Endprodukten des Stoffwechsels, den sogenannten harnpflichtigen Substanzen wie z.B. Harnstoff. Außerdem fungiert sie als Produktionsort für Hormone wie z.B. Renin und Erythropoetin (Pape *et al.*, 2014).

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches aus dem Nierenkörperchen (*Glomerulum*) und dem nachgeschalteten Tubulussystem besteht. Im *Glomerulum* erfolgt die Filtration des Blutplasmas. Das Tubulussystem ist wiederum in verschiedene Abschnitte eingeteilt (siehe 1.1), in welchen mittels verschiedener Transportsysteme vor allem die Resorption von zuvor filtrierten Stoffen wie z.B. Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) und Bicarbonat (=Hydrogencarbonat;  $\text{HCO}_3^-$ ) stattfindet. Zusätzlich werden im Tubulussystem auch Stoffe wie z.B. Kalium ( $\text{K}^+$ ) durch Sekretionsvorgänge ins Tubuluslumen abgegeben.

$\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sind neben  $\text{HCO}_3^-$  die wichtigsten osmotisch wirksamen Teilchen des Extrazellulärvolumens (EZV). Unter physiologischen Bedingungen ist die NaCl-Ausscheidung über den Urin genau auf die tägliche Kochsalzaufnahme und die täglichen Salzverluste über z.B. den Schweiß abgestimmt, sodass die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Balance des Körpers aufrechterhalten bleibt. Kommt es jedoch infolge unterschiedlicher Ursachen zur renalen NaCl-Retention und somit zur verminderten NaCl-Ausscheidung über den Urin, entsteht ein NaCl-Überschuss und folglich eine Volumenexpansion. Daraus resultiert ein Anstieg des Blutdrucks bzw. längerfristig ein Bluthochdruck (Hypertonie). Im Gegensatz dazu hat eine verminderte NaCl-Resorption als gegenteiligen Effekt einen verminderten Blutdruck (Hypotonie) zur Folge (Pape *et al.*, 2014; Boron & Boulpaep, 2017).

Die Niere ist ebenso essentiell für den Säure-Basen-Haushalt und somit für die Konstanzhaltung des pH-Wertes im Blut, da sie zum Großteil die Plasmakonzentration an  $\text{HCO}_3^-$  reguliert. Dieses Anion fungiert als Base und ist Bestandteil des wichtigsten physiologischen Puffersystems des Körpers, dem  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -System (Hamm *et al.*, 2015). Für die Aufrechterhaltung des pH-Werts im Blut spielen daher eine geregelte renale Rückresorption und Neusynthese von  $\text{HCO}_3^-$  sowie die Ausscheidung von Säuren über die Niere eine zentrale Rolle (Curthoys & Moe, 2014).

Wie bedeutend eine uneingeschränkte Nierenfunktion für die Homöostase ist, wird unter anderem bei verschiedenen genetischen Erkrankungen deutlich. So kann der genetische Defekt eines einzelnen renalen Transporters oder Ionenkanals zur Entgleisung der Elektrolyt- und Volumenhomöostase sowie des Säure-Basen-Haushalts führen und damit

schwerwiegende Erkrankungen zur Folge haben. Beim Liddle-Syndrom handelt es sich beispielsweise um eine seltene autosomal-dominant vererbte Nierenkrankheit des Menschen, welche 1963 von dem amerikanischen Endokrinologen Grant Winder Liddle (1921-1989) erstmals beschrieben wurde (Liddle, 1963). Eine Genmutation des epithelialen Natriumkanals ENaC im distalen Abschnitt des Tubulussystems führt hierbei zur Funktionssteigerung („*gain-of-function*“-Mutation) des Kanals. Dies hat eine erhöhte Resorption von  $\text{Na}^+$  sowie eine daraus resultierende gesteigerte Wasserresorption zur Folge (Nesterov *et al.*, 2016). Aufgrund dessen tritt bei den Patienten neben anderen Symptomen eine Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens (Hypervolämie) und Hypertonie auf. Anhand des klinischen Bildes wird klar, dass die  $\text{Na}^+$ -Balance und die Volumenhomöostase eng miteinander gekoppelt sind. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität des ENaC durch das Hormon Aldosteron vor allem unter Salzangelzuständen erhöht (Masilamani *et al.*, 1999; Rossier, 2014). Bei den Patienten werden aber niedrige Konzentrationen von Aldosteron im Plasma gemessen, sodass die Erkrankung auch als Pseudo-hyperaldosteronismus bezeichnet wird (Tetti *et al.*, 2018).

Eine weitere schwerwiegende Erkrankung, die ein Beispiel für eine Entgleisung des Säure-Basen-Haushalts infolge eines defekten renalen Transporters darstellt, ist eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation des NBCe1. Dieser Transporter ist in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus, dem ersten Abschnitt des Tubulussystems, lokalisiert und aufgrund der elektroneutralen Abgabe von  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle ins *Interstitium* essentiell für die Resorption von  $\text{HCO}_3^-$  (Soleimani *et al.*, 1987). Patienten mit einem Gendefekt im NBCe1 sind aufgrund des Funktionsverlusts des Transporters („*loss-of-function*“-Mutation) unfähig  $\text{HCO}_3^-$  zu resorbieren. Dies resultiert in einer verminderten Konzentration an  $\text{HCO}_3^-$  im Blut. Infolge dessen zeigen die Patienten neben anderen Symptomen eine Azidose (Toye *et al.*, 2006).

### **1.1 Aufbau des Nephrons und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)**

Das Gesamtvolumen an gebildetem Primärharn, welches pro Zeiteinheit von den *Glomeruli* beider Nieren aus dem Plasma abfiltriert wird, wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet. Sie ist entscheidend für eine normale Funktion der Nieren und wird daher als wichtiger Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen. Die GFR beträgt beim Menschen mit normalem Blutdruck ca. 180 l pro Tag und sinkt z.B. pathologisch infolge eines Kreislaufschocks oder verschiedener Nierenerkrankungen, wie z.B. einer diabetischen Nephropathie oder einer Glomerulonephritis (Levey & Coresh, 2012).

Das Tubulussystem wird in verschiedene Abschnitte eingeteilt (Abbildung 2A unter 1.2.2). Der erste Abschnitt besteht aus dem proximalen Tubulus mit seiner *Pars convoluta* (*proximal*

*convoluted tubule*; PCT) und seiner *Pars recta (proximal straight tubule*; PST). Anschließend folgt die Henle-Schleife mit ihren drei Anteilen: absteigender dünner Teil der Henle-Schleife (*descending thin limb*; DTL), aufsteigender dünner Teil (*ascending thin limb*; ATL) sowie aufsteigender dicker Teil (*thick ascending limb*; TAL). Der letzte Abschnitt des Tubulussystems besteht aus dem distalen Nephron, welches ebenfalls in verschiedene Segmente eingeteilt wird: dem distalen konvoluten Tubulus (*distal convoluted tubule*; DCT), dem Verbindungstubulus (*connecting tubule*; CNT) und dem Sammelrohr (*collecting duct*; CD). Der DCT setzt sich nochmals aus den Anteilen DCT1 und DCT2 zusammen. Beim Sammelrohr wird dagegen noch ein kortikaler (*cortical collecting duct*; CCD) und ein medullärer Anteil (*medullary collecting duct*; MCD) unterschieden. Da der DCT2, der CNT und das CCD unter dem Einfluss des Hormons Aldosteron stehen, werden diese Anteile unter dem Begriff Aldosteron-sensitives distales Nephron (ASDN) zusammengefasst (Pape *et al.*, 2014; Boron & Boulpaep, 2017).

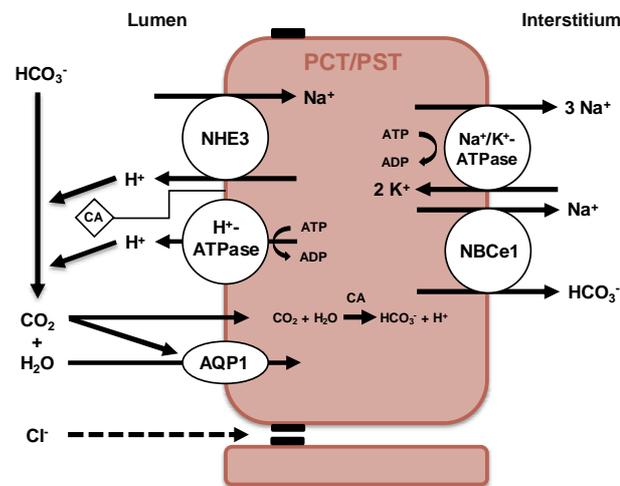
## 1.2 NaCl-Resorption sowie $\text{HCO}_3^-$ -Transport entlang des Nephrons

### 1.2.1 PCT, TAL und DCT1

Die Elektrolyte  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sowie  $\text{HCO}_3^-$  werden vom *Glomerulum* frei filtriert, sodass im Primärharn die gleichen Konzentrationen an  $\text{Na}^+$  (135-145 mmol/l),  $\text{Cl}^-$  (95-108 mmol/l) und  $\text{HCO}_3^-$  (22-26 mmol/l) vorhanden sind wie im Plasma der Kapillaren (Pape *et al.*, 2014).

Im proximalen Tubulus wird bereits ein Großteil des NaCl rückresorbiert (ca. 60-70 %). Der transepitheliale Transport der beiden Elektrolyte kann über einen transzellulären oder über einen parazellulären Weg erfolgen. Frühproximal wird  $\text{Na}^+$  transzellulär vor allem über zwei Transportwege resorbiert: über den elektroneutralen Natrium-Protonen-Antiporter ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter) NHE3 (Abbildung 1) und im sekundär aktiven Transport über spezifische  $\text{Na}^+$ -Symportcarrier (mit z.B. Glucose, Aminosäuren, Phosphat). Für die  $\text{Na}^+$ -Abgabe ins *Interstitium* und somit auf die Blutseite sorgen eine in der basolateralen Membran gelegene Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) und ein elektrogener  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (*electrogenic  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter 1*; NBCe1). Dabei stellt vor allem die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase den notwendigen  $\text{Na}^+$ -Gradienten her, der als Triebkraft für die Prozesse im proximalen Tubulus dient.  $\text{Cl}^-$  wird im proximalen Tubulus hauptsächlich parazellulär und nur zum geringen Anteil transzellulär resorbiert. Die transzelluläre  $\text{Cl}^-$ -Resorption erfolgt dabei hauptsächlich im Antiport mit Basen wie z.B. Formiat, Oxalat oder  $\text{HCO}_3^-$ . Die basolaterale  $\text{Cl}^-$ -Abgabe wird über  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter und möglicherweise über  $\text{Cl}^-$ -Kanäle gewährleistet (Curthoys & Moe, 2014; Boron & Boulpaep, 2017).

Zusätzlich werden im proximalen Tubulus 70-80 % des zuvor filtrierten  $\text{HCO}_3^-$  resorbiert (Hamm *et al.*, 2015). Die Aufnahme von  $\text{HCO}_3^-$  aus dem Tubuluslumen ist an die Sekretion von Protonen ( $\text{H}^+$ -Ionen) ins Tubuluslumen gekoppelt. Die  $\text{H}^+$ -Ionen werden hauptsächlich über den bereits erwähnten apikalen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter NHE3 sezerniert (Abbildung 1) sowie spätproximal unabhängig von der  $\text{Na}^+$ -Resorption zusätzlich über eine apikale  $\text{H}^+$ -ATPase (Curthoys & Moe, 2014). Die Protonen reagieren im Lumen zusammen mit den zuvor glomerulär filtrierten  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen zu Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Diese Reaktion wird durch eine membranständige Carboanhydrase (CAIV) katalysiert. Die Kohlensäure dissoziiert direkt zu Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Anschließend erfolgt die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme in die Zelle durch Diffusion. Darüber hinaus sorgen Aquaporine (AQP1) für eine  $\text{CO}_2$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Permeabilität (Boron, 2006). Intrazellulär findet wiederum unter dem Einfluss einer zytosolischen Carboanhydrase (CAII) die Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  statt. Die  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen verlassen die Zelle basolateral im Cotransport mit  $\text{Na}^+$  über den  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter NBCe1. Die Protonen werden wiederum sezerniert, um erneut mit  $\text{HCO}_3^-$  zu reagieren. Der Hauptanteil der tubulär sezernierten  $\text{H}^+$ -Ionen dient somit der Resorption von  $\text{HCO}_3^-$ .



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einzelner Transporter des proximalen Tubulus zur  $\text{NaCl}$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption.** Apikal erfolgt die  $\text{Na}^+$ -Resorption gekoppelt mit einer  $\text{H}^+$ -Sekretion über den NHE3. Spätproximal werden  $\text{H}^+$ -Ionen zusätzlich  $\text{Na}^+$ -unabhängig über eine  $\text{H}^+$ -ATPase sezerniert. Im Lumen reagieren die  $\text{H}^+$ -Ionen unter dem Einfluss einer Carboanhydrase (CAIV) mit dem filtrierten  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ . Das entstandene  $\text{CO}_2$  diffundiert in die Zelle. Im Zytoplasma katalysiert die CAII die Reaktion zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ -Ionen. Über den NBCe1 werden  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  ins *Interstitium* abgegeben. Das entstandene  $\text{H}^+$  wird wiederum apikal in das Tubuluslumen sezerniert. Die Resorption von  $\text{Cl}^-$  erfolgt vor allem parazellulär.

Ein Anteil der sezernierten Protonen wird jedoch über den Harn eliminiert. Bei dem Prozess ist die  $\text{H}^+$ -Sekretion an eine intrazelluläre Neusynthese von  $\text{HCO}_3^-$  gekoppelt. Die renale Säureausscheidung erfolgt hauptsächlich über zwei verschiedene Wege: die Ausscheidung

von titrierbaren Säuren oder die Ausscheidung von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Bei Ersterem sorgt ebenfalls die zytosolische CAII für die Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ , wobei das intrazellulär neusynthetisierte  $\text{HCO}_3^-$  über den basolateralen  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter NBCe1 ins *Interstitium* gelangt. Die apikal sezernierten  $\text{H}^+$ -Ionen binden an sich im Tubuluslumen befindliche Basen wie z.B. an filtriertes Phosphat (Hydrogenphosphat;  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), welches als titrierbare Säure (z.B. Dihydrogenphosphat;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) ausgeschieden wird. Der zweite Weg zur renalen Säureausscheidung und  $\text{HCO}_3^-$ -Neusynthese basiert auf einem schrittweisen Abbau von Glutamin in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen. Das Glutamin wird dabei mit Hilfe der katalytischen Wirkung einer Glutaminase zu Glutamat und  $\text{NH}_4^+$  umgewandelt. Das Glutamat wird wiederum bis zur Glucose abgebaut. Dabei entstehen ein weiteres  $\text{NH}_4^+$  und zwei  $\text{HCO}_3^-$ -Moleküle. Die gebildeten  $\text{NH}_4^+$ -Ionen werden entweder direkt über den NHE3 im Antiport mit  $\text{Na}^+$  sezerniert oder diffundieren nach der Dissoziation zu Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und  $\text{H}^+$  als  $\text{NH}_3$  ins Tubuluslumen. Dort bindet  $\text{NH}_3$  an die ebenfalls sezernierten  $\text{H}^+$ -Ionen, sodass erneut  $\text{NH}_4^+$  entsteht. Anschließend wird  $\text{NH}_4^+$  größtenteils über den Urin ausgeschieden.

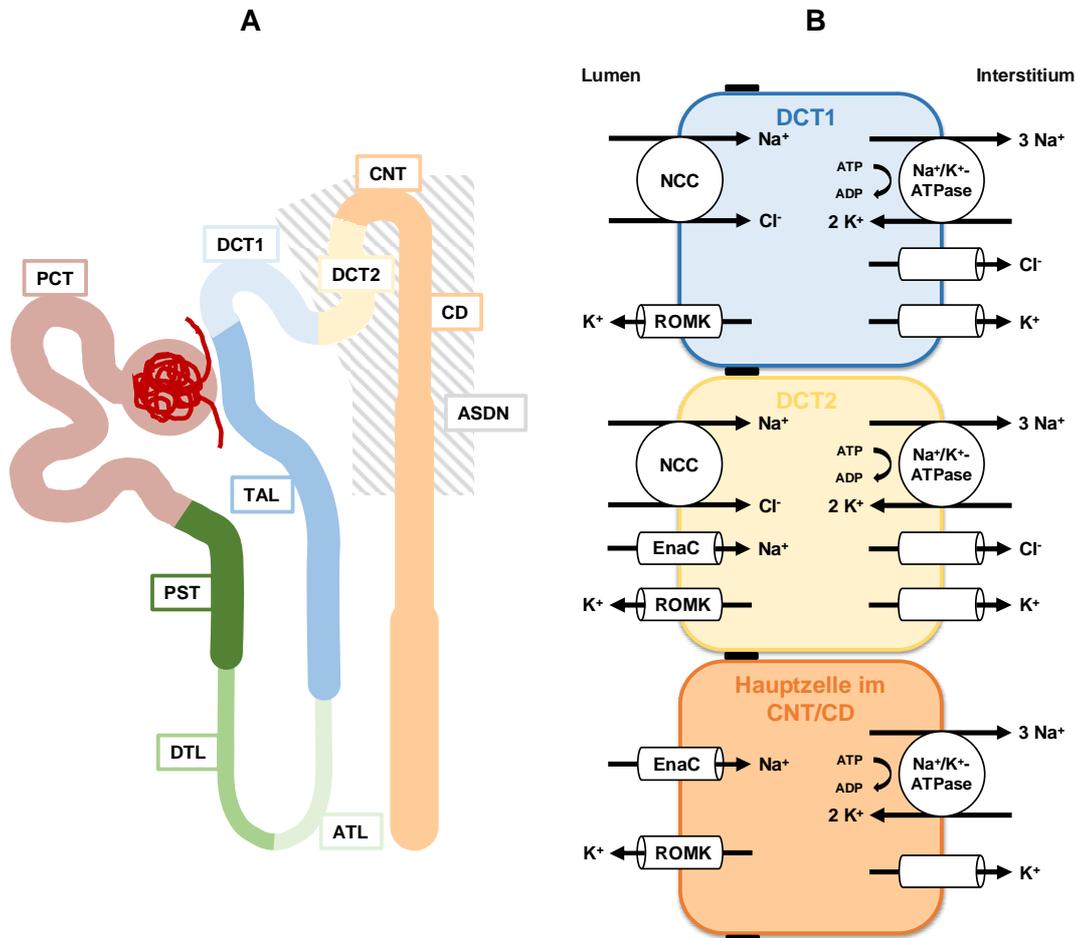
Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Mechanismen, dass der proximale Tubulus aufgrund der Sekretion von Protonen sowie der Resorption und Neusynthese von  $\text{HCO}_3^-$  wesentlich an der Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase beteiligt ist (Pape *et al.*, 2014; Hamm *et al.*, 2015; Boron & Boulpaep, 2017).

In der Henle-Schleife (TAL) wird die  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption (ca. 15 %) ebenfalls über  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter vermittelt (Capasso *et al.*, 2002; Hamm *et al.*, 2015). Zudem findet die Resorption von weiteren ca. 25 % des filtrierten NaCl über den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ -Cotransporter NKCC2 statt. Schleifendiuretika wie z.B. Furosemid können den Cotransporter reversibel hemmen und führen so zu einer massiven Zunahme der renalen NaCl- und Wasserausscheidung. Normalerweise erreichen nur ca. 5 % des filtrierten  $\text{HCO}_3^-$  und ca. 5-10 % des NaCl die distalen Nephronsegmente. Bei der Passage des DCT1 erfolgt die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme elektroneutral über den  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter NCC (Abbildung 2B unter 1.2.2). Dieser Transporter ist Thiazid-sensitiv und kann daher durch Thiazid-Diuretika wie z.B. Hydrochlorothiazid (HCTZ) blockiert werden (Boron & Boulpaep, 2017).

### 1.2.2 ASDN und die Rolle der $\beta$ -Schaltzellen

Im DCT2, CNT und CCD findet die Feinregulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption durch den Einfluss des Hormons Aldosteron statt. Im DCT2 wird die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme zusätzlich zum Thiazid-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter NCC über den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC gewährleistet (Abbildung 2B). Der Kanal ist aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  aufgebaut und reagiert sensitiv auf Amilorid, sodass er durch dieses Diuretikum blockiert werden kann. Die

Aufnahme von  $\text{Na}^+$  erfolgt durch den ENaC elektrogen, wodurch ein Lumen-negatives Potential entsteht. Infolge dessen wird die Sekretion von  $\text{K}^+$  ins Lumen durch  $\text{K}^+$ -Kanäle wie dem ROMK (*renal outer medullary potassium channel*) und die parazelluläre Resorption von  $\text{Cl}^-$  begünstigt. In den sogenannten Hauptzellen des CNTs und CDs wird die  $\text{Na}^+$ -Resorption nur noch über den ENaC gewährleistet (Abbildung 2B) (Boron & Boulpaep, 2017).

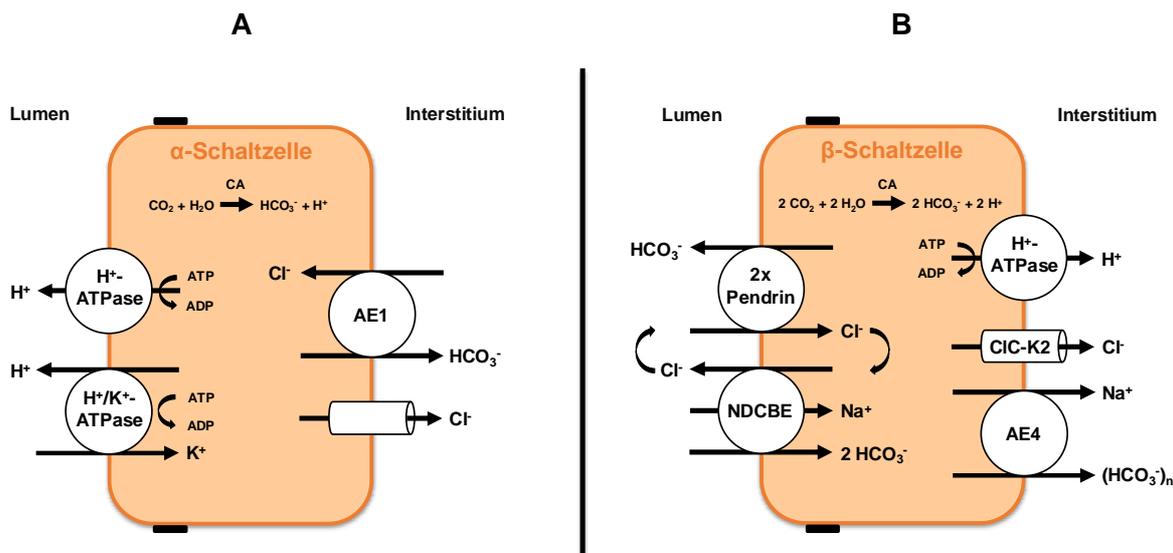


**Abbildung 2: A** Schematische Darstellung der Abschnitte eines Nephrons und **B** NaCl-Resorption in den distalen Nephronsegmenten DCT1, DCT2 und CNT/CD. **A** Das Tubulussystem des Nephrons wird in verschiedene Abschnitte eingeteilt: proximaler Tubulus (*Pars convoluta* (PCT), *Pars recta* (PST)), Henle-Schleife (absteigender dünner Teil (DTL), aufsteigender dünner Teil (ATL), aufsteigender dicker Teil (TAL)), distaler konvoluter Tubulus (DCT mit DCT1 und DCT2), Verbindungstubulus (CNT), Sammelrohr (CD). DCT2, CNT und der kortikale Anteil des CDs unterliegen der Regulation durch Aldosteron und werden daher als Aldosteron-sensitives distales Nephron (ASDN) bezeichnet. **B** Die Erläuterung einzelner Transportwege erfolgt im Text (modifiziert nach Eladari *et al.*, 2014).

Neben den Hauptzellen sind im CNT und CD zudem die sogenannten Schaltzellen (*intercalated cells*; ICs) lokalisiert. Diese sind spezialisiert auf den  $\text{H}^+$ - bzw.  $\text{HCO}_3^-$ -Transport und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Feinregulation des Säure-Basen-Haushalts. Die Schaltzellen werden je nach Expression eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters und einer

H<sup>+</sup>-ATPase in Typ A (bzw. α-ICs), Typ B (bzw. β-ICs) und Nicht-A/Nicht-B ICs eingeteilt (Wall & Weinstein, 2013; Roy *et al.*, 2015). Die α-Schaltzellen sezernieren Protonen über die apikale H<sup>+</sup>-ATPase ins Tubuluslumen (Abbildung 3A). Des Weiteren erfolgt die H<sup>+</sup>-Sekretion über eine H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Diesem Schritt geht eine intrazelluläre Neusynthese von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> voraus, wie es bereits im proximalen Tubulus beschrieben wurde (Hamm *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015). Zudem haben die α-ICs einen in der basolateralen Membran lokalisierten Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter (*anion exchanger 1*; AE1), welcher für die Cl<sup>-</sup>-Aufnahme in die Zelle und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Abgabe ins *Interstitium* sorgt. Bei den β-Schaltzellen befindet sich die H<sup>+</sup>-ATPase wiederum auf der basolateralen Seite und es erfolgt eine HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion ins Tubuluslumen über den apikalen Na<sup>+</sup>-unabhängigen Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter Pendrin (SLC26A4) (Abbildung 3B). Die Nicht-A/Nicht-B Schaltzellen, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt ist, exprimieren sowohl Pendrin als auch die H<sup>+</sup>-ATPase in der apikalen Membran (Wall *et al.*, 2003).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die β-Schaltzellen ausschließlich die Funktion der renalen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion übernehmen und somit nur für die Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase von Bedeutung sind. Neuere Studien zeigten jedoch, dass die β-ICs zusätzlich an der NaCl-Resorption beteiligt sind und damit eine wichtige Bedeutung bei der Elektrolyt- und Volumenbalance und somit Blutdruckregulation haben (Verlander *et al.*, 2003; Wall *et al.*, 2004). Laut Literaturangaben erfolgt die Aufnahme von NaCl über die apikale Membran der β-Schaltzellen durch die Zusammenarbeit des zuvor beschriebenen Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporters Pendrin und eines Na<sup>+</sup>-getriebenen Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporters (*Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger*; NDCBE; SLC4A8) (Abbildung 3B). Dieser Transportweg ist elektroneutral und Thiazid-sensitiv (Leviel *et al.*, 2010). Die Pendrin-vermittelte Cl<sup>-</sup>-Aufnahme in die β-ICs ist somit mit der Na<sup>+</sup>-Resorption über den NDCBE gekoppelt (Hadchouel *et al.*, 2011). Zudem sezerniert Pendrin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen ins Tubuluslumen, um es dem NDCBE zur Verfügung zu stellen. Die in der basolateralen Membran lokalisierte H<sup>+</sup>-ATPase sorgt für den nötigen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gradienten und dient daher als Triebkraft für den sekundär aktiven Transport über Pendrin. Es wird vermutet, dass das aufgenommene NaCl basolateral über den Cl<sup>-</sup>-Kanal CIC-K2 (Pinelli *et al.*, 2016; Hennings *et al.*, 2017) und einen Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter (*anion exchanger 4*; AE4; SLC4A9) ins *Interstitium* abgegeben wird. Zudem wird in Betracht gezogen, dass ein weiterer, bisher nicht identifizierter Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter in der basolateralen Membran der β-Schaltzellen existieren könnte (Chambrey *et al.*, 2013).



**Abbildung 3: A Schematische Darstellung der Transporter der α-Schaltzelle und B Schematische Darstellung der Transporter der β-Schaltzelle. A** Die α-Schaltzelle sezerniert über eine H<sup>+</sup>-ATPase und H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Protonen ins Tubuluslumen. In der Zelle findet unter dem katalytischen Einfluss der Carboanhydrase (CA) aus H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> die Bildung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sup>+</sup> statt. Basolateral erfolgt die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Abgabe ins *Interstitium* über den Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter AE1. **B** Der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter Pendrin vermittelt die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion und Cl<sup>-</sup>-Resorption auf der luminalen Seite der β-Schaltzelle, wohingegen der Na<sup>+</sup>-getriebene Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter NDCBE die Na<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Aufnahme gewährleistet. Durch die gemeinsame Aktivität dieser Transporter werden Cl<sup>-</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> somit über die apikale Membran recycelt. Es wird vermutet, dass Na<sup>+</sup> auf der basolateralen Seite über den Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter AE4 ins *Interstitium* gelangt. Cl<sup>-</sup> wird über den Cl<sup>-</sup>-Kanal CIC-K2 abgegeben. Alle Transporter werden indirekt durch die H<sup>+</sup>-ATPase betrieben (modifiziert nach Eladari *et al.*, 2014).

### 1.2.2.1 Pendrin (SIC26A4) und Pendred Syndrome

Neben der Lokalisation von Pendrin in der Niere ist der Transporter im Innenohr und in der Schilddrüse exprimiert (Royaux *et al.*, 2000; Wall *et al.*, 2003). Im Innenohr fungiert Pendrin ebenso als Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter und ist für die Zusammensetzung und das elektrische Potential der Endolymphe essentiell. In der Schilddrüse vermittelt Pendrin laut funktionellen Studien den Jod-Efflux (Wemeau & Kopp, 2017). Das Vorkommen von Pendrin in den unterschiedlichen Geweben geht mit den beim Pendred-Syndrom beobachteten Symptomen einher. Es handelt sich dabei um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die 1896 vom britischen Arzt Vaughan Pendred (1869-1946) erstmals beschrieben wurde. Im Jahr 1997 wurde eine Mutation im Pendrin-Gen als Ursache für die Erkrankung identifiziert (Everett *et al.*, 1997). Das Pendred-Syndrom ist durch eine angeborene Schwerhörigkeit und meist einem Struma der Schilddrüse charakterisiert (Royaux *et al.*, 2000; Wemeau & Kopp, 2017). Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit Pendred-Syndrom unter normalen metabolischen Bedingungen, trotz Vorkommen von Pendrin in der Niere, keine Störung der Säure-Basen-Homöostase und Elektrolyt- und Volumenbalance. Dies konnte auch bei Mäusen festgestellt werden, bei denen eine Pendrin-Gendefizienz herbeigeführt wurde

(Royaux *et al.*, 2001; Wall *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen im Mausmodell ist, dass Pendrin nur unter bestimmten Bedingungen aktiviert wird. In einer Vielzahl von Studien am Tier wurde daher untersucht unter welchen veränderten Bedingungen des Säure-Basen- sowie Elektrolyt- und Volumenhaushalts Pendrin an Bedeutung erlangt.

Pendrin wird bei einem Anstieg des pH-Wertes im Blut (metabolische Alkalose) vermehrt bzw. bei einem Abfall des Blut-pH-Wertes (metabolische Azidose) vermindert aktiviert. Dies belegten Studien, in welchen Mäuse oder Ratten entweder eine orale Säurebelastung mit Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) oder eine Basenbelastung mit Natriumbicarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) erhielten. In den CNTs und CCDs wurde infolge der NH<sub>4</sub>Cl-Gabe eine reduzierte Expression von Pendrin festgestellt (Wagner *et al.*, 2002; Frische *et al.*, 2003; Quentin *et al.*, 2004; Hafner *et al.*, 2008). Demgegenüber führte die Gabe von NaHCO<sub>3</sub> zu einer erhöhten Proteinmenge (Frische *et al.*, 2003). Diese Veränderungen der Pendrin-Expression deckten sich mit früheren Studien, in denen die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion in den CCDs von NH<sub>4</sub>Cl-behandelten Tieren reduziert oder die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion infolge einer NaHCO<sub>3</sub>-Beladung erhöht war (Atkins & Burg, 1985).

Pendrin-Knockout-Modelle, in denen eine metabolische Alkalose induziert wurde, zeigten, dass Pendrin aufgrund seiner HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion wesentlich an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts beteiligt ist. Ein NaCl-Mangel führte bei Pendrin-defizienten Mäusen (Knockout-Mäuse; *Pds*<sup>-/-</sup>) zu einer metabolischen Alkalose, die bei den Kontrolltieren (Wildtyp-Mäuse; *Pds*<sup>+/+</sup>) nicht zu beobachten war. Dies sprach dafür, dass Pendrin eine unter NaCl-Mangel auftretende Alkalose durch die Sekretion von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dämpft (Wall *et al.*, 2004). Auch eine alleinige Cl<sup>-</sup>-Restriktion, bei der NaHCO<sub>3</sub> substituiert wurde, hatte bei *Pds*<sup>-/-</sup> Mäusen im Gegensatz zu den *Pds*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren eine metabolische Alkalose zur Folge (Verlander *et al.*, 2006). Nach der Behandlung mit dem Aldosteron-Analogen Desoxykortikosteronpivalat (*desoxycorticosterone pivalate*; DOCP) entwickelten *Pds*<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls eine stärkere metabolische Alkalose als deren *Pds*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere (Verlander *et al.*, 2003). Pendrin scheint somit durch das Hormon Aldosteron, welches vor allem unter NaCl-Mangel körpereigen freigesetzt wird, reguliert zu werden. Das ging auch aus einer Studie hervor, in welcher nach einer chronischen DOCP-Gabe eine 6-fach erhöhte Proteinexpression von Pendrin in den  $\beta$ -ICs festgestellt wurde (Verlander *et al.*, 2003). Weitere Versuche zeigten in den CCDs von *Pds*<sup>+/+</sup> Mäusen infolge einer DOCP-Gabe eine vermehrte Cl<sup>-</sup>-Resorption und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion (Garcia-Austt *et al.*, 1985; Star *et al.*, 1985). Diese Effekte waren bei *Pds*<sup>-/-</sup> Kontrolltieren stark reduziert (Royaux *et al.*, 2001).

Pendrin scheint aufgrund seiner renalen Aldosteron-sensitiven Cl<sup>-</sup>-Resorption auch eine Rolle bei der Regulation der Elektrolyt- und Volumenhomöostase zu spielen. Dafür spricht,

dass *Pds*<sup>-/-</sup> Mäuse infolge einer NaCl- oder alleinigen Cl<sup>-</sup>-Restriktion eine erhöhte Urinausscheidung von Cl<sup>-</sup> (Chlorurese) sowie ein höheres Urinvolumen als die Kontrolltiere zeigten. Die verminderte Fähigkeit Cl<sup>-</sup> zu konservieren hatte eine Minderung des Plasmavolumens und des Blutdrucks zur Folge (Wall *et al.*, 2004; Verlander *et al.*, 2006). Demgegenüber entwickelten Mäuse, bei denen Pendrin überexprimiert wurde oder eine DOCP-Behandlung erfolgte, eine Cl<sup>-</sup>-abhängige Hypertonie (Verlander *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 2013). Obwohl Pendrin nicht direkt einen Na<sup>+</sup>-Transport vermittelt, führte eine Pendrin-Defizienz während einer NaCl-Restriktion auch zu einer eingeschränkten Na<sup>+</sup>-Resorption. Somit könnte die unter der NaCl-Restriktion beobachtete Hypotonie in *Pds*<sup>-/-</sup> Mäusen auch teilweise durch die verminderte Na<sup>+</sup>-Aufnahme begründet sein (Kim *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung für den renalen Na<sup>+</sup>-Verlust der *Pds*<sup>-/-</sup> Mäuse ist eine verminderte Na<sup>+</sup>-Resorption in den Hauptzellen über den epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC. Die Gabe von Aldosteron oder eine NaCl-Restriktion führte bei Wildtyp-Tieren zu einer vermehrten Expression des ENaC, wohingegen *Pds*<sup>-/-</sup> Mäuse eine verringerte Proteinmenge der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und vor allem  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC aufwiesen (Kim *et al.*, 2007; Pech *et al.*, 2010; Pech *et al.*, 2015). Zudem konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass die Na<sup>+</sup>-Resorption in den CCDs von Aldosteron-behandelten *Pds*<sup>-/-</sup> Mäusen um ca. 50 % reduziert war (Pech *et al.*, 2015). Pendrin hat also einen indirekten Einfluss auf die Häufigkeit und Funktion des ENaC trotz der Lokalisation der Transportwege in verschiedenen, jedoch benachbarten Zelltypen. Eine vermutete Erklärung dafür wurde von Pech *et al.* geliefert. Sie gehen davon aus, dass der ENaC pH-sensitiv ist und Pendrin daher teilweise durch eine luminalen Veränderung des pH-Werts oder der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration Einfluss auf den ENaC hat (Pech *et al.*, 2010). Eine andere Studie geht wiederum davon aus, dass Pendrin den ENaC über eine ATP-vermittelte Signalkaskade moduliert (Wall, 2016).

Neben der Aktivierung von Pendrin durch NaCl-/Cl<sup>-</sup>-Mangel oder Aldosteron war Pendrin auch in NCC-defizienten Mäusen vermehrt exprimiert. Die erhöhte Expression spricht möglicherweise dafür, dass Pendrin den NCC-vermittelten NaCl-Verlust, der bei NCC-defizienten Mäusen beobachtet wurde, teilweise kompensiert (Vallet *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013). Auch eine mögliche Kompensation der Pendrin-Defizienz durch eine vermehrte NCC-Aktivität wird vermutet (Kim *et al.*, 2007; Soleimani *et al.*, 2012). Pendrin soll ebenfalls durch Angiotensin II stimuliert werden (Verlander *et al.*, 2011). Dabei ist laut neuesten Erkenntnissen Aldosteron essentiell für die beobachtete Hochregulation von Pendrin unter Angiotensin II (Hirohama *et al.*, 2018).

### 1.2.2.2 NDCBE (SLC4A8) und NDCBE-Gendefizienz

Der Na<sup>+</sup>-getriebene Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter NDCBE ist auf der apikalen Seite der β-Schaltzellen lokalisiert und gehört zur SLC4-Transporterfamilie (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter), welche aus zehn Mitgliedern besteht. Neun der Mitglieder sind HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transporter bestehend aus drei Na<sup>+</sup>-unabhängigen Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiportern (AE1, AE2 und AE3), fünf Na<sup>+</sup>-gekoppelten HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transportern (NBCe1, NBCe2, NBCn1, NBCn2 sowie NDCBE) und aus dem AE4 (Liu *et al.*, 2015). Der NDCBE arbeitet elektroneutral und nimmt ein Na<sup>+</sup>-Ion und zwei HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen in die Zelle auf und entlässt ein intrazelluläres Cl<sup>-</sup>-Ionen ins Tubuluslumen (Parker *et al.*, 2008). Durch die Zusammenarbeit von NDCBE und Pendrin wird eine Thiazid-sensitive elektroneutrale NaCl-Resorption in den β-Schaltzellen des CCDs im Nephron vermittelt (Leviel *et al.*, 2010).

Der NDCBE scheint ebenso wie Pendrin infolge einer NaCl-Restriktion oder DOCP-Gabe aktiviert zu werden. Dafür sprachen Versuche von Sinning *et al.*, welche in Western Blot Analysen eine erhöhte Proteinexpression des NDCBE in Wildtyp-Mäusen unter einer NaCl-freien Diät bzw. DOCP-Gabe zeigten (Sinning *et al.*, 2017). Während bei *Pds*<sup>-/-</sup> Mäusen unter NaCl-Mangel eine deutliche Störung im Volumen- und Säure-Basen-Haushalt beobachtet wurde, zeigten Mäuse mit einer NDCBE-Gendefizienz (*Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäuse) keine gestörte Säure-Basen-Homöostase und nur eine milde Störung der Na<sup>+</sup>- und Volumenbalance. Nach einer 7-tägigen NaCl-freien Diät wurde keine Veränderung des pH-Werts, des Partialdrucks von CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>), der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Plasmakonzentration sowie des Hämatokrits und des Blutdrucks festgestellt. Ursächlich für diesen milden Effekt scheint eine erhöhte Aktivität des Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters NCC zu sein, sodass die NDCBE-Gendefizienz weitgehend kompensiert wurde. Die erhöhte Aktivität des NCC wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen gezeigt, da die *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Ndcbe*<sup>+/+</sup>) eine signifikant erhöhte Expression des NCC und seiner phosphorylierten und somit aktivierten Form (pNCC) aufwiesen. Zudem induzierte die subkutane Injektion von HCTZ, einem Blocker des NCC, unter einer NaCl-freien Diät in der *Ndcbe*<sup>-/-</sup>-Gruppe eine stärkere Natriuresis als in der *Ndcbe*<sup>+/+</sup>-Gruppe (Sinning *et al.*, 2017). Übereinstimmend mit der Annahme, dass eine erhöhte Na<sup>+</sup>-Resorption über den NCC den Verlust des NDCBE kompensiert, zeigten Mäuse mit einem gleichzeitigen Knockout des NDCBE und NCC einen schweren Volumenverlust unter einer NaCl-freien Diät (Sinning *et al.*, 2017). Demgegenüber lieferten andere Mausstudien Hinweise darauf, dass ein Verlust des NCC durch eine erhöhte NaCl-Resorption über das Pendrin/NDCBE-Transportsystem sowie den epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC kompensiert wird (Vallet *et al.*, 2006; Leviel *et al.*, 2010).

### 1.2.2.3 AE4 (SLC4A9)

Der AE4 gehört wie der NDCBE ebenfalls zur SLC4-Transporterfamilie ( $\text{HCO}_3^-$ -Transporter) (Liu *et al.*, 2015). Bislang erfolgte noch keine gute Charakterisierung der Transporteigenschaften des AE4 und seine  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit ist umstritten. Die Genstruktur ist den  $\text{Na}^+$ -gekoppelten  $\text{HCO}_3^-$ -Transportern NBCe1 (SLC4A4) und NBCe2 (SLC4A5) ähnlicher als den  $\text{Na}^+$ -unabhängigen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiportern AE1, AE2 und AE3 (Parker *et al.*, 2013). *In-vitro*-Untersuchungen an tierischen Zellen (von Ratten, Kaninchen oder Mäusen) lieferten Hinweise darauf, dass der AE4 ein  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter ist (Tsuganezawa *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Der humane AE4 soll jedoch eher einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transport als einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiport vermitteln (Parker *et al.*, 2002). Bislang konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften des AE4 tatsächlich auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen sind. Da für die *In-vitro*-Untersuchungen unterschiedliche Expressionssysteme gewählt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gegensätzlichen Befunde dadurch herbeigeführt wurden. In der Niere ist der AE4 fast ausschließlich in den  $\beta$ -Schaltzellen des distalen Nephrons exprimiert (Hentschke *et al.*, 2009). Da die Zusammenarbeit von Pendrin und NDCBE in den  $\beta$ -ICs eine intrazelluläre Akkumulation von  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  herbeiführt, wurde von Chambrey und seinen Kollegen vorgeschlagen, dass die beiden Ionen  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  mit Hilfe des AE4-Cotransporters basolateral ins *Interstitium* abgegeben werden. Daher führten sie *In-vitro*-Versuche an isolierten mikroperfundierten CCDs von Wildtyp-Mäusen (*Ae4<sup>+/+</sup>* bzw. *Slc4a9<sup>+/+</sup>*) und AE4-gendefizienten Mäusen (*Ae4<sup>-/-</sup>* bzw. *Slc4a9<sup>-/-</sup>*) durch und untersuchten den Effekt einer peritubulären Entfernung oder Zugabe von  $\text{Na}^+$  im Lösungsbad auf den intrazellulären pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ). Die  $\text{Na}^+$ -Entfernung führte bei den CCDs der *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere zu einer Ansäuerung in der Zelle, die bei erneuter  $\text{Na}^+$ -Zugabe reversibel war. Die  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{pH}_i$ -Änderungen konnten nach der Perfusion mit einer  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freien Lösung nicht beobachtet werden. In den CCDs von *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen waren die  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{pH}_i$ -Änderungen sehr verringert, unabhängig davon, ob  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  in der Lösung waren oder nicht. Aus diesen Experimenten schloss die Forschergruppe, dass der  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{HCO}_3^-$ -Fluss scheinbar vom AE4 vermittelt wird. Des Weiteren zeigten die CCDs der *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere eine Amilorid-resistente NaCl-Resorption, die auf die Aktivität von Pendrin und NDCBE zurückgeführt wurde. Diese Amilorid-resistente NaCl-Resorption war in den CCDs der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse nicht zu beobachten und entsprach dem Effekt, der bei CCDs von *Ndcbe<sup>-/-</sup>* Mäusen ebenfalls gezeigt wurde. Diese Ergebnisse bekräftigten die Annahme, dass der AE4 für die  $\text{Na}^+$ -Resorption über Pendrin/NDCBE von Bedeutung ist und dass es sich beim AE4 um einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transporter handelt. Chambrey und seine Kollegen schlossen aber nicht aus, dass

ein weiterer  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter in der basolateralen Membran der  $\beta$ -Schaltzellen existieren könnte (Chambrey *et al.*, 2013). Pena-Münzenmayer *et al.* fanden wiederum bei ihren Versuchen heraus, dass der AE4 in den Azinuszellen der Speicheldrüse von Mäusen ein elektroneutraler Kationen-abhängiger  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter ist (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2016). Obwohl die Transporteigenschaften des AE4 bislang nicht eindeutig geklärt werden konnten, ist der renale AE4 laut aktueller Literatur als  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter anerkannt.

### 1.3 Hormonelle Regulation der NaCl-Resorption und Volumenhomöostase

Ein wichtiges Hormonsystem zur Steuerung der NaCl-Resorption und somit der Volumenhomöostase und des Blutdrucks ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Das RAAS wird durch die Freisetzung des Enzyms Renin aus den epitheloiden Myozyten des juxtaglomerulären Apparats der Niere aktiviert. Zur Reninausschüttung kommt es bei Aktivierung des Sympathikus über die Stimulation von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren (Karlberg, 1983; Hackenthal *et al.*, 1990). Auch ein Abfall des mittleren Blutdrucks in dem zum *Glomerulum* zuführenden Gefäß (*Vas afferens*), z.B. infolge eines starken Mangels an zirkulierendem Blutvolumen (Hypovolämie) oder einer Nierenarterienstenose, aktiviert das RAAS. Ein weiterer Stimulus ist eine verminderte Konzentration an NaCl im distalen Tubulus des Nephrons, die von den sogenannten *Macula densa*-Zellen des juxtaglomerulären Apparates registriert wird (Kurtz, 2012). Das proteolytisch wirkende Enzym Renin gelangt nach seiner Freisetzung in den systemischen Kreislauf und spaltet dort von Angiotensinogen, welches in der Leber produziert wird, Angiotensin I ab. Aus diesem wird durch die hydrolytische Wirkung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), welches vor allem in den Gefäßendothelzellen der Lunge vorkommt, wiederum Angiotensin II gebildet. Angiotensin II hat Effekte auf verschiedene Organe, wie z.B. auf das Gefäßsystem und das Gehirn sowie auf die Niere und die Nebennierenrinde, und wirkt über spezifische Angiotensin-Rezeptoren. Vor allem von Relevanz sind die G-Protein gekoppelten  $\text{AT}_1$ - und  $\text{AT}_2$ -Rezeptoren (de Gasparo *et al.*, 2000). Über die Bindung von Angiotensin II an  $\text{AT}_1$ -Rezeptoren wird eine Second-Messenger-Kaskade ausgelöst. In dessen Folge kommt es zur Vasokonstriktion, was für einen mittelfristigen Blutdruckanstieg sorgt. Der langfristige Blutdruckanstieg mittels Angiotensin II wird unter anderem durch die Steigerung des Durstgefühls im Hypothalamus und durch die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH bzw. Vasopressin) über die Neurohypophyse ins Blut bewirkt. ADH bedingt im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr der Niere durch die Bindung an Vasopressinrezeptoren vom Typ 2 ( $\text{V}_2$ -Rezeptoren) den Einbau von Aquaporinen, was die Wasserrückresorption fördert. Im proximalen Tubulus des Nephrons bewirkt Angiotensin II eine Aktivierung des

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters NHE3 sowie des Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporters NBCe1 und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, was zu einer vermehrten Rückresorption von Na<sup>+</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> führt (Schuster *et al.*, 1984; Geibel *et al.*, 1990). Im distalen Tubulus wird zudem der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter NCC (van der Lubbe *et al.*, 2012) und vermutlich der epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC (Peti-Peterdi *et al.*, 2002) sowie die H<sup>+</sup>-ATPase der  $\alpha$ -ICs (Rothenberger *et al.*, 2007) aktiviert. Diese Mechanismen führen letztendlich zu einer erhöhten renalen Resorption von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>, was zusammen mit einer erhöhten Wasserretention zur Zunahme des Blutvolumens und damit verbunden zum Blutdruckanstieg führt. In der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde erfolgt durch Angiotensin II über AT<sub>1</sub>-Rezeptoren zudem die vermehrte Synthese und damit Freisetzung des Steroidhormons Aldosteron. Neben anderen Wirkungen ist Aldosteron wichtig für die Feinregulation der Na<sup>+</sup>-Resorption und damit für die Wasserresorption im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN). Aldosteron bindet dort an einen Mineralokortikoidrezeptor (MR) im Zytoplasma der Epithelzellen. Nach der Komplexbildung wirkt der MR als Transkriptionsfaktor und moduliert nach einer Translokation in den Zellkern die Transkription verschiedener Gene. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Aktivität des ENaC (Masilamani *et al.*, 1999; Rossier, 2014) und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Feraille *et al.*, 2003), was in einer vermehrten Resorption von NaCl resultiert und damit den Blutdruck steigert. Aldosteron aktiviert zusätzlich den K<sup>+</sup>-Kanal ROMK, wodurch mehr K<sup>+</sup> sezerniert wird (Wald, 1999), und führt ebenfalls zur Aktivierung von Pendrin (siehe 1.2.2.1).

### **1.4 Regulation des Säure-Basen-Haushalts über die Anpassung des renalen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transports und der H<sup>+</sup>-Sekretion**

Für die Aufrechterhaltung des pH-Werts im Blut ist ein geregelter HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>- und H<sup>+</sup>-Transport in der Niere essentiell. Eine Vielzahl an Prozessen reguliert die Resorption und Neusynthese von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im proximalen Tubulus. Bei einer metabolischen Azidose, z.B. aufgrund einer Diarrhö, findet unter anderem eine verstärkte intrazelluläre Metabolisierung von Glutamin in den Tubuluszellen statt, sodass vermehrt NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bzw. NH<sub>3</sub> und H<sup>+</sup>-Ionen gebildet und als NH<sub>4</sub><sup>+</sup> renal ausgeschieden werden. Verbunden mit der gesteigerten Glutamin-Metabolisierung ist eine verstärkte intrazelluläre Neusynthese von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Die anfallenden HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen werden über den ebenfalls vermehrt aktiven Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cotransporter NBCe1 basolateral ins Blut abgegeben (Curthoys & Moe, 2014; Hamm *et al.*, 2015). Auch die erhöhte Ausscheidung titrierbarer Säuren (z.B. H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) ist mit einer HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Neusynthese gekoppelt. Zusätzlich wird durch die erhöhte Aktivität des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters NHE3 die Resorption der filtrierten HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen gesteigert. Demgegenüber führt eine metabolische Alkalose, z.B. durch H<sup>+</sup>-Verlust bei Vomitus, im proximalen Tubulus unter anderem zu einer geringeren Aktivität

des NHE3. Infolge dessen wird weniger  $\text{HCO}_3^-$  resorbiert und mehr Basen renal ausgeschieden.

Auch das EZV stellt einen determinierenden Faktor für die  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption dar. Ein vermindertes EZV führt mittels Angiotensin II ebenfalls zur Aktivierung des NHE3. Aus diesem Grund kann beispielsweise ein erniedrigtes EZV mit einer metabolischen Alkalose assoziiert sein. Die erhöhte NHE3-Aktivität ermöglicht zwar bei Volumenmangel eine vermehrte Resorption von  $\text{Na}^+$  im proximalen Tubulus, jedoch werden infolge dessen auch vermehrt  $\text{H}^+$ -Ionen sezerniert. Dadurch kommt es zur erhöhten Aufnahme der filtrierten  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen. Somit führen einige regulatorische Transportprozesse entlang des Nephrons zu einer Kopplung der Elektrolyt- bzw. Volumenhomöostase mit dem Säure-Basen-Haushalt (Hamm *et al.*, 2015).

Für die Feinregulation des Säure-Basen-Haushalts sind vor allem die Schaltzellen im CNT und CD zuständig. Die Transporter der  $\alpha$ -Schaltzellen wie z.B. die  $\text{H}^+$ -ATPase und der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter AE1 werden bei einer metabolischen Azidose aktiviert (Verlander *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 2015). Dies hat eine vermehrte  $\text{H}^+$ -Sekretion und  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption zur Folge. Zudem werden über die  $\beta$ -ICs weniger  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen sezerniert. Diese Mechanismen wirken somit dem erniedrigten pH-Wert im Blut entgegen. Demgegenüber findet bei einer metabolischen Alkalose die Aktivierung der Transporter der  $\beta$ -Schaltzellen statt (Roy *et al.*, 2015), wodurch es zu einer vermehrten  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion kommt. Außerdem findet eine verminderte  $\text{H}^+$ -Sekretion über die  $\alpha$ -Schaltzellen statt. Infolge dessen wird der Verschiebung des pH-Werts in alkalische Richtung entgegengewirkt. In der Literatur wird zudem beschrieben, dass sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schaltzellen bei einer über mehrere Tage andauernden Säure-Basen-Störung ineinander umwandeln können. Folglich nimmt die Zellpopulation der  $\alpha$ -ICs bei einer chronischen metabolischen Azidose zu, wohingegen die Anzahl der  $\beta$ -ICs abnimmt. Im Gegensatz dazu führt eine chronische metabolische Alkalose zur Zunahme der Zellpopulation der  $\beta$ -ICs und einer Abnahme der  $\alpha$ -ICs, wobei die Gesamtzahl der Schaltzellen bestehen bleibt (Schwartz *et al.*, 2002).

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Lange Zeit wurde angenommen, dass die  $\text{Na}^+$ -Resorption im Verbindungstubulus und Sammelrohr des Nephrons vor allem über den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC der Hauptzellen gewährleistet wird. Die Resorption von  $\text{Cl}^-$  sollte nach dieser Annahme in dieser Region des Nephrons vor allem parazellulär erfolgen. Den  $\beta$ -Schaltzellen wurde ausschließlich die Funktion der Basensekretion ( $\text{HCO}_3^-$ -Abgabe) und somit eine Beteiligung an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts zugeschrieben. Jedoch haben neuere Ergebnisse gezeigt, dass die  $\beta$ -ICs auch an der Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  beteiligt sind und damit eine Rolle bei der Volumenhomöostase und der Regulation des Blutdrucks haben. Derzeit wird angenommen, dass die NaCl-Aufnahme auf der luminalen Seite der  $\beta$ -Schaltzellen durch die Zusammenarbeit des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters Pendrin und des  $\text{Na}^+$ -getriebenen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters NDCBE erfolgt. Zudem wird vermutet, dass der auf der basolateralen Seite lokalisierte AE4 die  $\text{Na}^+$ -Ionen im Cotransport mit  $\text{HCO}_3^-$  ins *Interstitium* entlässt. Die basolaterale  $\text{Cl}^-$ -Abgabe findet über den  $\text{Cl}^-$ -Kanal CIC-K2 statt.

Während die Funktion und Regulation der apikalen Transporter NDCBE und vor allem Pendrin schon Gegenstand vieler Forschungen waren, wurde die Funktion des renalen AE4 bislang nicht *in vivo* untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, welche Rolle der AE4 bei der Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance und der Volumenhomöostase sowie des Säure-Basen-Haushalts im lebenden Organismus hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Wildtyp-Mäuse ( $Ae4^{+/+}$  bzw.  $Slc4a9^{+/+}$ ) und AE4-gendefiziente Mäuse ( $Ae4^{-/-}$  bzw.  $Slc4a9^{-/-}$ ) unter vier verschiedenen Zuständen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts untersucht. Die Tiere erhielten einerseits ein Futter mit einem normalen Angebot an NaCl (Normaldiät; 0,3 %  $\text{Na}^+$  und 0,62 %  $\text{Cl}^-$ ) und andererseits eine sehr verminderte Zufuhr an NaCl (NaCl-Mangeldiät; 0,013 %  $\text{Na}^+$  und 0,011 %  $\text{Cl}^-$ ). Des Weiteren wurde zusätzlich zu der NaCl-Mangeldiät entweder  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zur Säurebelastung oder  $\text{NaHCO}_3$  zur Basenbelastung übers Trinkwasser verabreicht. Während der unterschiedlichen Diäten wurde unter anderem der Elektrolyt- und Säure-Basen-Status bestimmt. Zudem erfolgten Untersuchungen zur GFR und renalen Elektrolytausscheidung sowie zum Plasmavolumen und der Aktivierung des RAAS.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte, Instrumente

<b>Gerät, Instrument</b>	<b>Firma</b>
Analysewaage BP 211 D	<i>(Sartorius)</i>
Analysewaage Excellence E 2000 D	<i>(Sartorius)</i>
Analysewaage Excellence Plus XP1202S	<i>(Mettler Toledo)</i>
Blotkammer Fastblot™ B44	<i>(Biometra)</i>
Blotkammer Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	<i>(Bio-Rad)</i>
Blutgasanalysator ABL90 FLEX	<i>(Radiometer GmbH)</i>
Centrifuge 5417R	<i>(Eppendorf AG)</i>
Concentrator 5301	<i>(Eppendorf AG)</i>
Elektrolyt-Analysegerät Spotchem™ EL SE-1520	<i>(Arkray)</i>
Elektrophoresekammer Mini-Protean® Tetra-System	<i>(Bio-Rad)</i>
Gel-Gießstand mit Glasplatten (Gelkassetten) und 15-well Kämmen	<i>(Bio-Rad)</i>
GFR-Sensor mit USB-Connector und Lithium Batterie	<i>(Mannheim Pharma &amp; Diagnostics GmbH)</i>
Hämatokrit-Zentrifuge	<i>(Hettich AG)</i>
Homogenisierer mit Pilstill	<i>(Carl Roth)</i>
Inkubationsschalen	<i>(Advansta)</i>
Käfige Typ II long	<i>(Tecniplast)</i>
Magnetrührer RCT basic	<i>(IKA)</i>
Messschieber Model dialMax® ESD	<i>(Wiha Werkzeuge GmbH)</i>
Metabolische Käfige	<i>(Tecniplast)</i>
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan FC	<i>(Thermo Scientific)</i>
Multipette® Plus	<i>(Eppendorf AG)</i>
Narkosemittelverdampfer Isofluran Vet.-Med. Vapor	<i>(Dräger)</i>
pH-Meter pH 526 Multical®	<i>(WTW)</i>
Pinzette und Schere (für Organentnahme)	<i>(FST GmbH)</i>

Pipetten	(Gilson und Eppendorf AG)
Rasierapparat Model 2000AD	(Thrive®)
Reflotron® Plus	(Roche Diagnostics GmbH)
Röntgenkassette Amersham	(GE Healthcare Life Sciences)
Hypercassette™	
Schüttler ProBlot™ Rocker 25	(Labnet International)
Schwannenhalsleuchte KL 1500 LCD	(Schott)
Spannungsquelle Power Pac 200	(Bio-Rad)
Spannungsquelle Power Pack P25	(Biometra)
Spotchem™ Doppelpipette	(Arkray)
Thermoblock TB1	(Biometra)
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	(Perkin Elmer und Applied Biosystems)
Thermomixer 5436	(Eppendorf AG)
Transilluminator MiniBis Pro	(DNR Bio-Imaging Systems)
UV-Transilluminator TI 1	(Biometra)
Vortexgerät MS2 Minishaker	(IKA)
Zentrifuge Biofuge pico	(Heraeus Instruments)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Adapter für den Gebrauch von Kapillaren (clot catcher)	(Radiometer GmbH)
Amersham Hyperfilm ECL	(GE Healthcare Life Sciences)
Combitips® Plus für Multipipette	(Eppendorf AG)
Einmal-Injektionskanülen	(B. Braun Melsungen AG)
Einmalspritzen Omnifix®-F, 1 ml	(B. Braun Melsungen AG)
Elektrolytmessplättchen Spotchem™	(Arkray)
E-Plate	
Filterpapier Whatman™, 3 mm dick	(GE Healthcare Life Sciences)
Glaskapillaren (Kapillaren zur Schmelzpunktbestimmung)	(Hirschmann)
Kapillarspitzen, 200 µl	(Biozym)
Klebeband NIC-Kidney	(Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH)
Lithium-Heparin Probengefäß	(Sarstedt)
Medizinisches Pflaster (Transpore™)	(3M Deutschland GmbH)

Mikro-Hämatokrit-Kapillare	(Brand GmbH + Co KG)
Mikrotiterplatte, 96-well	(Sarstedt)
Nitrocellulose Blotting-Membran	(GE Healthcare Life Sciences)
PCR SoftTubes, 0,2 ml	(Biozym)
Pipettenspitzen	(Greiner Bio-One International GmbH und Biozym)
Reagiergefäße (Tubes), 1,5 ml und 2,0 ml	(Sarstedt und Eppendorf AG)
Reflotron <sup>®</sup> Creatinine Reagenzstreifen	(Roche Diagnostics GmbH)
Reflotron <sup>®</sup> Pipette	(Roche Diagnostics GmbH)
Rotilabo <sup>®</sup> -Abdeckfolie für Mikrottestplatten	(Roth)
Schraubröhre, 15 ml und 50 ml	(Sarstedt)
Serologische Pipetten, 10 ml und 25 ml	(Sarstedt und Falcon)
Skalpellklingen	(Bayha GmbH)
Sonderkanüle BD Microlance <sup>™</sup> 3 (30 G ½“ 0,3 x 13 mm)	(Becton Dickinson GmbH)
Spezielle Kapillaren safeCLINITUBES	(Radiometer GmbH)
Verschlusskitt	(Brand GmbH + Co KG)

### 2.1.3 Chemikalien, Substanzen

<b>Chemikalie, Substanz</b>	<b>Firma</b>
40 % Acrylamid/Bis-Lösung, 19:1	(Bio-Rad)
Amiloridhydrochloridhydrat	(Sigma-Aldrich)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	(Sigma-Aldrich)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Applichem GmbH)
Antikörper-Verdünnungslösungen (für 1. Antikörper bzw. 2. Antikörper)	(Merck)
Citronensäure Monohydrat	(Roth)
Clarity <sup>™</sup> Western ECL Substrat (Luminol-/ Verstärkerlösung und Peroxidlösung)	(Bio-Rad)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma-Aldrich)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	(Roth)
Dinukleotidtriphosphate (dNTP) (je 10 mM)	(Invitrogen)
DirectPCR <sup>®</sup> Lysis Reagent Tail	(Viagen Biotech)
DL-Dithiothreitol (DTT)	(Sigma-Aldrich)
Druckluft	(Technische und Medizinische Gas GmbH)

## Material und Methoden

---

Eisessigsäure (Eisessig), 100 %	(Merck)
Entwicklerkonzentrat GBX	(Carestream Dental)
Evans Blue	(Sigma)
Fixiererkonzentrat GBX	(Carestream Dental)
Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-Sinistrin	(Fresenius Kabi Austria GmbH)
Gelladepuffer Roti®-Load DNA (mit Glycerin), 6-fach	(Roth)
Glycin	(Roth)
Glucose Injektionslösung, 5 %	(B. Braun Melsungen AG)
Hydrochlorothiazid (HCTZ)	(Sigma-Aldrich)
Isofluran (Forene®), 100 % (v/v)	(AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG)
Isopropanol	(Merck)
Isotone Natriumchloridlösung, 0,9 %	(B. Braun Melsungen AG)
Kaliumchlorid (KCl)	(Merck)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(Roth)
Kohlenstoffdioxid-Sauerstoff-Gasgemisch (80 % CO <sub>2</sub> / 20 % O <sub>2</sub> )	(Technische und Medizinische Gas GmbH)
Kontrollserum Axon Control N/P	(Axonlab)
Kontrollserum Reflotron® Precinorm U	(Roche Diagnostics GmbH)
Magermilchpulver (MM)	(Roth)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) (50 mM)	(Invitrogen)
Maleinsäure	(Fluka)
Methanol	(J.T.Baker)
Natriumchlorid (NaCl)	(J.T.Baker)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Serva)
Natriumethyldiamintetraacetat (Na-EDTA)	(Fluka)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	(Merck)
Natronlauge (NaOH) (1 M)	(Merck)
Novex™ NuPage® Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer (4x)	(Invitrogen)
PCR Puffer (10x)	(Invitrogen)
PeqGreen	(Peqlab)
Ponceau S	(Sigma)
Proteinstandards Quick Start™ Bovines	(Bio-Rad)
Serumalbumin Standard-Set	
Quick Start Bradford 1x Dye Reagent	(Bio-Rad)

Rotiphorese® Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (10x)	(Roth)
Salzsäure (HCl) (1 M)	(Merck)
Spotchem™ Referenzlösung	(Arkray)
Sucrose	(IGN)
Süßstofftabletten (Natriumcyclamat und Saccharin-Natrium)	(Nutrisun GmbH)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(Fluka)
Triethanolamine	(Sigma-Aldrich)
Trizma® base (Tris)	(Sigma-Aldrich)
Tween® 20	(Sigma-Aldrich)
Veet Enthaarungscreme für sensible Haut	(Reckitt Benckiser Deutschland GmbH)

### 2.1.4 Hergestellte Lösungen, Puffer

Lösung, Puffer	Herstellung
Amilorid-Injektionslösung (Dosis: ca. 1,50 mg/kg Körpergewicht):	je Maus: 36,25 µg Amilorid gelöst in 250 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung, mit NaOH auf pH-Wert von ca. 7 eingestellt
Ammoniumpersulfat, 10 %:	2 g Ammoniumpersulfat in 20 ml <i>aqua dest</i> gelöst
Blockadelösung (5 % MM/PBS/Tween):	10 g Magermilchpulver in 200 ml des PBS (1x)/Tween gelöst
Blotpuffer:	11,64 g Tris, 5,86 g Glycin, 7,5 ml 10 % SDS, 200 ml Methanol, ad 2 l mit <i>aqua dest</i>
Citrat-Puffer (0,1 M):	21,014 g Citronensäure Monohydrat, ad 1 l mit <i>aqua dest</i> , mit NaOH auf pH-Wert von 6 eingestellt
DNA-Ladepuffer (1-fach):	170 µl Roti®-Load DNA, 830 µl <i>aqua dest</i>
DTT-Lösung (4 M):	1 g DTT in 1,63 ml <i>aqua dest</i> gelöst
Ladepuffer (LDS 4x + DTT):	1 ml DTT-Lösung (4 M) in 10 ml Novex™ NuPage® LDS-Probenpuffer (4x)
Entwicklerlösung:	110 ml Entwicklerkonzentrat GBX, 396 ml <i>aqua dest</i>
Evans Blue Lösung:	je Maus: 50 µg Evans Blue in 100 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst
FITC-Sinistrin-Lösung:	1 g FITC-Sinistrin in 40 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst, in 1 ml Portionen aliquotiert, bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren
Fixiererlösung:	110 ml Fixiererkonzentrat GBX, 396 ml <i>aqua dest</i>

## Material und Methoden

---

HCTZ-Injektionslösung (Dosis: 10 mg/kg Körpergewicht):	je Maus: 250 µg HCTZ gelöst in 250 µl DMSO-NaCl-Lösung (5 % DMSO und 95 % 0,9 %iger NaCl-Lösung), mit NaOH auf pH-Wert von ca. 7-8 eingestellt
Maleat-Puffer:	4,06 g Tris (33 mM), 5,80 g Maleinsäure, 2,96 g EDTA (8 mM), ad 1 l <i>aqua dest</i> , mit NaOH auf pH-Wert von 6 eingestellt
Na-EDTA Lösung (0,3 M):	635,9 mg Na-EDTA gelöst in 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, in 1 ml Portionen aliquotiert, bei 4 °C bis zur Verwendung gekühlt
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung (230 mM):	38,645 g NaHCO <sub>3</sub> gelöst in 2 l <i>aqua dest</i>
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung (280 mM):	47,046 g NaHCO <sub>3</sub> gelöst in 2 l <i>aqua dest</i>
NH <sub>4</sub> Cl-Lösung (280 mM):	29,954 g NH <sub>4</sub> Cl gelöst in 2 l <i>aqua dest</i> , 20 Süßstofftabletten
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Lösung:	0,1 M PMSF, <i>aqua dest</i>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10x):	160 g NaCl, 4 g KCl, 36,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 4,8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 2 l mit <i>aqua dest</i>
PBS (1x):	PBS (10x) mit <i>aqua dest</i> im Verhältnis von 1:10 verdünnt (100 ml PBS (10x) und 900 ml <i>aqua dest</i> )
PBS (1x)/Tween:	1 ml Tween 20 in 1 l PBS (1x)
Ponceaurot-Lösung:	0,5 g Ponceaurot, 1 ml Eisessig, ad 100 ml <i>aqua dest</i>
Sammelgelpuffer:	30,25 g Tris, 10 ml 20 % Natriumdodecylsulfat (SDS), ad 500 ml <i>aqua dest</i> , auf pH-Wert 6,8 eingestellt
SDS, 10 %:	25 g SDS, ad 250 ml mit <i>aqua dest</i>
SDS, 20 %:	50 g SDS, ad 250 ml mit <i>aqua dest</i>
SDS-Laufpuffer (10x):	60,6 g Tris, 288,0 g Glycin, 200 ml 10 % SDS, ad 2 l mit <i>aqua dest</i> , auf pH-Wert von 8,8 eingestellt
SDS-Laufpuffer (1x):	SDS-Laufpuffer (10x) mit <i>aqua dest</i> im Verhältnis von 1:10 verdünnt (100 ml SDS (10x) und 900 ml <i>aqua dest</i> )
Sucrosepuffer:	17,12 g Sucrose (250 mM), 0,3 ml Triethanolamine (10 mM), ad 200 ml <i>aqua dest</i> , mit HCl (1 M) auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt
TBE-Puffer (0,5x):	100 ml Rotiphorese® 10x TBE-Puffer, 1900 ml <i>aqua dest</i>
Trenngelpuffer:	91 g Tris, 10 ml 20 % SDS, ad 500 ml <i>aqua dest</i> , auf pH-Wert 8,8 eingestellt

### 2.1.5 DNA-, Proteinmarker

#### DNA-, Proteinmarker

DNA-Marker 1Kb Plus	<i>(Invitrogen)</i>
Proteinmarker BenchMark™	<i>(Invitrogen)</i>
Proteinmarker PageRuler™	<i>(Thermo Scientific)</i>

### 2.1.6 Enzyme, Inhibitoren

#### Enzym, Inhibitor

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>(Thermo Scientific)</i>
Phosphataseinhibitoren	<i>(Thermo Scientific)</i>
Proteinase K	<i>(Peqlab)</i>
Proteaseinhibitoren	<i>(Thermo Scientific)</i>
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	<i>(Invitrogen)</i>

### 2.1.7 Antikörper, Kits

#### Primärer Antikörper (1. Antikörper)

Actin	<i>(Sigma-Aldrich)</i>
ENaC-α/ Scnn1a	<i>(StressMarq Biosciences Inc.)</i>
ENaC-β/ Scnn1b	<i>(StressMarq Biosciences Inc.)</i>
ENaC-γ/ Scnn1g	<i>(StressMarq Biosciences Inc.)</i>
NCC	<i>(Millipore)</i>
NHE3	<i>(StressMarq Biosciences Inc.)</i>
NHE3/ SLC9A3 [p Ser552]	<i>(StressMarq Biosciences Inc.)</i>
NCC phospho Thr60 + Peptid	<i>(MRC Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit)</i>

#### Sekundärer Antikörper (2. Antikörper)

<i>goat anti-mouse IgG, (H+L), HRP</i>	<i>(Thermo Scientific)</i>
<i>goat anti-rabbit IgG</i>	<i>(DakoCytomation)</i>
<i>rabbit anti-sheep IgG, (H+L), HRP</i>	<i>(Thermo Scientific)</i>

#### Kit

Aldosteron - EIA (EIA-5298)	<i>(DRG Instruments GmbH)</i>
Angiotensin I - EIA Kit (EK-002-01)	<i>(Firma Phoenix Pharmaceuticals, Inc.)</i>

### 2.1.8 Primer

#### Primer

AE4 Knockout vorwärts (AE4-KO- *fwd*)

AE4 Wildtyp + Knockout rückwärts  
(AE4-WT+KO- *rev*)

AE4 Wildtyp vorwärts (AE4-WT- *fwd*)

#### Firma

*Eurofins MWG Operon*

*Eurofins MWG Operon*

*Eurofins MWG Operon*

### 2.1.9 Futter

#### Futter

LASQCdiet® Rod16

Spezialfutter (C 1036 natrium- und  
chlorarme Diät)

#### Firma

*(LASvendi)*

*(Altromin)*

### 2.1.10 Software

#### Software

Gel Capture (Version 7.2)

Gel Scan Software (Version 5.1)

GraphPad Prism® (Version 6.07)

Microsoft® Excel 2013

Microsoft® PowerPoint 2013

Microsoft® Word 2013

NIC-Kidney Gerätesoftware MPD Lab  
Ver. 1.0B

Skantl Software - Research Edition for  
Multiskan FC (Version 3.1)

#### Firma

*(DNR Bio-Imaging Systems)*

*(BioSciTec GmbH)*

*(GraphPad Software)*

*(Microsoft® Corporation)*

*(Microsoft® Corporation)*

*(Microsoft® Corporation)*

*(Mannheim Pharma & Diagnostics)*

*(Thermo Scientific)*

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierversuch

Die Untersuchung des AE4-Transporters bezüglich seiner physiologischen Funktion bei unterschiedlichen Zuständen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts war nur im lebenden Organismus möglich. Daher wurden für die Erstellung der Doktorarbeit explizite Fragestellungen im Mausmodell überprüft. Hierfür wurde gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) bei der Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Fachbereich Veterinärwesen, Billstraße 80, 20539 Hamburg, ein Tierversuchsantrag eingereicht, der für eine Dauer von 3 Jahren genehmigt wurde. Dieser wurde nach Antrag um ein weiteres Jahr verlängert. Die Genehmigungsnummer lautete: 91/14. Die verantwortliche Leitung des Tierversuchsvorhabens übernahm Dr. med. Anika Seniuk (Wissenschaftlerin im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Stellvertreterin war Dr. rer. nat. Helga Vitzthum, ebenfalls Wissenschaftlerin im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

#### 2.2.1.1 Verwendete Mauslinie

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere der Mauslinie AE4 Knockout (AE4-defiziente Mäuse; *Ae4<sup>-/-</sup>* bzw. *Slc4a9<sup>-/-</sup>*) mit C57bl6-Hintergrund sowie entsprechende Kontrolltiere (Wildtyp-Mäuse; *Ae4<sup>+/+</sup>* bzw. *Slc4a9<sup>+/+</sup>*) mit einem Körpergewicht von ca. 20-30 g verwendet. Bei den Tieren handelte es sich um Wurfgeschwister 1. und 2. Grades. Die Zucht wurde mit Mäusen, die aus Jena (von Prof. Dr. med. Christian Hübner, Instituts für Humangenetik, Universität Jena) importiert wurden, in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf etabliert. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in die Haltung des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie überführt. Zum Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 8 bis 21 Wochen alt. Die hohen Altersunterschiede ergaben sich daraus, dass zur Reduzierung der Tierzahl manche Tiere für 2-3 Versuchsabläufe verwendet wurden. In diesem Fall wurde zwischen den Versuchen eine Versuchspause von 2-4 Wochen eingehalten. Die Mäuse waren gesund und es waren durch den genetischen Knockout keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten zu beobachten.

#### 2.2.1.2 Haltung und Mausvisiten

Die Mäuse wurden bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in den klimatisierten Tierversuchsräumen am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie gehalten. Die Luftfeuchtigkeit (45-65 %) und Temperatur (20-24 °C) wurden elektronisch überwacht. Die Tiere lebten in offener Einzelhaltung in Typ II long Käfigen, in welchen sich Holzgranulat-

Einstreu und Enrichment wie Häuschen und Zellstoff als Nistmaterial befand. Wasser und Futter erhielten die Versuchstiere *ad libitum*. Das Raumklima, die Futter- und Wasserversorgung sowie der Allgemeinzustand der Mäuse wurden täglich kontrolliert. Vor Versuchsbeginn und während des Versuchsverlaufs wurden alle Tiere regelmäßig gewogen und der Gesundheits- und Pflegezustand sowie das Verhalten inspiziert.

### 2.2.1.3 Diätfutter

#### Normaldiät

Die Tiere erhielten uneingeschränkten Zugang zu einem bestrahlten und zertifizierten Nagerfutter für Zucht und Haltung von Mäusen und Ratten (LASQCdiet® Rod16) von der Firma *LASvendi*, welches 0,3 % Na<sup>+</sup> und 0,62 % Cl<sup>-</sup> pro kg Futter beinhaltet.

#### NaCl-Mangeldiät

Die Mäuse erhielten über eine Dauer von 10-11 Tagen ein natrium- und chlorarmes Spezialfutter (C 1036 natrium- und chlorarme Diät) von Altromin als Diät zur freien Verfügung. Dieses beinhaltet nur 0,013 % Na<sup>+</sup> und 0,011 % Cl<sup>-</sup> pro kg Futter.

#### NaCl-Mangeldiät mit NH<sub>4</sub>Cl im Trinkwasser (=Na<sup>+</sup>-Mangeldiät mit Säurebelastung)

Die Tiere bekamen über einen Zeitraum von 7 Tagen das natrium- und chlorarme Spezialfutter der Firma *Altromin* (C 1036) und zusätzlich übers Trinkwasser NH<sub>4</sub>Cl mit einer Konzentration von 280 mM zur freien Verfügung.

#### NaCl-Mangeldiät mit NaHCO<sub>3</sub> im Trinkwasser (=Cl<sup>-</sup>-Mangeldiät mit Basenbelastung)

In dieser Versuchsgruppe erhielten die Mäuse für 7 Tage *ad libitum* das zuvor erwähnte natrium- und chlorarme Spezialfutter der Firma *Altromin* (C 1036) und zusätzlich übers Trinkwasser NaHCO<sub>3</sub> (230 mM oder 280 mM).

### 2.2.1.4 Narkose und Euthanasie

Zur Einleitung von Narkosen wurden die Mäuse in eine Narkosekammer (Eigenbau) überführt. Diese wurde mit einem Gemisch aus 3-4 % Isofluran und Druckluft begast. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte anschließend bei 2,5-3 % Isofluran mit Hilfe einer Narkosemaske (Eigenbau). Die Narkosetiefe wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft, der bei tiefer Narkose nicht mehr vorhanden sein sollte.

Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils am Versuchsende in tiefer Isofluran-Narkose ohne zwischenzeitliches Wiedererwachen durch zervikale Dislokation. Beim Auftreten von den im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien, wie z.B. einer Abnahme des Körper-

gewichts von mehr als 20 %, deutlich eingeschränkter Wasser- und Nahrungsaufnahme sowie auffälligem Verhalten, wurden die Mäuse ebenfalls in tiefer inhalativer Narkose durch zervikale Dislokation euthanasiert.

### **2.2.2 Genotypisierung**

Zur Überprüfung des richtigen genetischen Hintergrundes wurde den Versuchstieren kurz nach der Geburt sowie am Versuchsende eine Ohr- oder Schwanzgewebeprobe entnommen und durch die medizinisch-technische Assistentin Frau Margrit Hölzel am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie genotypisiert. Dies erfolgte mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die der Vervielfältigung der spezifischen in den AE4 Tieren veränderten

DNA-Sequenzen *in vitro* diente, sowie einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese. Die Auswahl der geeigneten Mäuse für die Versuche erfolgte anhand der ersten Genotypisierung, die kurz nach der Geburt durchgeführt wurde. Um Verwechslungen bei der Zucht oder im Versuchsverlauf aufzudecken, wurde zudem eine zweite Überprüfung des Genotyps am Versuchsende durchgeführt. Bei einer Abweichung vom ursprünglich bestimmten Genotyp wurden homozygote Tiere entsprechend einer anderen Gruppe zugeordnet und heterozygote Tiere bei der Versuchsauswertung nicht berücksichtigt.

#### **2.2.2.1 Lysierung der Ohrproben**

Zur Lysierung wurde jede Gewebeprobe in Lysepuffer (DirectPCR® Lysis Reagent Tail) und Proteinase K für 3-16 h bei 55 °C inkubiert und geschüttelt. Die hinzugefügte Proteinase K diente dem Abbau von Proteinen und der Freisetzung von Nukleinsäuren. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase durch Inkubation bei 85 °C für 45 min auf einem Schüttler. Nach dem Abkühlen der Proben auf 4 °C wurden die Lysate zentrifugiert und je 1 µl für die nachfolgende PCR eingesetzt.

### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde folgender Standardansatz hergestellt:

**Tabelle 1: Substanzen für Standardansatz**

Substanz	Volumen in $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer (enthält 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)	2,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 $\mu\text{l}$
dNTP (je 10 mM)	0,6 $\mu\text{l}$
Primer AE4-WT- <i>fwd</i> oder AE4-KO- <i>fwd</i> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Primer AE4-WT+KO- <i>rev</i> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$
<i>aqua dest</i>	ad 19,0 $\mu\text{l}$

Die eingesetzten Primer hatten folgende Sequenzen:

**Tabelle 2: Sequenzen der eingesetzten Primer**

Primer	Sequenz (5' → 3')
AE4-KO- <i>fwd</i>	CTA AAG CGC ATG CTC CAG ACT GCC
AE4-WT+KO- <i>rev</i>	TGG TAG CTC CTT CCC AGG GTG GGA
AE4-WT- <i>fwd</i>	GGG CAG AGG AGA GAG GGA GTG

Anschließend wurden pro Probe je 1  $\mu\text{l}$  DNA-Lysat und 19  $\mu\text{l}$  Standardansatz für die PCR verwendet. Diese erfolgte im Thermocycler GeneAmp PCR System 9700 und fand in 40 Zyklen statt.

**Tabelle 3: Phasen der PCR**

Phase	Temperatur in °C	Dauer in s	
Initiale Denaturierung	94	300	
Denaturierung	94	30	40 Zyklen
Hybridisierung	61	60	
Elongation	72	120	
Abschließende Elongation	72	420	

Nach der PCR wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und bis zur Analyse durch die Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert.

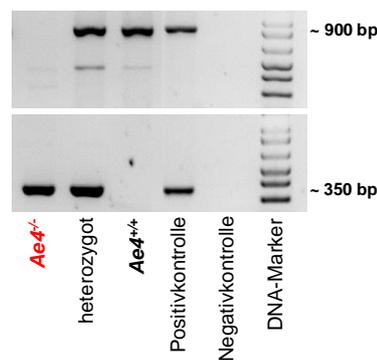
### 2.2.2.3 Gelelektrophorese

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem ca. 1,5 %igen Agarosegel mit 0,5x TBE (Herstellung siehe 2.1.4) als Laufpuffer. Die 20 µl Ansätze wurden mit je 5 µl DNA-Ladepuffer (1-fach) versetzt. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Gel mit dem DNA-Farbstoff PeqGreen angefärbt. Bei der anschließenden Auftrennung wurde eine konstante Spannung von 110 V für ca. 45 min angelegt. Nach erfolgter Trennung wurde die angefärbte DNA unter dem UV-Transilluminator TI 1 sichtbar gemacht und zur Ergebnisdokumentation mit einer Kamera fotografiert (Abbildung 4). Die Laufweite der Banden wurde mit den Standardbanden eines eingesetzten DNA-Markers verglichen. Somit ließ sich der Genotyp der jeweiligen Maus ermitteln (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Länge des amplifizierten Genabschnitts verschiedener Genotypen**

Genotyp	Länge des amplifizierten Genabschnitts
Wildtyp (homozygot)	900 Basenpaare (bp)
Wildtyp + Knockout (heterozygot)	900 bp und 350 bp
Knockout (homozygot)	350 bp

Um etwaige Fehler der Methodik zu identifizieren, wurden bei jeder PCR und anschließenden Gelelektrophorese neben den DNA-Proben eine Positivkontrolle (DNA-Lysat eines heterozygoten Tieres) sowie eine Negativkontrolle (Standardansatz mit 1 µl *aqua dest*) eingesetzt.



**Abbildung 4: Beispiel eines Agarosegels.** Das Gel zeigt die 350 bp-Bande einer Knockout-Maus ( $A\epsilon 4^{-/-}$ ) und die 900 bp-Bande einer Wildtyp-Maus ( $A\epsilon 4^{+/+}$ ).

### 2.2.3 Uringewinnung durch metabolischen Käfig und Blasenpunktion sowie Urinmessungen

Der metabolische Käfig (Abbildung 5) dient aufgrund seines speziellen Aufbaus zur getrennten Sammlung von Urin und Kot über einen festgelegten Zeitraum. Anschließende Messungen der Elektrolyt- und Kreatininkonzentrationen im Urin liefern Hinweise über die renale  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung.



Abbildung 5: Metabolischer Käfig

Um eine möglicherweise unterschiedliche Anpassungsfähigkeit zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen an einen Diätwechsel aufzuzeigen, wurden Untersuchungen zum Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät sowie vom Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere für jeweils 4 h vor und 20 h nach dem Diätwechsel in den metabolischen Käfig gesetzt. Die Tiere hatten dabei Zugang zu Wasser, aber keinen zu Futter. Dies diente der Vermeidung von Futtermitteln im Urin und somit der Vermeidung einer fehlerhaften Elektrolytkonzentrationsbestimmung im Urin. Zudem wurde im Rahmen der Organentnahme unter der NaCl-Mangeldiät (10. Tag) sowie der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  (7. Tag) eine Blasenpunktion durchgeführt. Hierfür wurde das Abdomen der Mäuse im Bereich der Harnblase eröffnet, die Blase abgeklemmt und mit Hilfe einer Einmalspritze mit Kanüle der Urin entnommen.

Wie aus der Literatur bekannt ist, weist die renale  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung einen circadianen Rhythmus auf: In der Dunkelphase und somit Aktivitätsphase der Tiere wird mehr  $\text{Na}^+$  über den Urin ausgeschieden. Um mögliche Unterschiede der  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung zwischen den

Genotypen besser sichtbar zu machen, wurde der Urin beim Diätwechsel und der Blasenpunktion daher in der Dunkelphase der Tiere gesammelt. Der Urin wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob andere Transportwege ( $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter NCC und epithelialer  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC) des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons während der NaCl-Mangeldiät vermehrt exprimiert oder aktiviert waren, um die Defizienz des AE4 zu kompensieren. Diese funktionellen Tests erfolgten durch Blockade der Transportwege mittels Diuretika.

Hierfür wurde den Mäusen am Ende der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät (siehe 2.2.1.3) unmittelbar vor dem Aufenthalt im metabolischen Käfig unter Isofluran-Narkose einmalig entweder das Diuretikum Hydrochlorothiazid (HCTZ) oder Amilorid injiziert. Anschließend wurden die Tiere für ca. 4 h in den metabolischen Käfig gesetzt. Dabei hatten die Mäuse Zugang zu Wasser, aber keinen zu Futter. Einen Tag vor der Diuretikagabe (am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät) erhielten die Mäuse jeweils eine Sham-Injektion (0,9 %ige NaCl-Lösung bzw. 5 %ige DMSO-NaCl-Lösung) mit anschließendem 4-stündigen Aufenthalt im metabolischen Käfig. Aufgrund dieser Vorgehensweise konnte der akute Effekt des Diuretikums mit einer vorherigen Sham-Injektion verglichen werden.

Bei HCTZ handelt es sich um einen Blocker des  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters NCC. Die mittlere Dosierung betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Mäusen  $10,00 \pm 0,04\text{ mg/kg}$  und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $10,00 \pm 0,05\text{ mg/kg}$  Körpergewicht. Das Diuretikum wurde subkutan (s.c.) appliziert, wobei sich das Injektionsvolumen auf 0,25 ml belief. Da das HCTZ schwer löslich war, wurde der Injektionslösung neben 0,9 %iger NaCl-Lösung das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt (Herstellung siehe 2.1.4).

Amilorid ist ein Blocker des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals ENaC. Die mittlere Dosis betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren  $1,50 \pm 0,06\text{ mg/kg}$  und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $1,53 \pm 0,03\text{ mg/kg}$  Körpergewicht. Dafür wurde das Amilorid in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und den Mäusen letztendlich ein Volumen von 0,25 ml s.c. verabreicht.

### 2.2.3.1 Elektrolytmessung im Urin

Die Konzentrationen der in der Urinprobe enthaltenen Elektrolyte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  wurden mit Hilfe des Elektrolyt-Analysegerätes Spotchem™ EL SE-1520 bestimmt. Zu Anfang wurde das Gerät mit einer Magnetkarte für die passende Chargennummer der verwendeten Elektrolytmessplättchen (Spotchem™ E-Plate) kalibriert. Zur Qualitätskontrolle des Messgerätes erfolgte die Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen eines Kontrollserums (Axon Control N/P). Diese Kontrolle wurde auch während und am Ende der Messungen wiederholt.

Die Urinproben wurden für die Messung mit *aqua dest* verdünnt (je nach Diät der Tiere und Diuretikagabe im Verhältnis von 1:2 bis 1:16). Da die  $\text{Na}^+$ -Werte bei einzelnen Urinproben nach der Verdünnung mit dem Analysegerät nicht messbar waren, wurden diese Proben unverdünnt eingesetzt. Problematisch war die Analyse der  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen nach Diätwechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät. Hier waren in den Urinproben auch unverdünnt keine Werte für  $\text{Na}^+$  vom 1. Tag der NaCl-Mangeldiät messbar, sodass der Urin aufkonzentriert werden musste. Dafür wurden 100  $\mu\text{l}$  der Urinproben im Concentrator 5301 für 1,5 h eingedampft. Anschließend wurde der Urin in 25  $\mu\text{l}$  *aqua dest* gelöst und zur Elektrolytmessung verwendet.

Die Messung erfolgte nach Bedienungsanleitung des Geräteherstellers: 22  $\mu\text{l}$  des verdünnten bzw. unverdünnten Urins und 22  $\mu\text{l}$  der Referenzlösung wurden gleichzeitig mit der Spotchem™ Doppelpipette auf den dafür vorgesehenen Bereich des Elektrolytmessplättchens pipettiert. Das Gerät zog die e-Plate nach Entfernen der Pipette ein und gab nach einer Minute die Konzentration für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in der Einheit mmol/l an.

### **2.2.3.2 Kreatininmessung im Urin**

Die Konzentration des in der Urinprobe enthaltenen Kreatinins wurde mit Hilfe des Messgerätes Reflotron® Plus bestimmt. Dieses Gerät dient der quantitativen Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern mit Teststreifen (Reagenzstreifen). Es basiert auf dem Prinzip der Reflektionsphotometrie. Die Urinproben wurden vor der Messung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt (je nach Diät der Tiere und Diuretikagabe im Verhältnis von 1:8 bis 1:16). Zudem erfolgte zur Kontrolle des Gerätes die Bestimmung der Kreatininkonzentration eines Kontrollserums (Precinorm U). Diese Kontrolle wurde auch während und am Ende der Messungen wiederholt.

Die Messung erfolgte nach Bedienungsanleitung des Geräteherstellers: Genau 32  $\mu\text{l}$  des verdünnten Urins wurden auf die Auftragszone eines Kreatinin-Teststreifens pipettiert. Anschließend wurde der Reagenzstreifen in die Messkammer des Gerätes eingelegt. Auf dem Teststreifen lief nun eine Farbreaktion ab. Die Konzentration des Farbstoffes wurde von dem Messgerät bei 642 nm photometrisch gemessen. Kurz darauf konnte die Konzentration des Kreatinins am Gerät in der Einheit  $\mu\text{mol/l}$  abgelesen werden.

#### **2.2.4 Transkutane Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mittels FITC-Sinistrin**

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist der wichtigste Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion. Sie kann zur Berechnung der filtrierten Menge eines Stoffes genutzt werden. Durch die Multiplikation der GFR mit der Plasmakonzentration eines frei filtrierbaren Stoffes lässt sich die filtrierte Menge des Stoffes pro Zeit (in g pro Tag) errechnen. Zur Bestimmung der GFR wurde das von der Firma *Mannheim Pharma & Diagnostics* entwickelte *non-invasive clearance (NIC)-kidney* Verfahren herangezogen. Die verwendete Messeinheit besteht aus einem Lithium-Ionen Akku und einem Sensor, der mit zwei LEDs (470 nm) und einer Photodiode (525 nm) ausgestattet ist. Dieser an der Flanke der wachen Maus angebrachte Sensor misst den zuvor retrobulbär intravenös applizierten Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-Sinistrin photometrisch transkutan und liefert somit Daten über die Ausscheidungsdynamik des Farbstoffs. FITC-Sinistrin wird in der Niere frei filtriert und im Tubulussystem weder resorbiert noch sezerniert. Die Halbwertszeit (HWZ) des Farbstoffs dient anschließend als Grundlage für die Berechnung der GFR.

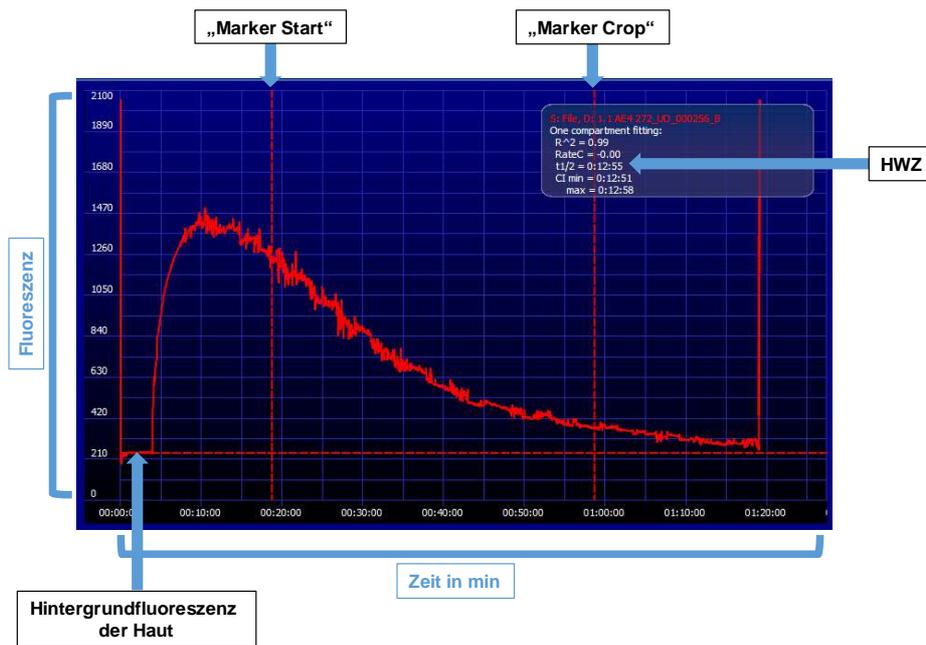
Vor der GFR-Messung, welche jeweils am 7. oder 8. Tag der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät und am 6. Tag der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> (siehe 2.2.1.3) erfolgte, wurden die Mäuse in kurzer inhalativer Anästhesie (Isofluran 2,5-3 %) an einer der Flanken auf einer ca. 1,5 cm x 2 cm großen Fläche rasiert (Rasierapparat Model 2000AD). Die verbliebenen Haare wurden mit Veet Enthaarungscreme für sensible Haut beseitigt (Abbildung 6 links). Anschließend wurden der Sensor und der Akku miteinander verbunden, sodass die Messeinheit einsatzbereit war. Zur Fixierung des Akkus auf dem Sensor diente ein kleiner beidseitiger Klebestreifen. Dann wurde die Apparatur mit Hilfe eines speziellen doppelseitigen Klebestreifens vom Hersteller auf die enthaarte Stelle der Maus geklebt. Zum besseren Halt und Schutz der feinen Kabel wurde medizinisches Pflaster (Transpore™) zirkulär um die Maus mitsamt der Messeinheit angelegt (Abbildung 6 rechts).



**Abbildung 6: Vorbereitung GFR-Messung.** Narkotisierte, rechtsseitig rasierte Maus sowie GFR-Sensor und Akku (links). An der narkotisierten Maus mit Klebeband fixierte GFR-Messapparatur (rechts).

Anschließend wurde die Maus zur Messung des Hintergrundsignals der Haut für ca. 2-3 min nicht bewegt. Dieser Schritt war für die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz essentiell. Nach Überprüfung der tiefen Narkose wurde die FITC-Sinistrin-Lösung gewichtsadaptiert ( $3,33 \mu\text{l/g}$  Körpergewicht) mit einer Mikrokanüle (30 G  $\frac{1}{2}$ " 0,3 x 13 mm) langsam in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Nach erfolgreicher Applikation wurde das Tier zum Aufwachen und zur weiteren Fluoreszenz-Messung in seinen Käfig zurückgesetzt. Damit das Tier mit der Messeinheit nicht am Enrichment hängenbleiben konnte, wurde dieses zuvor aus dem Käfig entfernt. Die Maus hatte freien Zugang zu Wasser und Futter. Zur Reduktion der Stresseinwirkung auf die Maus während der mindestens 60-minütigen Messung wurde der Käfig nun in einen ruhigen Raum mit normalen Umgebungsbedingungen gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde dem Tier in erneuter inhalativer Narkose die Apparatur entfernt und die Messung durch Trennung der Verbindung zwischen Akku und Sensor beendet. Die Maus wurde wieder in ihren mit Enrichment ausgestatteten Käfig gesetzt.

Die Datenauswertung der Messung erfolgte am Computer. Hierfür wurde der Sensor per USB-Kabel mit dem PC verbunden und die Daten mit der NIC-Kidney Gerätesoftware MPD Lab Ver. 1.0B (*Mannheim Pharma & Diagnostics*) ausgelesen. Die anschließend angezeigte Fluoreszenz-/Zeit-Kurve entsprach der Ausscheidungsdynamik von FITC-Sinistrin (Abbildung 7). Zunächst wurde mit „marker offset“ die in den 2-3 min gemessene Hintergrundfluoreszenz der Haut als Baseline markiert. Mit der Einstellung „marker start“ wurde der Startzeitpunkt für die Auswertung auf 15 min nach erfolgter Injektion festgelegt. Der Endzeitpunkt der Auswertung wurde mit Hilfe von „marker crop“ auf 40 min nach dem vorher markierten Startzeitpunkt gesetzt. Durch Klicken auf „statistics“ konnte die vom Programm ermittelte Halbwertszeit sowie die Korrelation mit dem entsprechenden *one compartment fit* der Kurve ( $R^2$ ) und das 95 % Konfidenzintervall abgelesen werden.



**Abbildung 7: Auswertung der Fluoreszenz-/Zeit-Kurve entsprechend der Ausscheidungsdynamik von FITC-Sinistrin.** Die Hintergrundfluoreszenz der Haut wurde durch „marker offset“ als Baseline markiert. Durch „marker start“ (Startzeitpunkt) und „marker crop“ (Endzeitpunkt) wurde der Auswertungszeitraum festgelegt. Anschließend wurde die Halbwertszeit (HWZ) von FITC-Sinistrin ermittelt.

Durch Teilen einer für die Maus spezifischen Konstante durch die gemessene Halbwertszeit ergab sich die GFR in ml/min/100 g Körpergewicht (*body weight*=b.w.).

Hierzu diene folgende Formel:

$$\text{GFR [ml/min/100 g b.w.]} = (14,6168 \text{ [ml/100 g b.w.]}) / \text{HWZ [min]}$$

## 2.2.5 Plasmavolumenbestimmung mit Evans Blue

Das Plasmavolumen der Maus lässt sich durch retrobulbäre Injektion einer Evans Blue Lösung bestimmen. Der Stoff ist inert und verteilt sich ausschließlich im Blut und nicht in anderen Kompartimenten. Über die Verdünnung des Farbstoffs lassen sich anschließend Rückschlüsse auf das Plasmavolumen, in dem sich die applizierte Menge der Evans Blue Lösung verteilt hat, ziehen. Das Plasmavolumen wurde bei den Mäusen am Ende der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät und am Ende der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> (2.2.1.3) bestimmt.

Die Tiere wurden am Versuchstag in eine inhalative Narkose (Isofluran 2,5-3 %) versetzt. Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurden exakt 100 µl (50 µg/100 µl) einer Evans Blue Lösung (Herstellung siehe 2.1.4) mittels einer Mikrokanüle (30 G ½“ 0,3 x 13 mm) retrobulbär intravenös hinter das Auge injiziert. Anschließend folgte

eine Wartezeit von etwa 7 min, in der sich der Farbstoff gleichmäßig im Plasmavolumen der Maus verteilen konnte. Dann wurde am kontralateralen Auge der weiterhin in Narkose liegenden Maus mit Hilfe einer gekürzten Glaskapillare (Kapillaren zur Schmelzpunktbestimmung) eine finale retrobulbäre Blutentnahme in ein Lithium-Heparin-Probenröhrchen vorgenommen. Unmittelbar darauf wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet. Zur Normierung des später errechneten Plasmavolumens wurde zudem die Tibialänge bestimmt. Dafür wurde die Tibia freipräpariert und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers gemessen. Das blau gefärbte Plasma konnte nach der Zentrifugation der zuvor auf Eis gekühlten Blutprobe für 10 min bei 3600 U/min und 4 °C (Zentrifuge 5417 R) abpipettiert werden. Danach wurden 150 µl der Probe in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion des Plasmas bei 620 nm mit dem Multiskan FC nach vorherigem Schütteln von 5 s gemessen.

Die Auswertung erfolgte in einer Excel-Tabelle am Computer. Die Evans Blue Konzentration der einzelnen Proben konnte mit Hilfe der Formel einer zuvor erstellten Eichgeraden für 150 µl Probenvolumen bestimmt werden. Für die Ermittlung der Eichgeraden wurden Evans Blue Konzentrationen von 0-100 µg/ml, in 10 µg Schritten aufsteigend, in Pool-Plasma von Mäusen angesetzt und photometrisch gemessen.

Daraus ergab sich folgende Gleichung der Regressionsgeraden (für 150 µl-Probe), wobei „y“ der Extinktion und „x“ der Evans Blue Konzentration entspricht:

$$y = 0,02555 * x + 0,0746$$

Nach Umstellen der Formel:

$$\text{Evans Blue Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = (\text{korrigierte Extinktion} - 0,0746) / 0,02555$$

Vor Berechnung der Evans Blue Konzentration mittels dieser Formel wurde die Extinktion der jeweiligen Probe durch Abzug des mittleren Blank-Wertes korrigiert. Danach wurde die anfangs injizierte Menge (50 µg) durch die jeweils errechnete Evans Blue Konzentration der Probe dividiert. Daraus ergab sich das Plasmavolumen des Tieres in ml inklusive des injizierten Volumens von Evans Blue (100 µl). Daher mussten anschließend die 100 µl des Injektionsvolumens noch abgezogen werden.

### **2.2.6 Bestimmung der Konzentration des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (BUN)**

Als indirekter Hinweis auf eine Änderung des Plasmavolumens bzw. als Anzeichen einer Volumendepletion kann die Konzentration des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (*blood urea nitrogen*; BUN) herangezogen werden. Dieser Parameter wurde bei den Mäusen am Ende der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät und am Ende der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> (2.2.1.3) im Lithium-Heparin-Plasma bestimmt, um die Ergebnisse der Plasma-

volumenbestimmung mittels Evans Blue zu validieren. Hierfür wurde den zuvor narkotisierten Mäusen am Versuchsende Blut entnommen und in ein Lithium-Heparin-Röhrchen überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min und 4 °C wurde das gewonnene Plasma abpipettiert, in Probengefäße verbracht und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Messung der BUN-Konzentration erfolgte anschließend im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

### **2.2.7 Plasmahormonbestimmung**

Die Plasmakonzentrationen von Renin und Aldosteron erreichen wenige Stunden vor dem Erwachen der Tiere ihre Maxima (Nikolaeva *et al.*, 2012). Daher wurde die Blutabnahme für die Bestimmung der Plasmahormone am Ende der 10-tägigen NaCl-Mangeldiät und am Ende der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> (2.2.1.3) kurz vor Beginn der Dunkelphase und somit vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere durchgeführt. Außerdem sind die endogenen Plasmahormonspiegel von Renin und Aldosteron sehr stressabhängig, sodass die an der Maus notwendige Blutentnahme für die Bestimmung der Hormone möglichst ohne Stress erfolgen sollte. Hierfür wurden die Tiere über einen Zeitraum von 8 Tagen an das Vorgehen bei der CO<sub>2</sub>-Narkose gewöhnt. Vor der Blutentnahme erfolgte dadurch eine weitgehend stressfreie CO<sub>2</sub>-Narkose, die anschließend zügig mit einer tiefen Isofluran-Narkose fortgesetzt wurde.

Zum Gewöhnen der Tiere an die Abläufe bei der CO<sub>2</sub>-Narkose wurde über 8 Tage täglich 1,5 h vor Beginn der Dunkelphase für 30 Sekunden über einen modifizierten IVC-Deckel Druckluft in die Käfige eingeleitet. Der Luftstrom betrug 16 Liter pro Minute. Am 9. Tag wurde ca. 1,5 h vor Beginn der Dunkelphase anstatt der Druckluft ein Kohlenstoffdioxid-Sauerstoff-Gasgemisch (80 % CO<sub>2</sub> / 20 % O<sub>2</sub>) für ca. 30 Sekunden in den Käfig eingeleitet und die Maus somit narkotisiert. Anschließend wurde das schlafende Tier zur Aufrechterhaltung der Narkose zügig in eine Isofluran-Narkose (2,5-3 %) überführt und retrobulbär eine Blutentnahme vorgenommen. Zur späteren Bestimmung der Reninaktivität wurde in eine unbeschichtete Mikro-Hämatokrit-Kapillare 5 µl Na-EDTA (Herstellung siehe 2.1.4) vorgelegt und anschließend 60 µl des Blutes in die Kapillare abgenommen. Nachdem die Kapillare einseitig mit Verschlusskitt verschlossen wurde, erfolgte für 5 min bei 6000 U/min eine Zentrifugation in einer Hämatokrit-Zentrifuge. Der gewonnene Überstand (Plasma) wurde dann in ein Reagiergefäß pipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Zur späteren Bestimmung des Plasmaaldosteronspiegels wurde das übrige Blut in ein Lithium-Heparin-Probengefäß abgenommen, auf Eis gekühlt und dann 10 min bei 2000 U/min und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417 R). Der Überstand wurde ebenfalls in ein Reagiergefäß pipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung verwahrt.

### 2.2.7.1 Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung der Reninaktivität und des Aldosterons im Plasma

#### 2.2.7.1.1 Bestimmung der Reninaktivität: Angiotensin I - EIA

Zur Bestimmung der Plasmoreninaktivität kam der Angiotensin I - EIA Kit (EK-002-01) der Firma *Phoenix Pharmaceuticals, Inc.* zum Einsatz. Bevor der EIA gemäß der Anleitung durchgeführt werden konnte, erfolgte die Bildung von Angiotensin I aus der Enzymreaktion des im gewonnenen Mausplasma enthaltenen Renins mit einem Reninsubstrat. Bei dem Reninsubstrat handelte es sich um Angiotensinogen-reiches, aufgereinigtes Plasma, welches aus nephrektomierten Ratten gewonnen wurde. Der Protease-Inhibitor PMSF und der RIA-Kit wurden auf Raumtemperatur gebracht. Zudem wurde ein Maleat- (pH 6,0) sowie ein Citrat-Puffer (0,1 M, pH 6,0) hergestellt (Herstellung siehe 2.1.4). Die Plasmaproben wurden nach kurzer Zentrifugation und anschließendem Vortexen erneut für 5 min bei 8000 U/min und 4 °C zentrifugiert, damit sich grobe Bestandteile am Boden absetzen konnten. Dann wurden 5 µl des Überstandes mit 45 µl des Maleat-Puffers (Verhältnis 1:10) verdünnt. Auch das Reninsubstrat wurde kurz zentrifugiert, gevortext und dann unverdünnt weiter verwendet. Für den Reaktionsansatz wurde ein Gemisch aus dem Reninsubstrat und dem Citrat-Puffer (4 Teile Reninsubstrat und 5 Teile Citrat-Puffer) hergestellt. 50 µl von dem mit Citrat-Puffer versetzten Reninsubstrat wurden zu 50 µl der verdünnten Mausplasma-Probe hinzugegeben. Zudem wurden noch je 2 µl PMSF-Lösung (0,1 M) hinein pipettiert, sodass sich pro Probe ein Reaktionsansatz von 102 µl ergab. Das hinzugefügte PMSF diente dazu, dass Angiotensin I im Plasma nicht zerfällt. Von dem Probenansatz wurden 51 µl für 90 min bei 37 °C inkubiert (=„Warmwert“) und die anderen 51 µl für 90 min bei 4 °C (=„Kaltwert“). Diese Zeit wurde Renin eingeräumt, um im „Warmansatz“ durch proteolytische Aktivität aus dem Reninsubstrat Angiotensin I zu bilden. Im „Kaltansatz“ sollte keine enzymatische Reaktion stattfinden. In der Wartezeit wurden entsprechend der Bedienungsanleitung des EIA-Kits folgende Substanzen vorbereitet: der Probenpuffer (*assay buffer*), die Peptidstandards, der primäre Antikörper, das biotinylierte Peptid und die Positivkontrolle. Da aufgrund der NaCl-Mangeldiät von stimuliertem Renin ausgegangen werden musste, wurden nach Ablauf der 90 min sowohl der „Warmansatz“ als auch der „Kaltansatz“ der Probe mit dem *assay buffer* entsprechend verdünnt.

Das so gebildete Angiotensin I wurde nachfolgend im Enzymimmunoassay detektiert. Dafür wurde der EIA gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Pro *well* auf der Mikrotiterplatte wurden 50 µl Probe eingesetzt (jeweils 50 µl vom „Warmwert“ und vom „Kaltwert“). Für die spätere Erstellung der Standardkurve wurden ebenfalls jeweils 50 µl der verschiedenen Standardkonzentrationen vorgelegt. Nach erfolgter Farbreaktion wurden die

Extinktionen der Proben mit Hilfe der Software „SkanIt“ bei 450 nm im Multiskan FC gemessen.

Die Auswertung erfolgte am Computer mit dem Programm Excel. Mit den bekannten Konzentrationen der Standards wurde eine Regressionsgerade erstellt. Die unbekannt Konzentrationen von Angiotensin I in den Plasmaproben konnten daraufhin durch Extrapolation mit dieser Regressionsgeraden bestimmt werden. Nach Berechnung der Konzentrationen der „Warmwerte“ des Angiotensin I in ng/ml wurden die Konzentrationen der „Kaltwerte“ (ng/ml) davon subtrahiert. Zudem wurden die Verdünnungen noch mit in die Berechnung einbezogen. Daraus ergaben sich die Angiotensin I Konzentrationen in der Einheit ng/ml x h. Die Plasmapreninaktivität entspricht also einer pro Zeit und Volumen gebildeten Angiotensin I-Menge.

### **2.2.7.1.2 Bestimmung der Plasmaaldosteronkonzentration: Aldosteron - EIA**

Die Aldosteronkonzentration im Plasma wurde durch den Aldosteron - EIA (EIA-5298) der Firma *DRG Instruments GmbH* quantitativ bestimmt. In Vorbereitung für den EIA wurden die bei -20 °C aufbewahrten Lithium-Heparin-Plasmaproben zum langsamen Auftauen auf Eis gelagert sowie die Bestandteile des Kits auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Proben gevortext und kurz herunterzentrifugiert, damit grobe Bestandteile sich am Boden absetzen konnten. Je nach zu erwartender Höhe des Aldosteronwertes wurden die Proben entweder unverdünnt oder verdünnt (30 µl Probe und 20 µl Standard 0) weiterwendet. Zudem wurden die Standards, Kontrollen und Waschlösung entsprechend der Anleitung des Kits hergestellt. Je 50 µl der Standards, Kontrollen und Plasmaproben wurden für den EIA verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Nach erfolgter Farbreaktion wurden die Extinktionen der Proben mit Hilfe der Software „SkanIt“ bei 450 nm im Multiskan FC gemessen.

Die Auswertung erfolgte am Computer in einer Excel-Tabelle. Mit den bekannten Standard-Konzentrationen wurde eine Regressionsgerade erstellt. Anschließend konnte anhand der Extinktion jeder Probe die entsprechende Aldosteronkonzentration mit Hilfe der Geradengleichung errechnet werden. Zudem mussten bei der Berechnung die Verdünnungen berücksichtigt werden. Zum Schluss ergab sich die jeweilige Aldosteronkonzentration in der Einheit pg/ml.

### **2.2.8 Retrobulbäre Blutentnahme und Blutgasanalyse (BGA)**

Um den Säure-Basen-Status sowie den Hämatokrit und die Plasmaelektrolytkonzentrationen bestimmen zu können, wurde am Ende aller vier verschiedenen Diäten eine Blutgasanalyse durchgeführt. Für die Messung kam der Blutgasanalysator ABL90 FLEX der Firma *Radiometer* zum Einsatz. Am Versuchstag wurden die Tiere in eine inhalative Narkose

(Isofluran 2,5-3 %) versetzt. Nach Venenstau durch Nackengriff erfolgte dann mit Hilfe einer gekürzten Glaskapillare (Kapillaren zur Schmelzpunktbestimmung) retrobulbär eine Blutentnahme. Das frische Blut wurde von der Glaskapillare direkt in eine elektrolytbalancierte Plastikcapillare überführt. Nach Aufsetzen eines Adapterstücks (*clot catcher*) auf das Plastikröhrchen und Einziehen der Blutprobe in das Blutgasanalysegerät wurden kurze Zeit später die verschiedenen Blutparameter angezeigt.

### **2.2.9 Organentnahme**

Die Organentnahme erfolgte meist nach einer finalen Blutabnahme für eine Blutgasanalyse und/ oder Lithium-Heparin- oder EDTA-Plasma. Hierfür wurden die in tiefer inhalativer Narkose (Isofluran 2,5-3 %) liegenden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde mittels Schere die Bauchhöhle eröffnet, die Nieren freigelegt und herausgenommen. Die Nieren wurden direkt gekühlt und die Nierenkapseln entfernt. Nach dem Wiegen wurden die Nieren für molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bis zur Verwendung bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Zudem wurde zur Normierung der erhobenen Parameter wie z.B. dem Plasmavolumen die Tibialänge bestimmt. Dafür wurde die Tibia freipräpariert und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers gemessen. Zur Nachgenotypisierung wurden zusätzlich Ohrbiopsien entnommen.

### **2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot**

Molekularbiologische Analysen wurden mit Mausnieren durchgeführt, die bei der Organentnahme am Ende der 10-tägigen NaCl-Mangeldiät sowie am Ende der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> übers Trinkwasser (siehe 2.2.1.3) kurz vor Beginn der Dunkelphase und somit vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere gewonnen wurden.

#### **2.2.10.1 Proteinpräparation**

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Nierengewebe für spätere Western Blot Analysen wurde eine Proteinpräparation mit Hilfe eines Homogenisators durchgeführt. Die Kühlung der Proben war während der Präparation und der späteren Portionierung sehr wichtig. Daher wurden beschriftete Reagiergefäße (2 ml) auf Eis vorgekühlt. Die bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagerten Nieren wurden in flüssigen Stickstoff überführt. Der benötigte Sucrosepuffer (Herstellung siehe 2.1.4) wurde ebenso auf Eis gekühlt. Direkt vor der Verwendung wurden dem Sucrosepuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren im Verhältnis von 1:100 (Inhibitoren zu Sucrosepuffer) hinzugegeben. Für je eine Probe Gesamtniere wurden 2 ml Sucrosepuffer und somit je 20 µl Inhibitoren benötigt.

In das Homogenisatorröhrchen wurden 2 ml Sucrosepuffer mit den Inhibitoren vorgelegt und das tiefgefrorene Gewebestück direkt aus dem flüssigen Stickstoff hinzugegeben. Anschließend wurde die Niere im eisgekühlten Homogenisierer mit einem Pilstill zerkleinert. Danach wurde der Inhalt in das vorgekühlte 2 ml Reagiergefäß pipettiert. Nach jeder Probe erfolgte das Spülen des Homogenisatorröhrchens mit *aqua dest.* Das Homogenat wurde 10 min auf Eis stehen gelassen und dann bei 3000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der gesamte Überstand der Probe wurde in ein Tube pipettiert und gevortext. Dann wurden 310 µl des Überstandes entnommen, in ein gekühltes Reagiergefäß gegeben und bei -20 °C gelagert. Mit dem restlichen Überstand wurde eine Membrananreicherung durchgeführt, um membran-eingelagerte Transportproteine anschließend genauer analysieren zu können. Hierfür wurde der Rest des Überstandes bei 21000 g für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Sucrosepuffer und Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und dann bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.10.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford mit Hilfe einer Proteinstandardreihe (Firma *Bio-Rad*). Die bei -20 °C gefrorenen membranangereicherten Proteinproben wurden zum langsamen Auftauen auf Eis gelagert. Zur Proteinbestimmung mussten die Proben in einem Verhältnis von 1:20 (5 µl Probe und 95 µl *aqua dest*) verdünnt werden. Der Rest der unverdünnten Proben wurde wieder bei -20 °C eingefroren. Die Proteinstandardreihe wurde auf Raumtemperatur gebracht. In jedes *well* einer Mikrotiterplatte wurden 5 µl der Proteinstandards bzw. verdünnten Proben pipettiert. Die Standards wurden hierbei für eine bessere Genauigkeit doppelt und die Proben jeweils zwei- bis sechsfach bestimmt. Nach dem Bestücken der *wells* wurden pro Probe 250 µl Reagenz (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent) mit Hilfe der Multipette hinzugegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Rotilabo®-Abdeckfolie verschlossen, durch leichtes Schwänken durchmischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min bis höchstens 1 h erfolgte die Extinktionsmessung der Proben mit Hilfe der Software „Skant!“ bei 620 nm im Multiskan FC.

Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte ebenfalls mit der Software „Skant!“. Mit Hilfe der Proteinstandards erstellte das Programm nach Ausschluss der Standards größer als 1,0 mg/ml eine Regressionsgerade. Mit der ermittelten Formel wurden die Proteinkonzentrationen in µg/µl errechnet. Für jede Probe wurde aus den 2 bis 6 Einzelwerten eine mittlere Proteinkonzentration errechnet. Anhand dieser Werte wurden für alle Proteinproben je nach Antikörper Aliquots mit unterschiedlichen Proteinmengen pro 10 µl hergestellt (siehe Tabelle 6 unter 2.2.10.4) und für die spätere Verwendung im Western Blot bei -20°C

gelagert. Dafür wurde die entsprechende Menge der Proteinprobe zu einer errechneten Menge an Sucrosepuffer mit Inhibitoren gegeben.

### 2.2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine in einer Gelmatrix mittels eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Molekülmasse erfolgte durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli. Hierfür wurden Polyacrylamid-Gele (Tris-HCl-Gele, 8 %ig) verwendet. Diese hatten eine Dicke von 1 mm, besaßen 15 *wells* und wurden wie folgt hergestellt (Anleitung für zwei Mini-Gele):

**Tabelle 5: Substanzen für die Herstellung von zwei Mini-Polyacrylamid-Gelen (Tris-HCl-Gele, 8 %ig)**

	Trenngel	Sammelgel
40 % Acrylamid/Bis-Lösung	2,4 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer (Herstellung siehe 2.1.4)	3,0 ml	-
Sammelgelpuffer (Herstellung siehe 2.1.4)	-	1,25 ml
<i>aqua dest</i>	6,6 ml	3,3 ml
10 % APS (Herstellung siehe 2.1.4)	90 µl	25 µl
TEMED	14 µl	10 µl

Zunächst wurde das 8 %ige Trenngel in die Gelkassette (bestehend aus zwei Glasscheiben) gegossen, welches danach zweimal mit 100 µl Isopropanol überschichtet wurde. Das Gel wurde ca. 30 min bei Raumtemperatur bis zur Polymerisation stehengelassen. Anschließend wurde die Isopropanol-Phase durch Spülen mit *aqua dest* entfernt und die Gelkassette oberhalb des Trenngels mit Filterpapierstreifen getrocknet. Dann wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm eingefügt. Auch dieses Gel wurde bis zur vollständigen Polymerisation stehengelassen und danach bei 4 °C in mit *aqua dest* durchtränkten Tüchern und Frischhaltefolie bis zur Verwendung aufbewahrt.

Am Tag der Gelelektrophorese wurden die 10 µl Proben, welche jeweils eine bestimmte Proteinkonzentration (siehe Tabelle 6 unter 2.2.10.4) enthielten, zum Auftauen auf Eis gelagert und der Proteinmarker auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden je Proteinprobe 4,5 µl Ladepuffer (Herstellung siehe 2.1.4) hinzu pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde durchmischt, herunterzentrifugiert und 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gelagert. Nachdem die Proben wieder heruntergekühlt waren, erfolgte zusammen mit dem Proteinmarker erneut eine kurze Zentrifugation.

Während der Inkubationszeit wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet. Nach dem Entfernen des Kammes aus den Polyacrylamid-Gelen wurden die Gelkassetten in die Kammer eingesetzt. Anschließend wurde der Bereich zwischen den zwei Gelkassetten mit

vorbereitetem 1x SDS-Laufpuffer (Herstellung siehe 2.1.4) befüllt. Die Kammer selbst wurde nicht vollständig befüllt, um die Taschen besser beladen zu können.

Nach dem Beladen der Geltaschen wurde die Elektrophoresekammer nun vollständig mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt, der Deckel aufgesetzt und an die Spannungsquelle angeschlossen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromspannung von 200 V. Die Laufzeit war abhängig von der jeweiligen Größe des zu untersuchenden Proteins. Am Ende der Elektrophorese wurden die Gelkassetten aus dem Laufpuffer geholt und die Gele vorsichtig von den Glasscheiben getrennt.

### 2.2.10.4 Western Blot

Der Transfer der mittels SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Membran erfolgte durch *semi-dry blotting*. Hierfür wurden entsprechend der Mini-Gelgröße 8 Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran zugeschnitten. Der zwischen den beiden Elektroden platzierte Transfer-Stapel setzte sich von unten (Anode) nach oben (Kathode) aus folgenden Schichten zusammen: vier Filterpapiere, die Membran, das Gel und abschließend wieder vier Filterpapiere. Alle genannten Bestandteile des Blots wurden vor dem Auflegen in die Blotkammer mit Blotpuffer (Herstellung siehe 2.1.4) durchtränkt. Der fertige Stapel wurde mit einer Rolle abgezogen und überflüssiger Puffer entfernt. Das Blotten erfolgte in der Blotkammer Fastblot™ B44 für 1,5 h bei 80 mA für ein Mini-Gel bzw. bei 160 mA für zwei Mini-Gele. Im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System wurde die Einstellung „Standard“ ausgewählt, in welcher das Blotten für 30 min bei 25 V und 1,0 A für 1 bis 2 Mini-Gele erfolgte. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran für ca. 1 min in Ponceaurot-Lösung (Herstellung siehe 2.1.4) eingelegt und damit alle Proteine auf der Membran angefärbt. Dies diente der Überprüfung des gleichmäßigen Proteintransfers und der Abschätzung der Proteinmengen in den verschiedenen Spuren des Gels vor der Immundetektion. Anschließend wurde die Membran in *aqua dest* gespült. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran bei Raumtemperatur für 1 h bis 2 h in Blockadelösung (Herstellung siehe 2.1.4) gelegt und auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Blockadelösung abgegossen und die Membran mit 1x PBS (Herstellung siehe 2.1.4) mehrmals reichlich gespült. Die Membran wurde in eine ausreichend große Inkubationsschale mit Deckel gelegt. Anschließend wurde der jeweilige primäre Antikörper in 10 ml 1. Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt (entsprechende Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 6) und auf die Membran pipettiert. Die Inkubation der Nitrocellulose-Membran mit der Lösung erfolgte über Nacht bei 8 °C auf einem Schüttler.

Am Tag darauf wurde die Membran in eine Dose mit 1x PBS/Tween gelegt, die Lösung direkt wieder abgegossen und anschließend viermal für je 10 min bei Raumtemperatur auf

einem Schüttler mit der gleichen Lösung reichlich gespült. Danach kam die Membran wieder in eine Inkubationsschale und 10 ml 2. Antikörper-Verdünnungslösung mit dem sekundären Antikörper (entsprechende Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 6) wurden auf die Membran pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

**Tabelle 6: Probenkonzentrationen, Bandenhöhen sowie Verdünnungen des 1. und 2. Antikörpers einzelner Transportproteine für den Western Blot**

Transportprotein	Probenkonzentration in µg/10 µl	Bandenhöhe in kDa	1. Antikörper/Verdünnung	2. Antikörper/Verdünnung
Actin	2, Membran angereichert	42	anti-Actin, 1:5000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
ENaC-α	10, Membran angereichert	90 (30)	anti-ENaC-α, 1:15000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
ENaC-β	10, Membran angereichert	85	anti-ENaC-β, 1:20000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
ENaC-γ	5, Membran angereichert	85 (65)	anti-ENaC-γ, 1:5000 bzw. 1:10000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
NCC	5, Membran angereichert	180	NCC, 1:30000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
NHE3	5, Membran angereichert	85	anti-NHE3, 1:10000	goat anti-rabbit IgG, 1:2000
pNHE3 Ser552	2, Membran angereichert	85	anti-NHE3 p Ser552, 1:100000	goat anti-mouse IgG, 1:30000
pNCC Thr60	10, Membran angereichert	180	1,7 µl pNCC + 1 µl Peptid pro 1 ml 1. Antikörper-Verdünnungslösung	rabbit anti-sheep IgG, 1:200000

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte, wie oben bereits beschrieben, erneut viermal 10 min die Spülung der Membran mit 1x PBS/Tween. Dann wurde die Membran kurz zwischen Filterpapier getrocknet und wieder in die Schale gelegt. Zur nachfolgenden Detektion mittels Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence* (ECL)) wurden die Luminol- und Peroxidlösung (Clarity™ Western ECL Substrat) im Verhältnis von 1:1 miteinander vermischt und die Membran mit 10 ml der ECL-Lösung benetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nachdem die Membran erneut kurz zwischen Filterpapier getrocknet wurde, wurde sie in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde das Chemilumineszenz-Signal durch Auflegen eines Films (Amersham Hyperfilm ECL) auf die Membran erfasst. Anschließend erfolgte die Filmentwicklung mittels Entwickler- und Fixierlösung. Dafür wurde der Film in

Entwicklerlösung geschwenkt, in *aqua dest* gespült und danach in Fixiererlösung fixiert. Nach erneutem Spülen in *aqua dest* und Trocknen konnte der Film für die Auswertung und Dokumentation beschriftet werden.

Zur Auswertung wurde der Film mit Hilfe des Transilluminators MiniBis Pro und dem Programm „Gel Scan“ (Version 5.1) als Bilddatei auf den Computer übertragen. Anschließend erfolgte die Auswertung mit der Software „Gel Capture“ (Version 7.2) der Firma *DNR Bio-Imaging Systems*.

### **2.2.11 Statistik**

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten kamen die Programme Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism (Version 6.07) zum Einsatz. In Abhängigkeit der zugrunde liegenden Fragestellung wurde eine jeweils passende statistische Analyse durchgeführt. Für den direkten Gruppenvergleich  $Ae4^{+/+}$  versus (vs.)  $Ae4^{-/-}$  wurden ungepaarte Student's t-Tests verwendet. Zur Auswertung mehrerer Faktoren gleichzeitig, wie z.B.  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. nach Sham-Injektion am 10. Tag und Diuretikagabe am 11. Tag einer NaCl-Mangeldiät), wurde eine *two-way ANOVA* mit Bonferroni Post-hoc-Test durchgeführt.

Sämtliche Messergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert unter Verwendung des Standardmessfehlers (SEM=*standard error of the mean*) angegeben. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen („\*“:  $p < 0,05$ ; „\*\*“:  $p < 0,01$ ; „\*\*\*“:  $p < 0,001$ ; „\*\*\*\*“:  $p < 0,0001$ ).

## 3 Ergebnisse

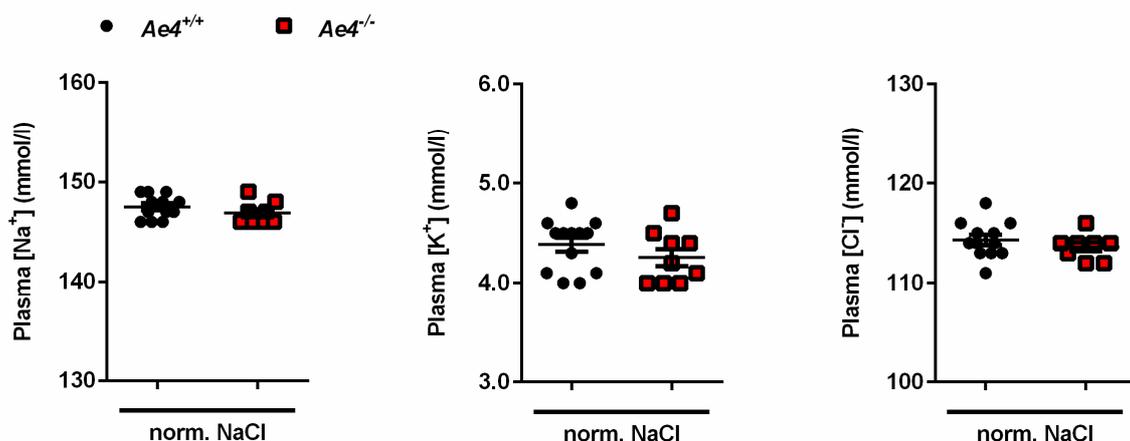
### 3.1 Normaldiät

Um zu untersuchen, ob die AE4-Gendefizienz bereits unter einer Normaldiät (0,3 % Na<sup>+</sup> und 0,62 % Cl<sup>-</sup>) Einfluss auf den Phänotyp hat, wurden im Rahmen der Blutgasanalyse die Konzentrationen der Plasmaelektrolyte sowie der Säure-Basen-Status und der Hämatokrit bestimmt. Zudem wurde untersucht, wie viel Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> die AE4-defizienten Mäuse (*Ae4*<sup>-/-</sup> bzw. *Slc4a9*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu den *Ae4*<sup>+/+</sup> bzw. *Slc4a9*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren über den Urin unter der Normaldiät ausscheiden. Diese Daten sollten Hinweise zur Rolle des renalen AE4-Transporters bei der Elektrolyt- und Säure-Basen-Homöostase unter Normalbedingungen liefern.

#### 3.1.1 Elektrolyt- und Volumenhaushalt

##### 3.1.1.1 Plasmaelektrolyte

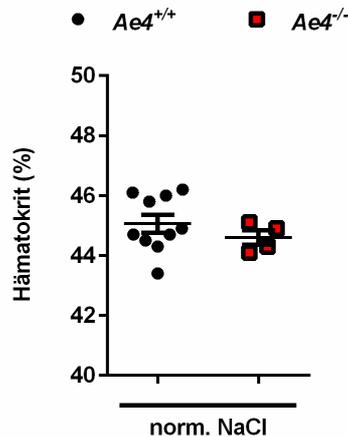
Unter der Normaldiät unterschieden sich die Plasmakonzentrationen von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> nicht signifikant zwischen den *Ae4*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren und *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 8). Die Na<sup>+</sup>-Konzentration im Plasma belief sich in der *Ae4*<sup>+/+</sup>-Gruppe im Mittel auf 147,5 ± 0,3 mmol/l (n=12) und in der *Ae4*<sup>-/-</sup>-Gruppe auf 146,9 ± 0,4 mmol/l (n=8). Zudem ergab sich bei den *Ae4*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren eine mittlere K<sup>+</sup>-Plasmakonzentration von 4,4 ± 0,1 mmol/l (n=13) und bei den *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen von 4,3 ± 0,1 mmol/l (n=9). Die Cl<sup>-</sup>-Konzentration im Plasma betrug in der *Ae4*<sup>+/+</sup>-Gruppe 114,3 ± 0,5 mmol/l (n=12) und in der *Ae4*<sup>-/-</sup>-Gruppe 113,6 ± 0,5 mmol/l (n=8).



**Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei *Ae4*<sup>+/+</sup> und *Ae4*<sup>-/-</sup> unter Normaldiät.** Bei der Plasmakonzentration von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Ae4*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren und *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen (Mittelwerte ± SEM; n=8-13 pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.1.1.2 Hämatokrit

Im Rahmen der Blutgasanalyse unter der Normaldiät fand ebenfalls die Bestimmung des Hämatokrits statt. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, unterschied sich der mittlere Hämatokrit der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse ( $44,6 \pm 0,2\%$ ;  $n=4$ ) nicht signifikant von dem der  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere ( $45,1 \pm 0,3\%$ ;  $n=10$ ).

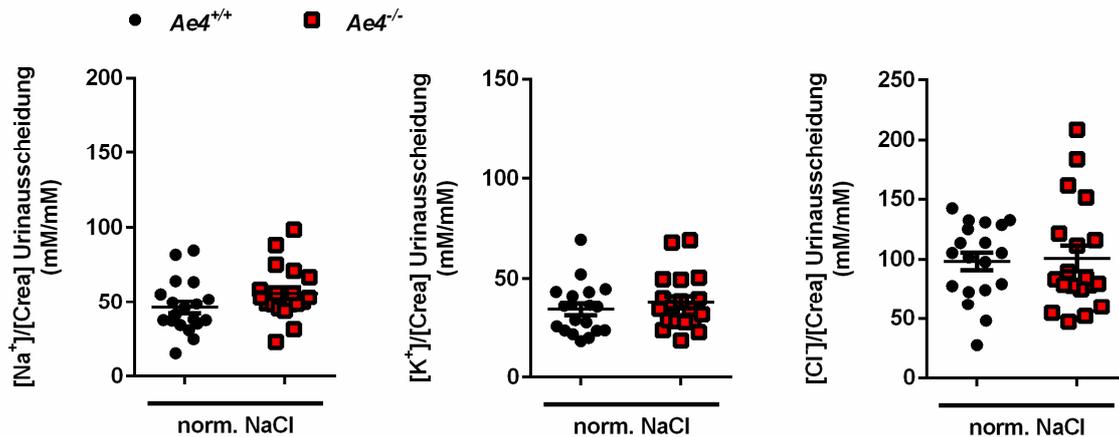


**Abbildung 9: Hämatokrit von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter Normaldiät.** Der Hämatokrit war nicht signifikant unterschiedlich zwischen der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe und  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=4-10$  pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.1.1.3 Urinelektrolyte

Um den Einfluss des AE4 Knockouts unter der Normaldiät auf die renale Elektrolytausscheidung zu untersuchen, wurden die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen in dem über 4 h gesammelten Urin bestimmt. Da die Elektrolytkonzentrationen im Urin stark vom Urinvolumen abhängen und daher wenig aussagefähig sind, wurden die ermittelten Konzentrationen der Urinelektrolyte zur jeweiligen Kreatininkonzentration ([Crea]) in derselben Urinprobe ins Verhältnis gesetzt. Die so bestimmten Werte der Elektrolytausscheidung (in mM/mM) waren damit weitgehend unabhängig von der Urinmenge.

Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse schieden unter der Normaldiät jeweils annähernd gleich viel  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  über den Urin aus (Abbildung 10). Die mittlere Urinausscheidung von  $\text{Na}^+$  betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $46,4 \pm 4,1$  mM/mM ( $n=19$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $56,1 \pm 4,1$  mM/mM ( $n=19$ ). Bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren ergab sich eine mittlere renale  $\text{K}^+$ -Ausscheidung von  $34,3 \pm 3,0$  mM/mM ( $n=19$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen von  $37,9 \pm 3,2$  mM/mM ( $n=19$ ). Die  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe schied im Mittel  $98,4 \pm 7,3$  mM/mM ( $n=19$ ) an  $\text{Cl}^-$  über den Urin aus und die  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $100,8 \pm 10,5$  mM/mM ( $n=19$ ).



**Abbildung 10: Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter Normaldiät.** Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse zeigten eine jeweils annähernd gleiche Urinausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$ . Die  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=19$  pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.1.2 Säure-Basen-Haushalt

Die Mittelwerte und Standardfehler zum Säure-Basen-Status der  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse sowie die Anzahl der untersuchten Tiere unter der Normaldiät sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse wiesen verglichen mit den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren keine signifikanten Abweichungen im pH-Wert,  $pCO_2$  und in der Konzentration des Standardbikarbonats ( $[HCO_3^-]_{St}$ ) auf. Ebenso waren zwischen den beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede im Basenüberschuss (BE) feststellbar.

**Tabelle 7: Säure-Basen-Status von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter Normaldiät**

Parameter im Plasma	$Ae4^{+/+}$	$Ae4^{-/-}$
pH-Wert	7,36 $\pm$ 0,01 (n=12)	7,36 $\pm$ 0,01 (n=8)
$pCO_2$ , mmHg	37,2 $\pm$ 1,2 (n=12)	37,2 $\pm$ 0,5 (n=8)
$[HCO_3^-]_{St}$ , mmol/l	20,3 $\pm$ 0,3 (n=12)	20,6 $\pm$ 0,4 (n=8)
BE, mmol/l	-4,8 $\pm$ 0,5 (n=12)	-4,5 $\pm$ 0,6 (n=8)

Der pH-Wert im Plasma war bei beiden Genotypen gleich. Ferner ließ sich kein Unterschied beim  $pCO_2$  und bei der Plasmakonzentration des  $(HCO_3^-)_{St}$  zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen feststellen. Der BE war ebenfalls nicht unterschiedlich beim Vergleich der Genotypen (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=8-12$  pro Gruppe; Student's t-Test).

Die Ergebnisse zeigten, dass der AE4 Knockout unter der Normaldiät keine Auswirkungen auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt sowie die Säure-Base-Homöostase hatte.

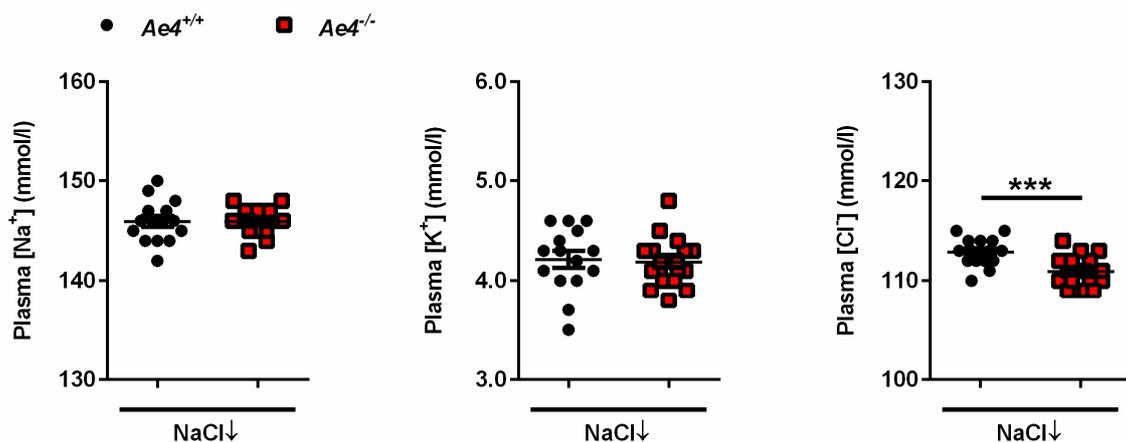
## 3.2 NaCl-Mangeldiät

Um den Rückresorptionsweg von  $\text{Na}^+$  über die  $\beta$ -Schaltzellen durch die Zusammenarbeit von Pendrin/NDCBE luminal und durch den AE4-Cotransporter basolateral zu provozieren, wurden verschiedene Versuche unter einem NaCl-Mangel (NaCl-Mangeldiät; 0,013 %  $\text{Na}^+$  und 0,011 %  $\text{Cl}^-$ ) durchgeführt. Die Daten sollten Hinweise zu der Fragestellung liefern, ob der AE4 für die Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance und der Volumenhomöostase unter NaCl-Mangel essentiell ist.

### 3.2.1 Elektrolyt- und Volumenhaushalt

#### 3.2.1.1 Plasmaelektrolyte

Um den Effekt des AE4-Genverlusts unter längerfristigem NaCl-Mangel auf den Plasmaspiegel der Elektrolyte  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und vor allem auf  $\text{Na}^+$  zu untersuchen, wurde am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät eine Blutgasanalyse vorgenommen. Die Plasmakonzentrationen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  unterschieden sich nicht signifikant zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen (Abbildung 11). Die mittlere  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Plasma betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $145,9 \pm 0,5$  mmol/l ( $n=15$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $145,9 \pm 0,3$  mmol/l ( $n=19$ ). Bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren ergab sich im Mittel eine  $\text{K}^+$ -Plasmakonzentration von  $4,2 \pm 0,1$  mmol/l ( $n=15$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen von  $4,2 \pm 0,1$  mmol/l ( $n=19$ ). Auffällig war dahingegen eine signifikante Erniedrigung ( $p=0,0004$ ) der mittleren Plasmakonzentration von  $\text{Cl}^-$  bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen mit  $110,9 \pm 0,3$  mmol/l ( $n=19$ ) verglichen zu  $112,9 \pm 0,4$  mmol/l ( $n=15$ ) bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren.

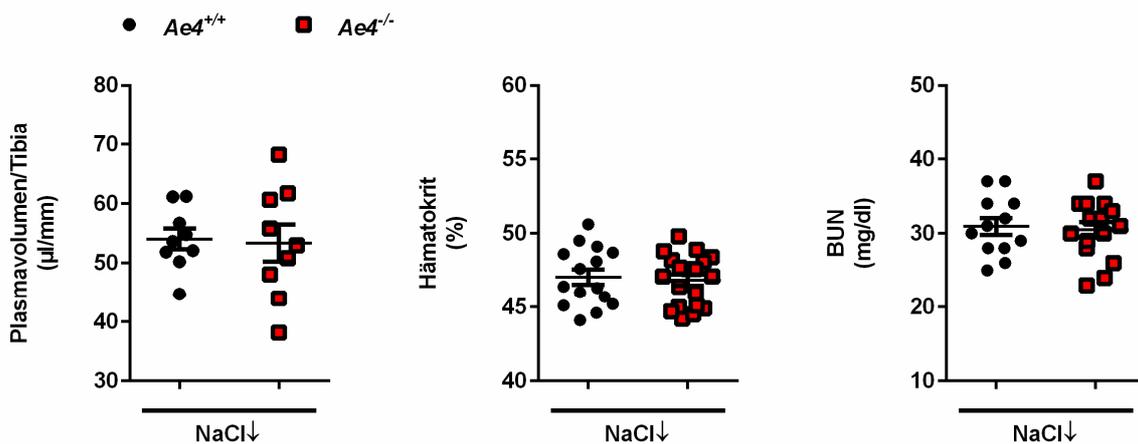


**Abbildung 11: Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Es waren keine Unterschiede bei der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Plasmakonzentration feststellbar. Die Plasmakonzentration von  $\text{Cl}^-$  war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen signifikant erniedrigt gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Tieren (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=15-19$  pro Gruppe; Student's t-Test; \*\*\* $p<0,001$ ).

### 3.2.1.2 Plasmavolumen, Hämatokrit und BUN

Angesichts der Annahme, dass der AE4 aufgrund seiner möglichen Funktion als  $\text{Na}^+$ -Rückresorptionsweg unter NaCl-Mangel essentiell für die Volumenhomöostase sein könnte, wurden das Plasmavolumen, der Hämatokrit und die Konzentration des Blutharnstoff-Stickstoffs (BUN) bestimmt. Die Daten sollten eine Aussage zum Volumenhaushalt der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse liefern.

Das Plasmavolumen, der Hämatokrit und die BUN-Konzentration zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 12). Das jeweils auf die Tibialänge normierte mittlere Plasmavolumen betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren  $54,0 \pm 1,7 \mu\text{l}/\text{mm}$  ( $n=9$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $53,4 \pm 3,1 \mu\text{l}/\text{mm}$  ( $n=9$ ). Der mittlere Hämatokrit belief sich in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe auf  $47,0 \pm 0,5 \%$  ( $n=15$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe auf  $46,9 \pm 0,4 \%$  ( $n=19$ ). Die Konzentration des BUN ergab bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren im Mittel  $30,9 \pm 1,2 \text{ mg}/\text{dl}$  ( $n=12$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $30,5 \pm 1,0 \text{ mg}/\text{dl}$  ( $n=15$ ). Daher konnten keine Hinweise auf eine Volumenabnahme bei den  $Ae4^{-/-}$  Tieren gefunden werden.



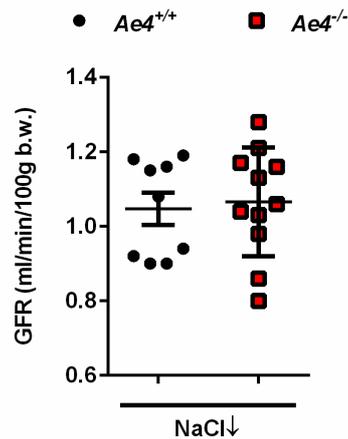
**Abbildung 12: Plasmavolumen, Hämatokrit und Konzentration des BUN von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Das Plasmavolumen ( $n=9$  pro Gruppe), der Hämatokrit ( $n=15-19$  pro Gruppe) sowie die BUN-Konzentration ( $n=12-15$  pro Gruppe) unterschieden sich nicht zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen. Das Plasmavolumen wurde zur jeweiligen Tibialänge ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM; Student's t-Test).

### 3.2.1.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate wurde bestimmt, um beurteilen zu können, ob die  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse unter NaCl-Mangel eine gleiche Nierenfunktion aufweisen. Dies war wichtig, um die Ergebnisse der Urinelektrolytmessung richtig einordnen zu können. Durch Multiplikation der GFR mit der Konzentration des jeweiligen Plasmaelektrolyts lässt sich die filtrierte Menge errechnen. Sollten die GFR und die Plasmakonzentration der Elektrolyte zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen gleich sein, aber die Tiere unterschiedlich viel an

Elektrolyten ausscheiden, dient dies als Hinweis auf unterschiedliche Modifikationen des Urins durch Resorption oder Sekretion von Elektrolyten und Wasser in der Niere.

Die GFR wurde am 7. oder 8. Tag der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät mittels transkutaner photometrischer Messung von FITC-Sinistrin bestimmt und war bei beiden Genotypen gleich (Abbildung 13). Sie betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe im Mittel bezogen auf 100 g Körpergewicht (Body weight=b.w.)  $1,05 \pm 0,04$  ml/min (n=9) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $1,07 \pm 0,04$  ml/min (n=11).



**Abbildung 13: Glomeruläre Filtrationsrate von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. oder 8. Tag der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät.** Die GFR war zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nicht signifikant unterschiedlich (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=9-11 pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.2.1.4 Urinelektrolyte unter Diätwechsel und nach 10 Tagen

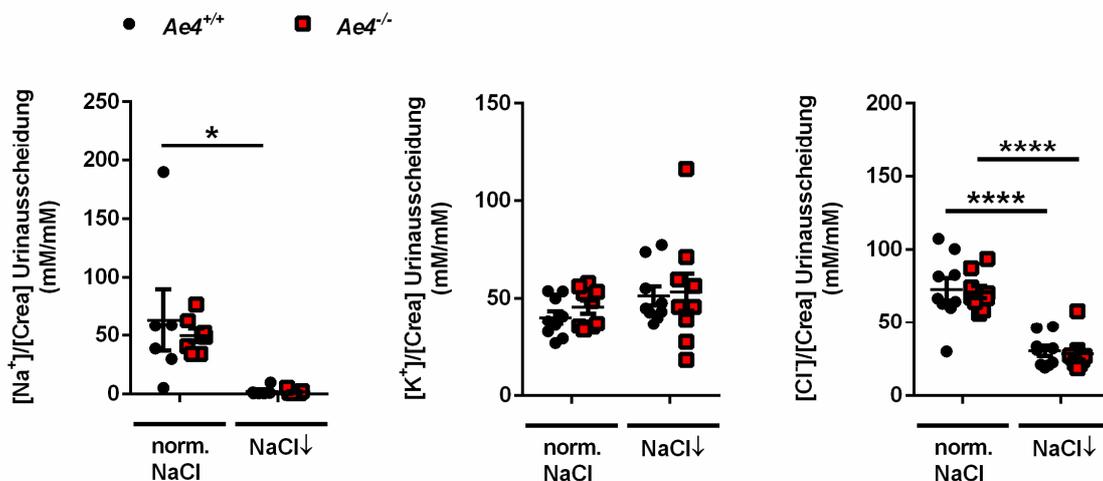
Da der AE4 Knockout unter der Normaldiät keinen Einfluss auf die renale Elektrolytausscheidung hatte, wurde im Folgenden untersucht, ob sich die Parameter beim Vergleich der Genotypen unter NaCl-Mangel unterscheiden.

Die Versuche zum Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät dienten der Überprüfung der Anpassungsfähigkeit der  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse an einen plötzlich auftretenden NaCl-Mangel. Hierfür wurden die Tiere für jeweils 4 h vor und 20 h nach dem Diätwechsel in den metabolischen Käfig gesetzt und jeweils die Elektrolytausscheidung im Urin als Elektrolytkonzentration in Bezug zur Kreatinin-konzentration (mM/mM) bestimmt. Um eine eventuell erst später erfolgende unterschiedliche Anpassung zu untersuchen, wurde zudem der Urin vom 10. Tag der NaCl-Mangeldiät mittels Blasenpunktion gesammelt und analysiert. Der Urin wurde stets in der Dunkelphase und somit Aktivitätsphase der Tiere gesammelt, da die renale  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung einem circadianen Rhythmus folgt. In der Dunkelphase findet eine höhere Ausscheidung von  $\text{Na}^+$  statt. Dadurch sollten mögliche Unterschiede der  $\text{Na}^+$ -Urinausscheidung zwischen den Genotypen besser sichtbar gemacht werden.

## Ergebnisse

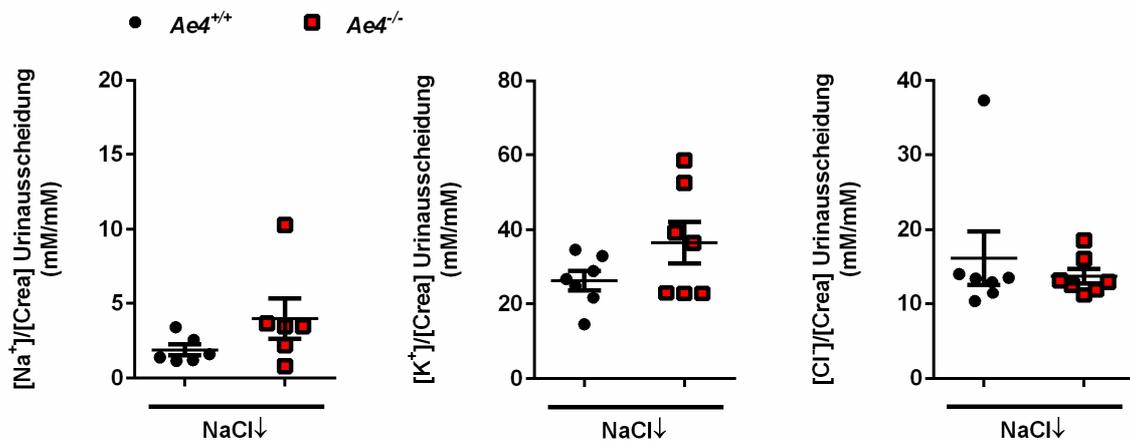
Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse wiesen vor dem Diätwechsel ähnliche Werte der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung auf wie in 3.1.1.3 unter der Normaldiät bereits gezeigt. Beide Genotypen schieden im Mittel ( $n=6-9$  pro Gruppe) jeweils annähernd gleich viel  $\text{Na}^+$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $63,3 \pm 26,5$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $49,7 \pm 5,9$  mM/mM),  $\text{K}^+$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $40,0 \pm 3,4$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $45,5 \pm 3,3$  mM/mM) und  $\text{Cl}^-$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $72,8 \pm 7,7$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $70,8 \pm 4,2$  mM/mM) über den Urin aus (Abbildung 14).

Bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen war die renale  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung nach dem Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät gleich stark reduziert (Abbildung 14). Die mittlere  $\text{Na}^+$ -Urinausscheidung betrug nach dem Diätwechsel bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren  $2,2 \pm 1,5$  mM/mM ( $n=6$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $1,6 \pm 0,6$  mM/mM ( $n=7$ ). In der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe ergab sich im Mittel eine renale  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung von  $30,2 \pm 3,6$  mM/mM ( $n=9$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe von  $28,2 \pm 3,9$  mM/mM ( $n=9$ ). Auch die Urinausscheidung von  $\text{K}^+$  zeigte zwischen den beiden Genotypen nach dem Diätwechsel keine signifikanten Unterschiede. Die mittlere Urinausscheidung von  $\text{K}^+$  belief sich bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren auf  $51,1 \pm 4,9$  mM/mM ( $n=9$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen auf  $53,1 \pm 9,6$  mM/mM ( $n=9$ ).



**Abbildung 14:** Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter der Normaldiät und 20 h nach dem Wechsel auf die NaCl-Mangeldiät in der Dunkelphase (Tiere aktiv). Die Urinausscheidung von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  war zwischen den Genotypen unter der Normaldiät nicht signifikant unterschiedlich. Nach dem Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät entwickelten beide Gruppen eine gleich stark reduzierte  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung. Bei der renalen Ausscheidung von  $\text{K}^+$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=6-9$  pro Gruppe; *two-way ANOVA* mit Bonferroni Post-hoc-Test; \* $p < 0,05$  und \*\*\*\* $p < 0,0001$  Normaldiät vs. NaCl-Mangeldiät).

Am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät zeigte sich bei beiden Genotypen durch den länger andauernden NaCl-Mangel ebenfalls eine Reduktion der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Urinausscheidung (Abbildung 15), die zwischen den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht signifikant unterschiedlich war. Die mittlere Urinausscheidung von Na<sup>+</sup> betrug in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe  $1,9 \pm 0,4$  mM/mM (n=6) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe  $4,0 \pm 1,3$  mM/mM (n=6). Die *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere schieden im Mittel  $16,2 \pm 3,6$  mM/mM (n=7) an Cl<sup>-</sup> über den Urin aus und die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse  $13,8 \pm 1,0$  mM/mM (n=7). Die auf Kreatinin bezogene renale Ausscheidung von K<sup>+</sup> unterschied sich ebenso nicht signifikant zwischen den Genotypen. Bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren ergab sich eine mittlere K<sup>+</sup>-Urinausscheidung von  $26,4 \pm 2,6$  mM/mM (n=7) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen von  $36,5 \pm 5,5$  mM/mM (n=7).



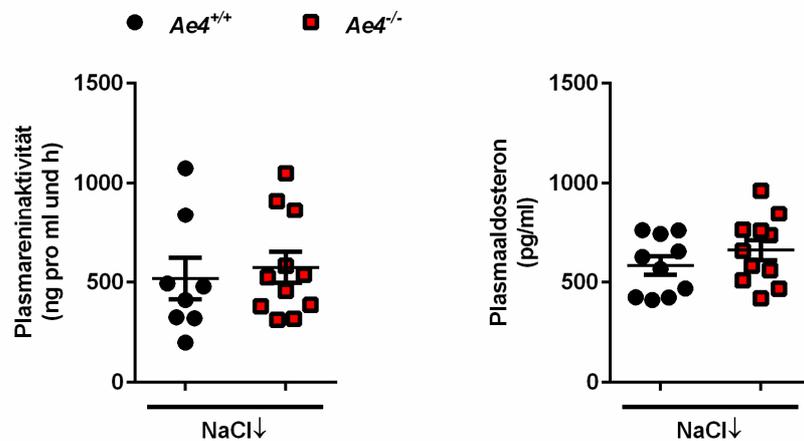
**Abbildung 15: Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät in der Dunkelphase (Tiere aktiv).** Sowohl die *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe als auch die *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe zeigte eine stark reduzierte Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ausscheidung über den Urin. Es waren zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der renalen Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ausscheidung zu beobachten. Die Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=6-7 pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.2.2 Kompensatorische Aktivierung des RAAS

Da keine Veränderung des Elektrolyt- und Volumenhaushalts durch die AE4-Defizienz trotz NaCl-Mangel nachgewiesen werden konnte, wurde das RAAS untersucht. Das Hormon Aldosteron ist bei NaCl-Mangel und Volumendepletion durch die vermehrte Reninfreisetzung normalerweise erhöht. Mit Hilfe der Bestimmung der Reninaktivität und der Aldosteronkonzentration im Plasma sollte bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen geklärt werden, ob ein vermehrter renaler Na<sup>+</sup>-Verlust möglicherweise durch eine stärkere Aktivierung des RAAS kompensiert wurde.

Die Hormonspiegel von Renin und Aldosteron erreichen wenige Stunden vor dem Erwachen der Tiere ihre Maxima. Daher erfolgte die Blutabnahme zur späteren Hormonbestimmung

kurz vor Beginn der Dunkelphase und somit vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere. Bei beiden Genotypen konnte aufgrund der NaCl-Mangeldiät eine Aktivierung des RAAS beobachtet werden (Abbildung 16). Sowohl die *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere als auch die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten eine hohe Reninaktivität und einen hohen Aldosteronspiegel im Plasma am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät. Die mittlere Reninaktivität war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Genotypen und betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren  $516,4 \pm 103,8$  ng pro ml und h (n=8) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen  $573,3 \pm 76,6$  ng pro ml und h (n=11). Auch die Aldosteronkonzentration im Plasma zeigte keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Genotypen. Sie belief sich in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Mittel auf  $582,3 \pm 45,6$  pg/ml (n=10) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe auf  $658,4 \pm 50,8$  pg/ml (n=11).



**Abbildung 16: Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät kurz vor Beginn der Dunkelphase.** Beide Genotypen wiesen aufgrund des NaCl-Mangels eine RAAS-Aktivierung auf. Die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten im Vergleich zu den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren keine höhere Plasmoreninaktivität (n=8-11 pro Gruppe) und ebenso keine höhere Plasmaaldosteronkonzentration (n=10-11 pro Gruppe) (Mittelwerte  $\pm$  SEM; Student's t-Test).

### 3.2.3 Kompensatorische Aktivierung anderer renaler Na<sup>+</sup>-Transportwege

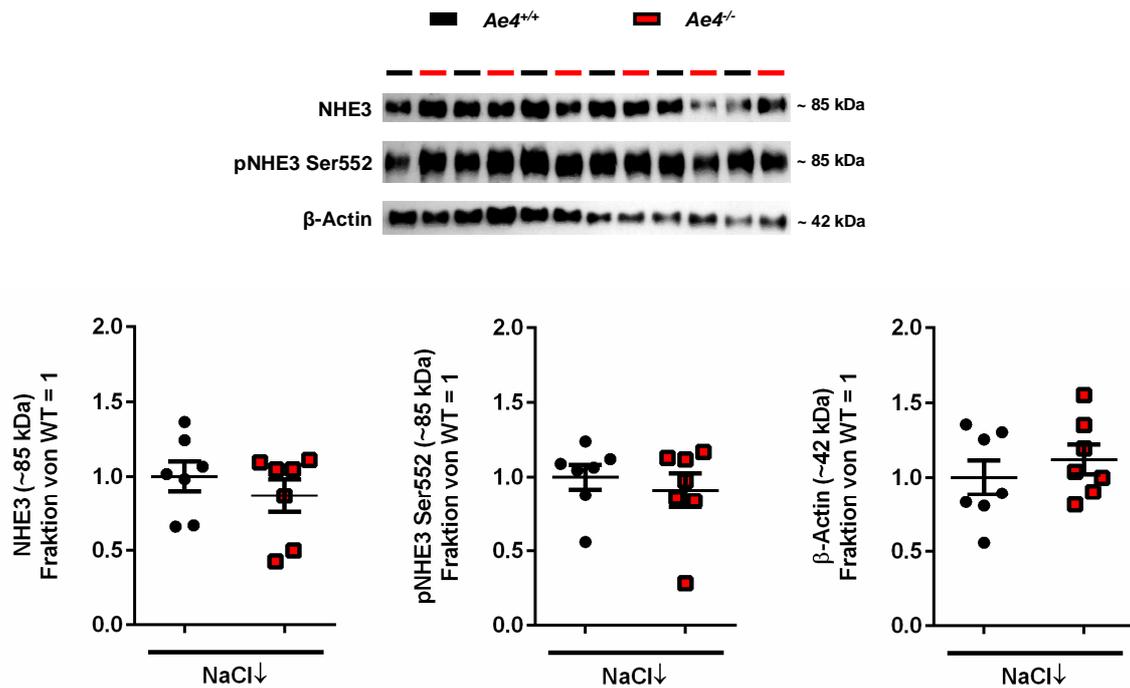
Da es bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Tieren bisher keine Indizien für eine Entgleisung der Na<sup>+</sup>-Balance unter NaCl-Mangel gab, wurde untersucht, ob andere Na<sup>+</sup>-Transportwege im proximalen Tubulus (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NHE3) oder im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter NCC und epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC) während der NaCl-Mangeldiät zur Kompensation der AE4-Defizienz vermehrt exprimiert oder aktiviert wurden. Dies erfolgte einerseits durch Analysen auf Proteinebene im Western Blot und andererseits durch funktionelle Tests mittels Blockade einzelner Transporter bzw. Kanäle mit Diuretika.

#### 3.2.3.1 Western Blot Analysen

Die Organentnahme der Nieren für die molekularbiologische Analyse im Western Blot erfolgte am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät kurz vor Beginn der Dunkelphase und somit vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere.

##### 3.2.3.1.1 NHE3 und pNHE3 Ser552

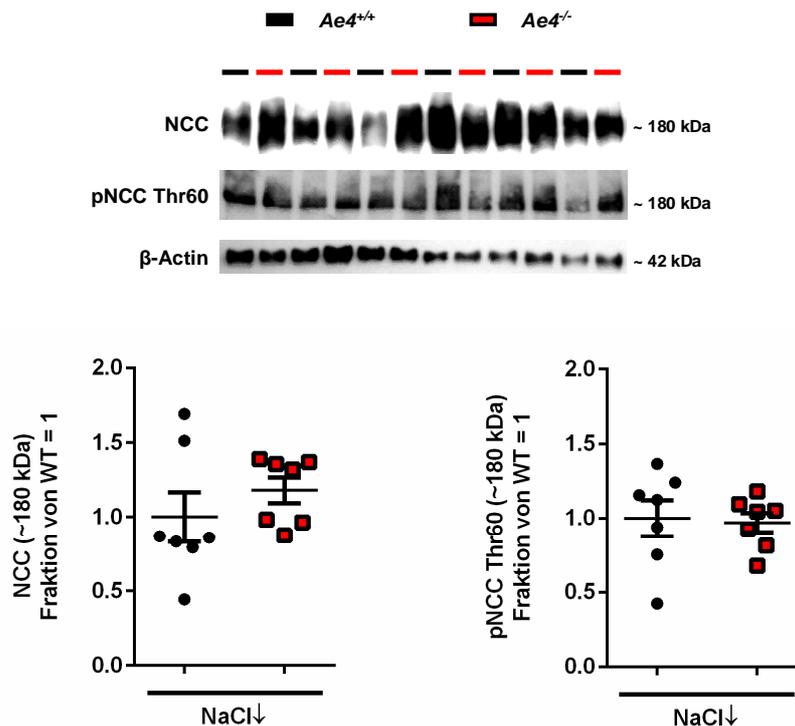
Die Proteinexpression des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters NHE3 (~85 kDa) sowie seiner phosphorylierten und somit aktivierten Form pNHE3 Ser552 (~85 kDa) in den proximalen Tubulusabschnitten des Nephrons waren beim Vergleich der beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich nach 10-tägiger NaCl-Mangeldiät (Abbildung 17). Die Werte der Proteinmenge wurden hier und im Folgenden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT (*Ae4<sup>+/+</sup>*) = 1) normiert. Die mittlere Proteinfraction des NHE3 betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren  $1,00 \pm 0,10$  (n=7) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen  $0,87 \pm 0,11$  (n=7). Die Proteinfraction des pNHE3 Ser552 belief sich in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Mittel auf  $1,00 \pm 0,08$  (n=7) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe auf  $0,91 \pm 0,12$  (n=7). Die Expression von  $\beta$ -Actin (~42 kDa) nach Membrananreicherung diente als Ladekontrolle und zeigte zwischen den Genotypen keinen signifikanten Unterschied. Die mittlere Proteinfraction von  $\beta$ -Actin ergab bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren  $1,00 \pm 0,12$  (n=7) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen  $1,12 \pm 0,10$  (n=7).



**Abbildung 17: Western Blots und Proteinexpression des NHE3 und pNHE3 Ser552 sowie des  $\beta$ -Actins von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Für die Western Blots von NHE3, pNHE3 Ser552 und  $\beta$ -Actin wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Expression des NHE3 (~85 kDa) und pNHE3 Ser552 (~85 kDa) war nach 10. Tagen NaCl-Mangel bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nicht signifikant gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren erhöht. Die Expression von  $\beta$ -Actin war ebenso nicht signifikant unterschiedlich. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT ( $Ae4^{+/+}$ ) = 1) normiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=7 pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.2.3.1.2 NCC und pNCC Thr60

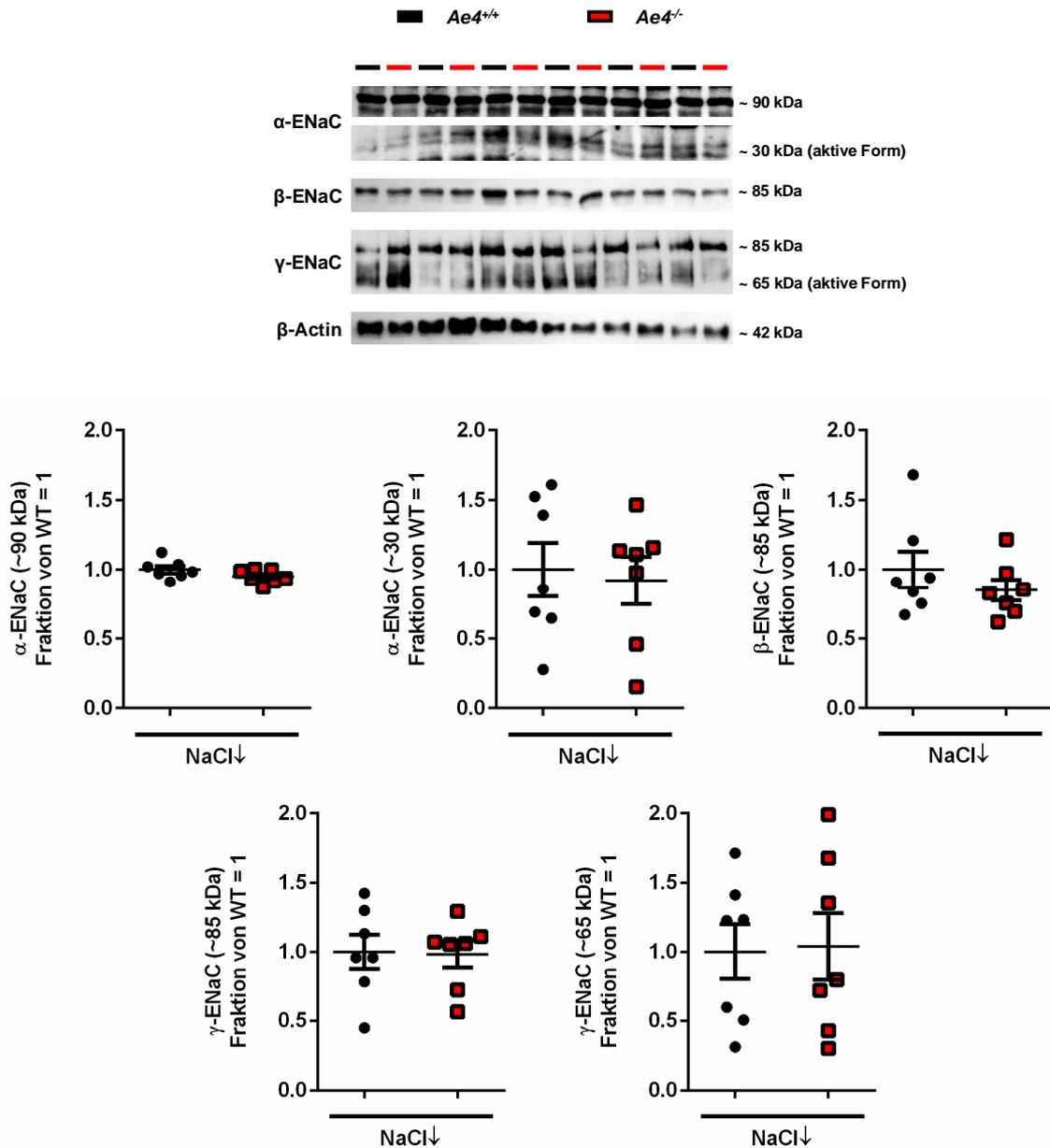
Bei der Analyse der Proteinmenge des Thiazid-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters NCC (~180 kDa) sowie seiner phosphorylierten und damit aktivierten Form pNCC Thr60 (~180 kDa) im distalen konvoluten Tubulus wurden keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät beobachtet (Abbildung 18). Die mittlere Proteinfraction von NCC belief sich in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe auf  $1,00 \pm 0,17$  (n=7) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe auf  $1,18 \pm 0,09$  (n=7). Die Proteinfraction des pNCC Thr60 betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren im Mittel  $1,00 \pm 0,12$  (n=7) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $0,97 \pm 0,07$  (n=7).



**Abbildung 18: Western Blots und Proteinexpression des NCC und pNCC Thr60 von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Für die Western Blots von NCC und pNCC Thr60 wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Proteinexpression des NCC (~180 kDa) und pNCC Thr60 (~180 kDa) war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT ( $Ae4^{+/+}$ ) = 1) normiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=7$  pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.2.3.1.3 ENaC

Western Blot Analysen erfolgten auch von der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals ENaC, der sich im ebenfalls im distalen konvoluten Tubulus und zudem in den Hauptzellen des Verbindungstubulus und Sammelrohrs befindet. Die Proteinlevel des  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC waren beim Vergleich der  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ae4^{-/-}$  Mäuse nach 10 Tagen NaCl-Mangeldiät nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 19). Die mittlere Proteinfraction der ungespaltenen Form des  $\alpha$ -ENaC (~90 kDa) betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $1,00 \pm 0,03$  ( $n=7$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $0,95 \pm 0,02$  ( $n=7$ ). Die Proteinfraction der aktiven Form des  $\alpha$ -ENaC (~30 kDa) belief sich bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren im Mittel auf  $1,00 \pm 0,19$  ( $n=7$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen auf  $0,92 \pm 0,17$  ( $n=7$ ). Die mittlere Proteinfraction des  $\beta$ -ENaC (~85 kDa) betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $1,00 \pm 0,13$  ( $n=7$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $0,85 \pm 0,07$  ( $n=7$ ). Bei der ungespaltenen Form des  $\gamma$ -ENaC (~85 kDa) wiesen die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere ein Mittel von  $1,00 \pm 0,12$  ( $n=7$ ) auf und die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse von  $0,98 \pm 0,09$  ( $n=7$ ). Die mittlere Proteinfraction der aktiven Form des  $\gamma$ -ENaC (~65 kDa) betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $1,00 \pm 0,20$  ( $n=7$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $1,04 \pm 0,24$  ( $n=7$ ).



**Abbildung 19: Western Blots und Proteinexpression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Für die Western Blots von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Proteinmengen der  $\alpha$ - (~90 und 30 kDa),  $\beta$ - (~85 kDa) und  $\gamma$ -Untereinheit (~85 und 65 kDa) des ENaC waren bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen unter NaCl-Mangel nicht signifikant höher als bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT (*Ae4<sup>+/+</sup>*) = 1) normiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=7 pro Gruppe; Student's t-Test).

Zusammenfassend zeigten die Analysen auf Proteinebene unter der NaCl-Mangeldiät keine erhöhte Aktivität anderer Na<sup>+</sup>-Transportwege zur Kompensation der AE4-Defizienz.

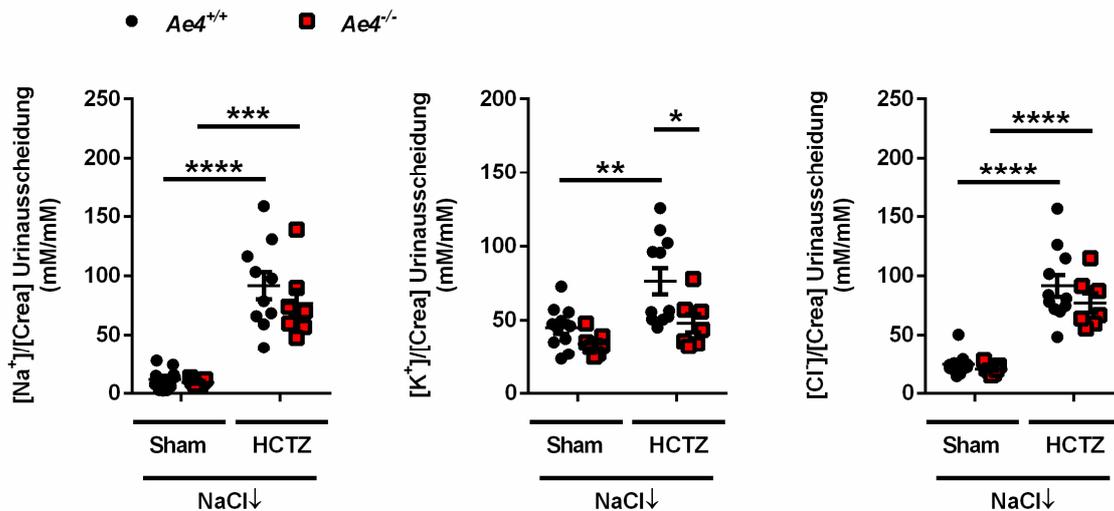
### 3.2.3.2 Blockade einzelner Transportwege mittels Diuretika

#### 3.2.3.2.1 HCTZ

Die Auswirkungen einer akuten Blockade des  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters NCC wurden am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät durch die Injektion (s.c.) des Diuretikums Hydrochlorothiazid (HCTZ) mit einer mittleren Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht untersucht. Unmittelbar nach der Injektion wurde der Urin der Tiere für 4 h gesammelt.

Die renal ausgeschiedene Menge an  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  als Antwort auf HCTZ war beim Vergleich der  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltiere und der  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 20). Die mittlere Urinausscheidung von  $\text{Na}^+$  betrug in der  $\text{Ae4}^{+/+}$ -Gruppe  $91,7 \pm 11,5$  mM/mM (n=10) und in der  $\text{Ae4}^{-/-}$ -Gruppe  $76,6 \pm 11,5$  mM/mM (n=7). Bei den  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltieren ergab sich im Mittel eine renale  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung von  $91,4 \pm 9,3$  mM/mM (n=11) und bei den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen von  $77,0 \pm 8,1$  mM/mM (n=7). Die Urinausscheidung von  $\text{K}^+$  war in der  $\text{Ae4}^{-/-}$ -Gruppe nach HCTZ-Gabe mit  $48,0 \pm 6,3$  mM/mM (n=7) signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ) gegenüber der  $\text{Ae4}^{+/+}$ -Gruppe, welche einen mittleren Wert von  $76,3 \pm 8,9$  mM/mM (n=11) aufwies.

Die tags zuvor erfolgte Sham-Injektion zeigte zwischen den Genotypen (n=7-11 pro Gruppe) im Mittel keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung der Urinelektrolyte  $\text{Na}^+$  ( $\text{Ae4}^{+/+}$ :  $11,7 \pm 2,9$  und  $\text{Ae4}^{-/-}$ :  $9,1 \pm 1,1$  mM/mM),  $\text{K}^+$  ( $\text{Ae4}^{+/+}$ :  $45,1 \pm 4,3$  und  $\text{Ae4}^{-/-}$ :  $33,9 \pm 2,9$  mM/mM) und  $\text{Cl}^-$  ( $\text{Ae4}^{+/+}$ :  $24,4 \pm 2,9$  und  $\text{Ae4}^{-/-}$ :  $20,4 \pm 1,7$  mM/mM).



**Abbildung 20: Antwort der Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid auf Hydrochlorothiazid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Bei beiden Genotypen wurde unter NaCl-Mangel keine signifikant unterschiedliche  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Urinausscheidung als Antwort auf HCTZ beobachtet. Die renale  $K^+$ -Ausscheidung wies bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nach HCTZ-Gabe eine signifikante Erniedrigung auf. Die mittlere Dosis betrug 10 mg/kg Körpergewicht. Die Urinausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$  war nach der am 10. Tag erfolgten Sham-Injektion nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Genotypen. Die  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=7-11$  pro Gruppe, *two-way ANOVA* mit Bonferroni Post-hoc-Test; \* $p<0,05$   $Ae4^{+/+}$  vs.  $Ae4^{-/-}$ ; \*\* $p<0,01$  sowie \*\*\* $p<0,001$  und \*\*\*\* $p<0,0001$  Sham vs. HCTZ).

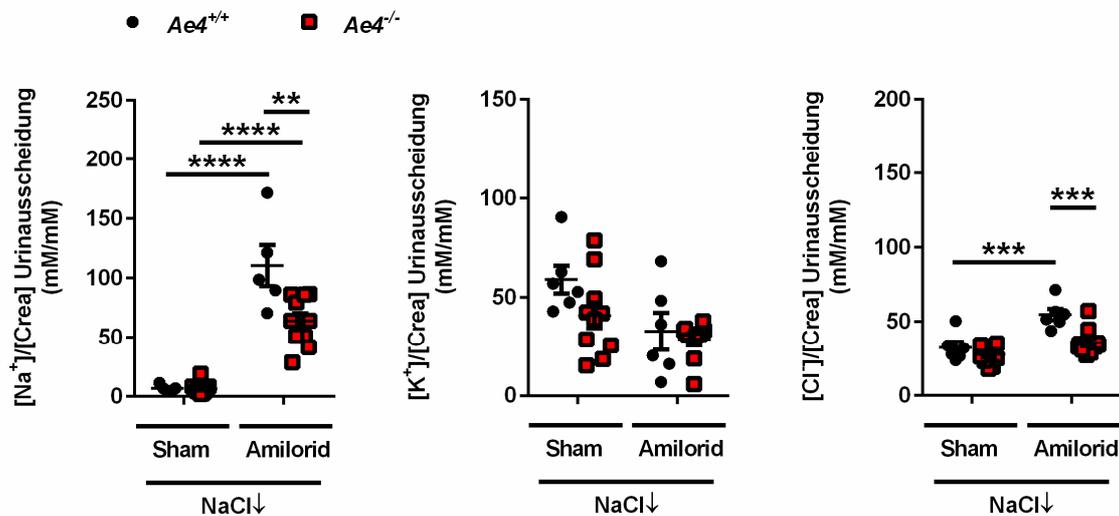
### 3.2.3.2.2 Amilorid

Die Auswirkungen einer akuten Blockade des epithelialen  $Na^+$ -Kanals ENaC wurden durch die subkutane Gabe des kaliumsparenden Diuretikums Amilorid am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät untersucht. Die mittlere Dosis betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren 1,50 mg/kg und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen 1,53 mg/kg Körpergewicht.

In Abbildung 21 ist die Elektrolytausscheidung im Urin graphisch dargestellt. Bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen induzierte die Gabe von Amilorid mit  $63,9 \pm 6,5$  mM/mM ( $n=10$ ) eine signifikant ( $p<0,01$ ) verminderte  $Na^+$ -Urinausscheidung gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren ( $110,4 \pm 17,3$  mM/mM;  $n=5$ ). Auch die Urinausscheidung von  $Cl^-$  war infolge der Amilorid-Gabe bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen mit  $36,0 \pm 2,8$  mM/mM ( $n=10$ ) gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren mit  $54,9 \pm 3,8$  mM/mM ( $n=6$ ) signifikant erniedrigt ( $p<0,001$ ). Bei der renalen  $K^+$ -Ausscheidung war nach Amilorid-Blockade keine signifikante Veränderung zwischen den beiden Genotypen feststellbar. Sie betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $32,7 \pm 9,3$  mM/mM ( $n=6$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $28,6 \pm 3,0$  mM/mM ( $n=10$ ).

Die am 10. Tag erfolgte Sham-Injektion zeigte zwischen den Genotypen im Mittel ( $n=5-10$  pro Gruppe) keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung der Urinelektrolyte  $Na^+$

( $Ae4^{+/+}$ :  $6,8 \pm 1,3$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $6,6 \pm 1,6$  mM/mM),  $K^+$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $58,9 \pm 6,9$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $40,8 \pm 6,5$  mM/mM) und  $Cl^-$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $32,6 \pm 3,9$  und  $Ae4^{-/-}$ :  $27,7 \pm 1,9$  mM/mM).



**Abbildung 21: Antwort der Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid auf Amilorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät.** Die natriuretische Antwort auf Amilorid war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Ebenso wurde in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe gegenüber der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe eine signifikante Erniedrigung der renalen  $Cl^-$ -Ausscheidung beobachtet. Bei der Urinausscheidung von  $K^+$  zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach Amilorid-Gabe. Die Dosis betrug 1,5 mg/kg Körpergewicht. Die Urinausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$  war nach der Sham-Injektion zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Die  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatinin-konzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=5-10$  pro Gruppe; two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test; \*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$   $Ae4^{+/+}$  vs.  $Ae4^{-/-}$ ; \*\*\* $p<0,001$  und \*\*\*\* $p<0,0001$  Sham vs. Amilorid).

Zusammenfassend wiesen die Daten der funktionellen Tests darauf hin, dass der NCC bei beiden Genotypen nach 11 Tagen NaCl-Mangel nicht unterschiedlich stark aktiviert war. Dies stimmt mit den Daten der Western Blot Analyse überein. Die Ergebnisse der ENaC-Blockade durch Amilorid sprachen wiederum dafür, dass entgegen der Ergebnisse im Western Blot, sogar eine niedrigere Aktivität des epithelialen  $Na^+$ -Kanals in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe vorlag.

### 3.2.4 Säure-Basen-Haushalt

Bei der Blutgasanalyse der Parameter des Säure-Basen-Haushalts (Tabelle 8) am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät konnte beim Vergleich der Genotypen keine signifikante Veränderung im pH-Wert nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung ( $p=0,2313$ ) des  $pCO_2$  verglichen mit den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren. Deutlichere Abweichungen zwischen den Genotypen ließen sich bei der Plasmakonzentration des  $(HCO_3^-)_{St}$  und beim BE beobachten: Die Konzentration des  $(HCO_3^-)_{St}$  im

Plasma der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe war gegenüber der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe signifikant erhöht ( $p=0,0107$ ). Ebenfalls war eine Erhöhung im BE ( $p=0,0103$ ) bei den  $Ae4^{-/-}$  Tieren im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren feststellbar.

Dies zeigte, dass die AE4-Defizienz unter einer NaCl-Mangeldiät zu einer Veränderung im Säure-Basen-Haushalt führt. Anhand der signifikant erniedrigten Plasmakonzentration von  $Cl^-$  und der signifikant erhöhten Plasmakonzentration von  $(HCO_3^-)_{st}$  konnte eine hypochlorämische metabolische Alkalose festgestellt werden.

**Tabelle 8: Säure-Basen-Status von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät**

Parameter im Plasma	$Ae4^{+/+}$		$Ae4^{-/-}$	
pH-Wert	7,41 ± 0,01	(n=15)	7,42 ± 0,01	(n=19)
pCO <sub>2</sub> , mmHg	39,2 ± 1,4	(n=15)	41,4 ± 1,2	(n=19)
[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] <sub>st</sub> , mmol/l	23,9 ± 0,5	(n=15)	25,9 ± 0,5*	(n=19)
BE, mmol/l	-0,1 ± 0,7	(n=15)	2,6 ± 0,7*	(n=19)

Der pH-Wert unterschied sich unter NaCl-Mangel nicht signifikant zwischen den beiden Genotypen. Dahingegen war der pCO<sub>2</sub> im Plasma bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen leicht, aber nicht signifikant gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren erhöht. Zudem ließ sich in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe im Vergleich zur  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe bei der Plasmakonzentration des  $(HCO_3^-)_{st}$  sowie beim BE eine signifikante Erhöhung feststellen (Mittelwerte ± SEM; n=15-19 pro Gruppe; Student's t-Test; \* $p<0,05$ ).

Nach Berücksichtigung aller Ergebnisse unter der NaCl-Mangeldiät zeigte sich, dass die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse trotz längerem NaCl-Mangel keine Einschränkungen in der Na<sup>+</sup>-Balance und im Volumenhaushalt entwickelten. Jedoch wurde in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe eine hypochlorämische metabolische Alkalose beobachtet.

### 3.3 NaCl-Mangeldiät und NH<sub>4</sub>Cl

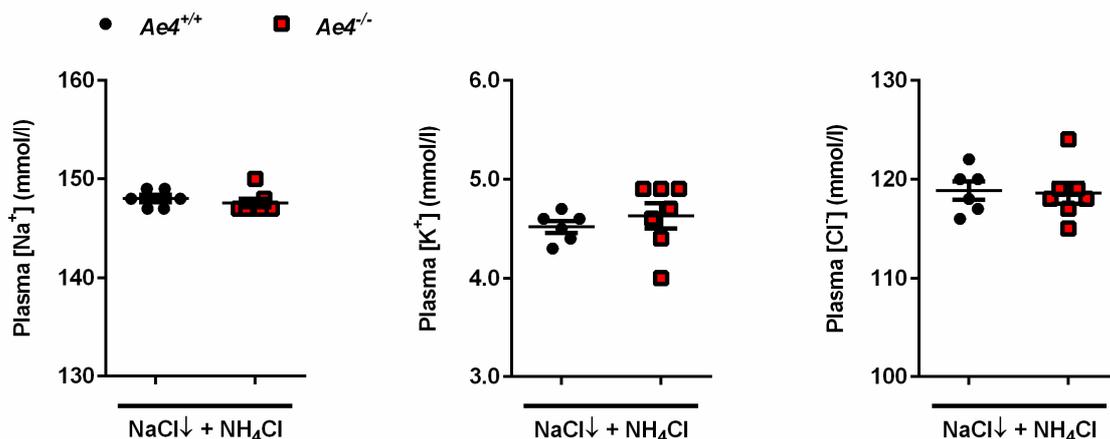
Die unter der NaCl-Mangeldiät aufgetretene hypochlorämische metabolische Alkalose konnte entweder durch den Na<sup>+</sup>- oder Cl<sup>-</sup>-Mangel oder durch beide Faktoren verursacht worden sein. Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, in welchen der Cl<sup>-</sup>-Mangel durch Zufuhr von Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) übers Trinkwasser ausgeglichen werden sollte. Zusätzlich erfolgte durch die NH<sub>4</sub>Cl-Gabe eine Säurebelastung (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Ziel war es bei den Versuchstieren unter der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit NH<sub>4</sub>Cl einen Na<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Mangel herbeizuführen. Wenn der AE4 die bislang in der Literatur diskutierte Funktion als Na<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorptionsweg in den β-Schaltzellen des ASDN aufweist, sollten sich schlussfolgernd bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen unter diesen Bedingungen Einschränkungen bei der Aufrechterhaltung der Na<sup>+</sup>-Balance und des Säure-Base-Haushalts ergeben.

Aufgrund von Literaturangaben wurde bei der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung eine Molarität von 280 mM gewählt (Wagner *et al.*, 2002; Quentin *et al.*, 2004). Da die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung einen bitteren Geschmack aufwies und es deshalb zur verminderten Flüssigkeitsaufnahme hätte führen können, wurden der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung Süßstofftabletten hinzugegeben. Zur Kontrolle einer ausreichenden Flüssigkeitsaufnahme wurden die Trinkmengen der  $\text{Ae4}^{+/+}$  und  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse im Versuch regelmäßig kontrolliert. Die  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltiere nahmen im Mittel  $4,9 \pm 0,3$  ml/Tag ( $n=7$ ) und die  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse  $4,9 \pm 0,2$  ml/Tag ( $n=7$ ) an  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung auf. Die ausreichende und gleiche Flüssigkeitsaufnahme war eine wichtige Voraussetzung für die Versuche, um eine gleich hohe  $\text{NH}_4^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme zu gewährleisten.

### 3.3.1 Elektrolyt- und Volumenhaushalt

#### 3.3.1.1 Plasmaelektrolyte

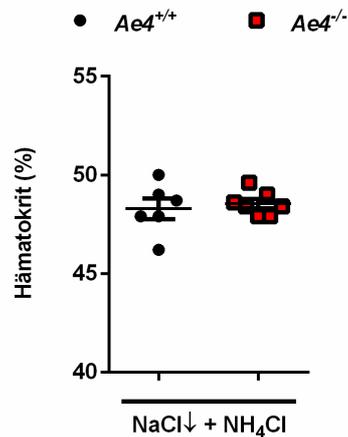
Nach der Blutgasanalyse am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät und  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Gabe (Abbildung 22) zeigte sich im Plasmaspiegel von  $\text{Na}^+$  kein signifikanter Unterschied zwischen den  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltieren ( $148,0 \pm 0,4$ ;  $n=6$ ) und den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen ( $147,6 \pm 0,4$ ;  $n=7$ ). Die Konzentrationen der Plasmaelektrolyte  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  waren beim Vergleich der beiden Genotypen ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Die mittlere Plasmakonzentration von  $\text{K}^+$  betrug in der  $\text{Ae4}^{+/+}$ -Gruppe  $4,5 \pm 0,1$  mmol/l ( $n=6$ ) und in der  $\text{Ae4}^{-/-}$ -Gruppe  $4,6 \pm 0,1$  mmol/l ( $n=7$ ). Bei den  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltieren ergab sich im Mittel eine  $\text{Cl}^-$ -Konzentration im Plasma von  $118,8 \pm 0,9$  mmol/l ( $n=6$ ) und bei den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen von  $118,6 \pm 1,0$  mmol/l ( $n=7$ ).



**Abbildung 22:** Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $\text{Ae4}^{+/+}$  und  $\text{Ae4}^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Weder bei den Plasmaelektrolytkonzentrationen von  $\text{Na}^+$  noch von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  wurden unter der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  signifikante Unterschiede zwischen den  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltieren und  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen festgestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=6-7$  pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.3.1.2 Hämatokrit

Der bei der Blutgasanalyse bestimmte Hämatokrit der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe ( $48,5 \pm 0,2 \%$ ;  $n=7$ ) wies im Mittel keinen signifikanten Unterschied zu dem der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe ( $48,3 \pm 0,5 \%$ ;  $n=6$ ) am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit  $NH_4Cl$ -Gabe auf (Abbildung 23). Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine Volumenabnahme bei den  $Ae4^{-/-}$  Tieren.



**Abbildung 23: Hämatokrit von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit  $NH_4Cl$ .** Der Hämatokrit war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=6-7$  pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.3.2 Säure-Basen-Haushalt

Bei der Analyse der Parameter des Säure-Basen-Haushalts (Tabelle 9) zeigten sich in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe keine Anzeichen einer Säure-Basen-Störung aufgrund der Säurebelastung mit  $NH_4^+$ . Der pH-Wert und die Konzentration des  $(HCO_3^-)_{st}$  waren beim Vergleich der Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Auch der BE zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen. Auffällig war dahingegen die signifikante Veränderung im  $pCO_2$ . Die Säurebelastung ( $[H^+] \uparrow$ ) durch  $NH_4^+$  hat sowohl bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren als auch bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen ein Absenken des  $pCO_2$  hervorgerufen. Dies zeigt der Vergleich des  $pCO_2$  der Versuchstiere unter der NaCl-Mangeldiät mit  $NH_4Cl$  ( $Ae4^{+/+}$ :  $32,2 \pm 0,8$  mmHg,  $Ae4^{-/-}$ :  $34,2 \pm 0,5$  mmHg) mit dem unter der Normaldiät (Tabelle 7 unter 3.1.2:  $37,2$  mmHg) bzw. der NaCl-Mangeldiät (Tabelle 8 unter 3.2.4:  $39,2 - 41,4$  mmHg). Somit wiesen beide Genotypen eine respiratorische Antwort auf die Säurebelastung durch  $NH_4^+$  auf, die zur Normalisierung des pH-Wertes trotz metabolischer Belastung beiträgt.

Auffallend war, dass die  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe sogar eine signifikant stärkere Erniedrigung des  $pCO_2$  ( $p=0,0474$ ) gegenüber der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe aufwies. Somit benötigten die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse eine geringere respiratorische sekundäre Antwort zur Normalisierung des pH-Wertes als die

$Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere. Folglich war die Kapazität zur renalen  $H^+$ -Ausscheidung und der damit verbundenen Kapazität zur  $HCO_3^-$ -Rückresorption in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe nicht verringert.

**Tabelle 9: Säure-Basen-Status von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit  $NH_4Cl$**

Parameter im Plasma	$Ae4^{+/+}$	$Ae4^{-/-}$
pH-Wert	7,37 ± 0,04 (n=6)	7,36 ± 0,02 (n=7)
pCO <sub>2</sub> , mmHg	32,2 ± 0,8 (n=6)	34,2 ± 0,5* (n=7)
[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] <sub>st</sub> , mmol/l	19,0 ± 1,2 (n=6)	19,1 ± 1,0 (n=7)
BE, mmol/l	-6,6 ± 1,7 (n=6)	-6,2 ± 1,5 (n=7)

Der pH-Wert und die Konzentration des  $(HCO_3^-)_{st}$  im Plasma waren bei beiden Genotypen gleich. Der Partialdruck von  $CO_2$  war bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren gegenüber den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen signifikant erniedrigt. Der BE wies beim Vergleich beider Gruppen keine signifikante Veränderung auf (Mittelwerte ± SEM; n=6-7 pro Gruppe; Student's t-Test; \*p<0,05).

Die Ergebnisse unter der NaCl-Mangeldiät und  $NH_4Cl$ -Gabe zeigten, dass die  $Ae4$ -Gendefizienz zu keiner Entgleisung der  $Na^+$ -Balance, Volumen- und Säure-Basen-Homöostase führte. Es war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen einzig eine respiratorische Kompensation aufgrund der Säurebelastung zu beobachten, die bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren zudem noch ausgeprägter war. Dies sprach dafür, dass der  $Ae4$  Knockout in der renalen Rückresorption von  $HCO_3^-$  nicht eingeschränkt war. Im Falle einer verringerten  $HCO_3^-$ -Rückresorption hätten die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse einen stärkeren pCO<sub>2</sub>-Abfall (stärkere Hyperventilation) aufweisen müssen als die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere, um den pH-Abfall zu kompensieren.

### 3.4 NaCl-Mangeldiät und $NaHCO_3$

Aufgrund der Daten der Versuche unter der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit  $NH_4Cl$  lag die Vermutung nahe, dass die unter der NaCl-Mangeldiät zu beobachtende hypochlorämische metabolische Alkalose am  $Cl^-$ -Mangel liegen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, erhielten die Tiere eine NaCl-Mangeldiät in Kombination mit  $NaHCO_3$  übers Trinkwasser. Hierdurch sollte ein  $Cl^-$ -Mangel und eine Basenbelastung bei den Versuchstieren erzielt werden, wohingegen der  $Na^+$ -Mangel durch die Zufuhr von  $NaHCO_3$  ausgeglichen werden sollte.

Aufgrund von Literaturangaben wurde bei der  $NaHCO_3$ -Lösung eine Konzentration von 280 mM gewählt (Wagner *et al.*, 2002; Quentin *et al.*, 2004). Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere nahmen im Mittel 5,8 ± 0,3 ml/Tag (n=5) und die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse 6,5 ± 0,5 ml/Tag (n=3) an 280 mM  $NaHCO_3$ -Lösung übers Trinkwasser auf. Nach wenigen Tagen NaCl-Mangeldiät mit 280 mM  $NaHCO_3$  waren jedoch bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen teils starke Gewichtsabnahmen

( $p=0,0040$ ) und ein schlechtes Allgemeinbefinden zu beobachten. Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere zeigten weiterhin ein gutes Allgemeinbefinden und keine bis nur leichte Abnahmen des Gewichts aufgrund der Futterumstellung. Die mittlere Gewichtsentwicklung betrug in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $-1,0 \pm 1,6 \%$  ( $n=5$ ) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $-17,4 \pm 3,9 \%$  ( $n=4$ ) und war signifikant unterschiedlich ( $p=0,0040$ ). Um einer möglichen Gewichtsreduktion von mehr als 20 % und damit einem vorzeitigen Versuchsabbruch entgegenzuwirken, erhielten alle Mäuse daraufhin zur Energieversorgung am 5. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$  ein Schälchen mit in 5 %iger Glucoselösung eingeweichten Pellets.

### 3.4.1 Elektrolyt- und Volumenhaushalt

#### 3.4.1.1 Plasmaelektrolyte

Der schlechte Zustand der  $Ae4^{-/-}$  Tiere schlug sich auch bei den in der Blutgasanalyse bestimmten Konzentrationen der Plasmaelektrolyte nach 7 Tagen NaCl-Mangeldiät mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$  nieder (Tabelle 10). Die mittlere Plasmakonzentration von  $\text{Cl}^-$  war in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe stark und signifikant erniedrigt ( $p<0,0001$ ). Auch die  $\text{K}^+$ -Konzentration im Plasma zeigte bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren eine signifikante Erniedrigung ( $p=0,0217$ ). Demgegenüber war die Plasmakonzentration von  $\text{Na}^+$  zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

**Tabelle 10: Konzentrationen der Plasmaelektrolyte von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$**

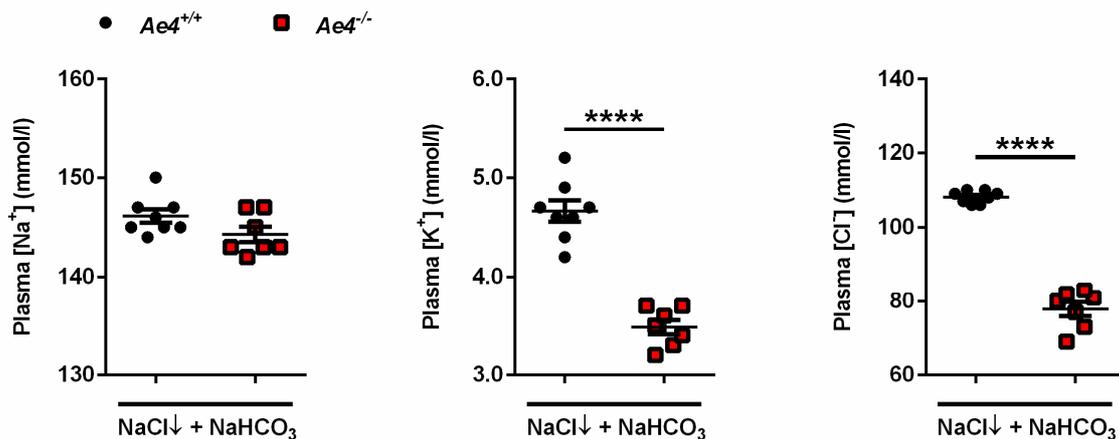
Plasmaelektrolyte	$Ae4^{+/+}$	$Ae4^{-/-}$
$[\text{Na}^+]$ , mmol/l	$146,2 \pm 0,8$ (n=5)	$144,0 \pm 0,4$ (n=4)
$[\text{K}^+]$ , mmol/l	$4,0 \pm 0,1$ (n=5)	$3,1 \pm 0,3^*$ (n=4)
$[\text{Cl}^-]$ , mmol/l	$105,8 \pm 1,5$ (n=5)	$71,8 \pm 3,9^{****}$ (n=4)

Die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse zeigten eine signifikante Erniedrigung der  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration. Die Plasmakonzentration von  $\text{Na}^+$  wies hingegen zwischen den Genotypen keinen signifikanten Unterschied auf (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=4-5$  pro Gruppe; Student's t-Test; \* $p<0,05$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ ).

Da es bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren bei der gewählten Molarität für  $\text{NaHCO}_3$  von 280 mM zu erheblichen Auswirkungen kam und sogar eine Intervention mit Glucoselösung erfolgen musste, wurde die Blutgasanalyse bei einer niedrigeren Molarität von 230 mM wiederholt. Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere nahmen während der Versuche im Mittel  $6,3 \pm 0,9$  ml/Tag ( $n=7$ ) und die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse  $5,8 \pm 0,6$  ml/Tag ( $n=7$ ) an 230 mM  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung übers Trinkwasser auf. Daraufhin war eine nicht so starke Gewichtsreduktion zu beobachten, wie bei den Versuchen mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$  festgestellt

wurde (siehe 3.4). Die mittlere Gewichtsentwicklung unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> belief sich in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe auf 1,1 ± 1,8 % (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe auf -8,0 ± 1,7 % (n=9) und war signifikant unterschiedlich (p=0,0019) zwischen den Genotypen. Aufgrund der besseren Verträglichkeit wurde die 230 mM NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auch für die weiteren Versuche eingesetzt.

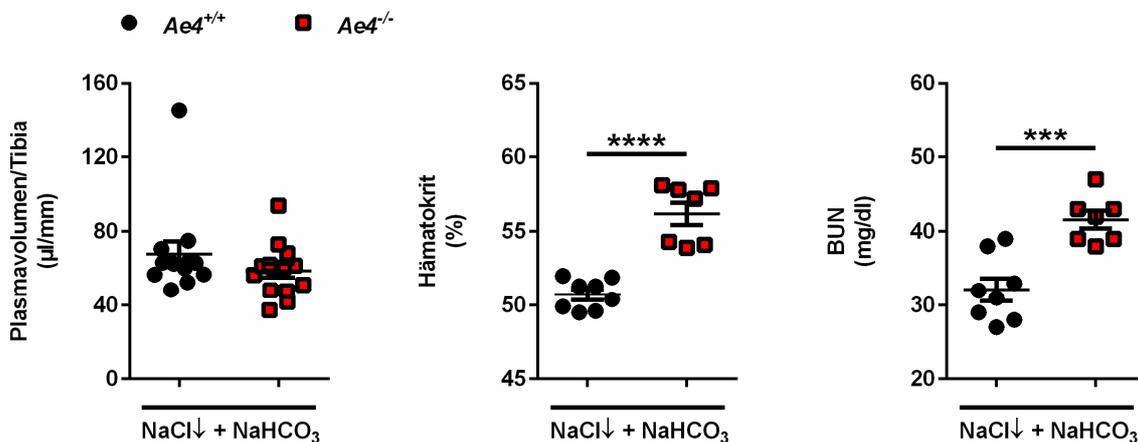
Wie in Abbildung 24 ersichtlich, zeigte sich unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der Plasmakonzentrationen von K<sup>+</sup> (p<0,0001) und Cl<sup>-</sup> (p<0,0001). Die mittlere K<sup>+</sup>-Konzentration im Plasma betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren 4,7 ± 0,1 mmol/l (n=8) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen 3,5 ± 0,1 mmol/l (n=7). In der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe ergab sich im Mittel eine Cl<sup>-</sup>-Plasmakonzentration von 108,1 ± 0,6 mmol/l (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe von 77,9 ± 2,0 mmol/l (n=7). Die Konzentration von Na<sup>+</sup> unterschied sich dahingegen nicht signifikant zwischen den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren (146,1 ± 0,7 mmol/l; n=8) und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen (144,3 ± 0,8 mmol/l; n=7), wie es schon unter 280 mM NaHCO<sub>3</sub> zu beobachten war.



**Abbildung 24:** Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub>. Die Konzentration von Na<sup>+</sup> im Plasma war zwischen den beiden Genotypen nicht unterschiedlich. Im Gegensatz dazu war die K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Plasmakonzentration der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse verglichen mit den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren signifikant erniedrigt (Mittelwerte ± SEM; n=7-8 pro Gruppe; Student's t-Test; \*\*\*\*p<0,0001).

### 3.4.1.2 Plasmavolumen, Hämatokrit und BUN

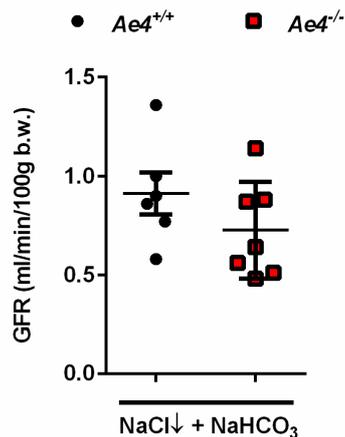
Das Plasmavolumen zeigte am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 25). Das jeweils auf die Tibialänge normierte mittlere Plasmavolumen belief sich bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren auf  $67,8 \pm 6,8 \mu\text{l}/\text{mm}$  (n=13) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen auf  $58,8 \pm 3,8 \mu\text{l}/\text{mm}$  (n=14). Im Gegensatz dazu war der mittlere Hämatokrit der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe mit  $56,2 \pm 0,7 \%$  (n=7) im Vergleich zur *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe mit  $50,7 \pm 0,4 \%$  (n=8) signifikant erhöht (p<0,0001). Hinzu kam eine signifikante Erhöhung der Konzentration des BUN (p=0,0004) bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen. Die BUN-Konzentration betrug in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Mittel  $32,1 \pm 1,6$  (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe  $41,6 \pm 1,2$  (n=7). Somit lieferten der erhöhte Hämatokrit und die BUN-Konzentration bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen Hinweise auf eine Volumenabnahme, wobei dies anhand des ermittelten Plasmavolumens nicht erkennbar war.



**Abbildung 25: Plasmavolumen, Hämatokrit und Konzentration des BUN von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub>.** Das Plasmavolumen (n=13-14 pro Gruppe), welches zur Tibialänge ins Verhältnis gesetzt wurde, war zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Demgegenüber zeigten der Hämatokrit und die BUN-Konzentration (n=7-8 pro Gruppe) der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse verglichen mit den Ergebnissen der *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere eine signifikante Erhöhung (Mittelwerte  $\pm$  SEM; Student's t-Test; \*\*\*p<0,001 und \*\*\*\*p<0,0001).

### 3.4.1.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die GFR wurde am 6. Tag der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> gemessen und zeigte zwischen den Genotypen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 26). Sie betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren im Mittel bezogen auf 100 g Körpergewicht  $0,91 \pm 0,11 \text{ ml}/\text{min}$  (n=6) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen  $0,73 \pm 0,09 \text{ ml}/\text{min}$  (n=7).



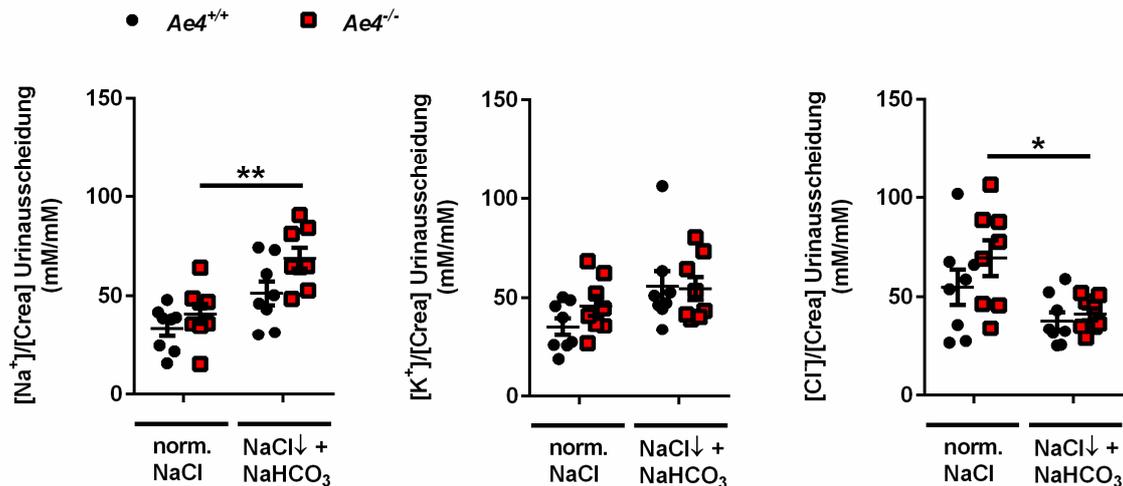
**Abbildung 26: Glomeruläre Filtrationsrate von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 6. Tag der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub>.** Die GFR war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Mittelwerte ± SEM; n=6-7 pro Gruppe; Student's t-Test).

#### 3.4.1.4 Urinelektrolyte unter Diätwechsel und nach 7 Tagen

Der Urin wurde bei den Versuchen zum Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> übers Trinkwasser wieder in der Dunkelphase und damit Aktivitätsphase gesammelt. Hierfür wurden die Mäuse, wie unter 3.2.1.4 beschrieben, für jeweils 4 h vor und 20 h nach Diätwechsel in den metabolischen Käfig gesetzt.

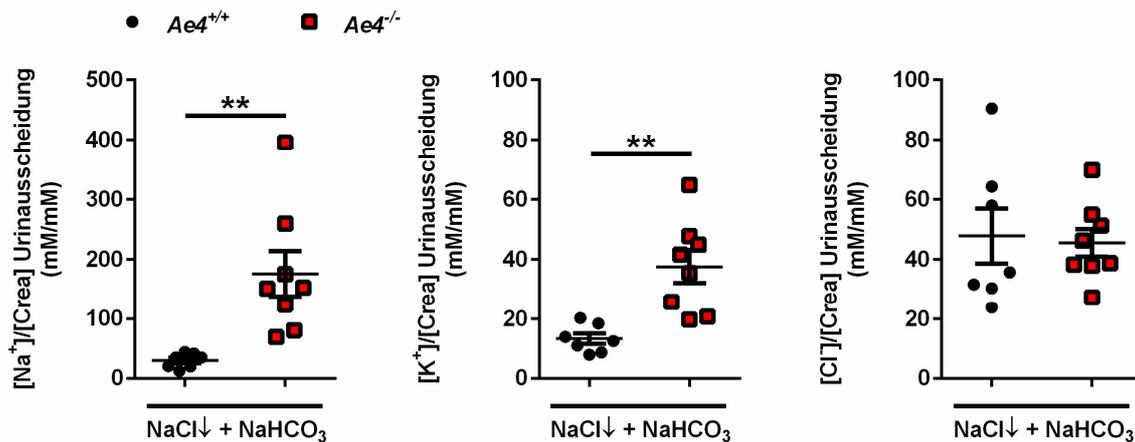
Die Urinausscheidung von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> zeigte vor dem Diätwechsel in der *Ae4<sup>+/+</sup>*- und *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe ähnliche Werte wie vor dem Diätwechsel auf die NaCl-Mangeldiät (3.2.1.4): Die Genotypen (n=8 pro Gruppe) wiesen keinen signifikanten Unterschied in der mittleren Urinausscheidung von Na<sup>+</sup> (*Ae4<sup>+/+</sup>*: 33,5 ± 4,0 und *Ae4<sup>-/-</sup>*: 41,0 ± 5,0 mM/mM) sowie K<sup>+</sup> (*Ae4<sup>+/+</sup>*: 35,3 ± 4,4 und *Ae4<sup>-/-</sup>*: 45,8 ± 5,0 mM/mM) und Cl<sup>-</sup> (*Ae4<sup>+/+</sup>*: 54,8 ± 8,9 und *Ae4<sup>-/-</sup>*: 69,5 ± 8,9 mM/mM) auf (Abbildung 27).

Nach dem Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> war die renale Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ausscheidung zwischen den Genotypen ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 27). Die mittlere Urinausscheidung von Na<sup>+</sup> belief sich bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren auf 51,3 ± 6,0 mM/mM (n=8) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen auf 68,9 ± 5,3 mM/mM (n=8). In der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe zeigte sich eine mittlere K<sup>+</sup>-Urinausscheidung von 55,6 ± 7,8 mM/mM (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe von 54,5 ± 5,7 mM/mM (n=8). Die renale Ausscheidung von Cl<sup>-</sup> betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren im Mittel 37,9 ± 4,4 mM/mM (n=8) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen 41,2 ± 3,0 mM/mM (n=8).



**Abbildung 27: Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter der Normaldiät und 20 h nach dem Wechsel auf die NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  in der Dunkelphase (Tiere aktiv).** Die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung war zwischen den Genotypen unter der Normaldiät nicht signifikant unterschiedlich. Nach dem Wechsel auf die NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  zeigte die renale Ausscheidung von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Gruppen. Die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=8$  pro Gruppe; *two-way ANOVA* mit Bonferroni Post-hoc-Test; \* $p<0,05$  und \*\* $p<0,01$  Normaldiät vs. NaCl-Mangeldiät mit  $\text{NaHCO}_3$ ).

Nach 7 Tagen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  war in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe im Vergleich zur  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe eine signifikant erhöhte  $\text{Na}^+$ -Urinausscheidung ( $p=0,0033$ ) feststellbar (Abbildung 28). Die mittlere renale  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung belief sich bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren auf  $30,0 \pm 4,6$  mM/mM ( $n=7$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen auf  $175,8 \pm 37,6$  mM/mM ( $n=8$ ). Hinzu kam eine signifikante Erhöhung der mittleren  $\text{K}^+$ -Urinausscheidung ( $p=0,0015$ ) in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe ( $37,5 \pm 5,4$  mM/mM;  $n=8$ ) verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe ( $13,3 \pm 1,8$  mM/mM;  $n=7$ ). Im Gegensatz dazu unterschied sich die renale  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung nicht signifikant zwischen den Genotypen. Die  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltiere schieden im Mittel  $47,7 \pm 9,1$  mM/mM ( $n=7$ ) an  $\text{Cl}^-$  über den Urin aus und die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse  $45,5 \pm 4,6$  mM/mM ( $n=8$ ).



**Abbildung 28:** Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  in der Dunkelphase (Tiere aktiv). Die  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte renale  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ausscheidung gegenüber der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe. Die  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung wies keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Genotypen auf. Die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ins Verhältnis gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=7-8$  pro Gruppe; Student's t-Test;  $**p<0,01$ ).

### 3.4.2 Säure-Basen-Haushalt

Bei den Parametern des Säure-Basen-Haushalts (Tabelle 11) konnten nach 7 Tagen NaCl-Mangeldiät und  $\text{NaHCO}_3$ -Gabe mit einer Molarität von 280 mM beim Vergleich der Genotypen ebenfalls deutliche Veränderungen festgestellt werden, wie sie zuvor schon bei den Plasmaelektrolyten mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$  ersichtlich waren. Zu beachten ist, dass vor der Blutgasanalyse die unter 3.4 schon erwähnte Intervention mit in Glucoselösung eingeweichten Pellets erfolgte. Der pH-Wert war in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe gegenüber der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe signifikant erhöht ( $p=0,0006$ ) ebenso wie der  $p\text{CO}_2$  ( $p=0,0008$ ). Eine signifikante Erhöhung zeigten auch die Plasmakonzentration des  $(\text{HCO}_3^-)_{\text{st}}$  ( $p=0,0002$ ) und der BE ( $p=0,0001$ ).

**Tabelle 11:** Säure-Basen-Status von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 280 mM  $\text{NaHCO}_3$

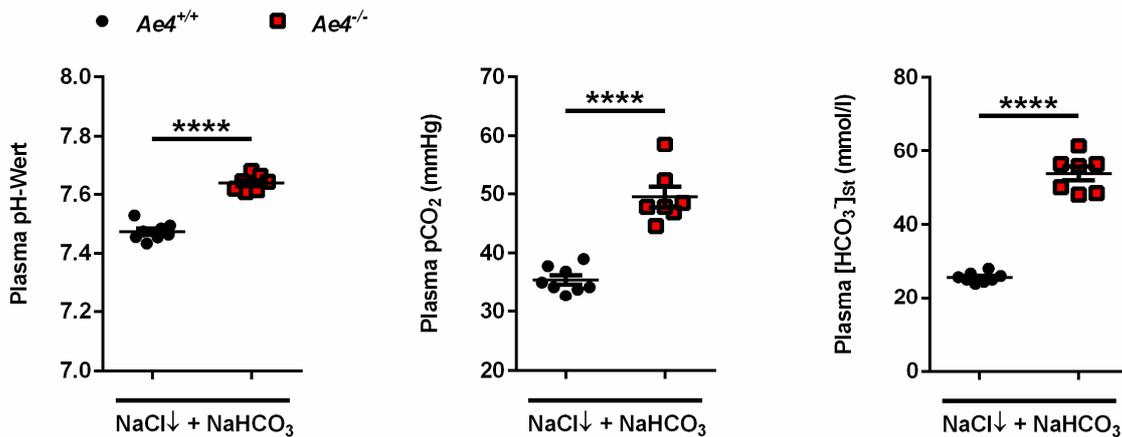
Parameter im Plasma	$Ae4^{+/+}$	$Ae4^{-/-}$
pH-Wert	7,49 $\pm$ 0,02 (n=5)	7,62 $\pm$ 0,01*** (n=4)
$p\text{CO}_2$ , mmHg	39,2 $\pm$ 2,0 (n=5)	57,4 $\pm$ 2,6*** (n=4)
$[\text{HCO}_3^-]_{\text{st}}$ , mmol/l	29,2 $\pm$ 1,2 (n=5)	60,7 $\pm$ 4,9*** (n=4)
BE, mmol/l	6,2 $\pm$ 1,4 (n=5)	37,2 $\pm$ 4,1*** (n=4)

Sowohl der pH-Wert als auch der  $p\text{CO}_2$ , die Konzentration des  $(\text{HCO}_3^-)_{\text{st}}$  und der BE waren in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe signifikant erhöht (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=4-5$  pro Gruppe; Student's t-Test;  $***p<0,001$ ).

Unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> wiesen alle Parameter des Säure-Basen-Haushalts zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede auf (Abbildung 29). Der mittlere pH-Wert der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse ( $7,64 \pm 0,01$ ; n=7) war gegenüber dem der *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere ( $7,47 \pm 0,01$ ; n=8) signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). In der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe war zudem mit  $49,5 \pm 1,7$  mmHg (n=7) eine signifikante Erhöhung des mittleren pCO<sub>2</sub> ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe mit  $35,5 \pm 0,8$  mmHg (n=8) zu beobachten. Auch die Plasmakonzentration des (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>st</sub> und der BE waren bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,0001$ ). Die mittlere Konzentration des (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>st</sub> im Plasma betrug bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren  $25,6 \pm 0,5$  mmol/l (n=8) und bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen  $53,7 \pm 1,9$  mmol/l (n=7). In der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe ergab sich im Mittel ein BE von  $2,4 \pm 0,6$  mmol/l (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe von  $32,0 \pm 1,8$  mmol/l (n=7).

Aufgrund der AE4-Defizienz kam es somit unter der NaCl-Mangeldiät mit NaHCO<sub>3</sub> im Trinkwasser zu einer erheblichen Säure-Basen-Störung. Die *Ae4<sup>-/-</sup>* Tiere entwickelten eine hypochlorämische metabolische Alkalose ([HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>st</sub> und BE erhöht), die bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren nicht zu beobachten war. Zusätzlich hat die Basenbeladung durch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen im Vergleich zu den *Ae4<sup>+/+</sup>* einen signifikanten Anstieg des pCO<sub>2</sub> hervorgerufen.

Der pCO<sub>2</sub> der *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> war indes nicht erhöht gegenüber dem pCO<sub>2</sub> der *Ae4<sup>+/+</sup>* Tiere unter der Normaldiät (Tabelle 7 unter 3.1.2: 37,2 mmHg) oder der NaCl-Mangeldiät (Tabelle 8 unter 3.2.4: 39,2 mmHg). Somit wird ersichtlich, dass die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse, jedoch nicht die *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltiere, aufgrund der Basenbeladung durch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> eine starke respiratorische Sekundärantwort (Hypoventilation) zeigten. Trotz der starken Erhöhung des pCO<sub>2</sub> auf 49,5 mmHg wurde der pH-Wert bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen dennoch nicht auf Normalwerte gesenkt. Es lag also eine respiratorisch nur teilkompensierte metabolische Alkalose vor. Dies zeigte, dass die AE4-defizienten Tiere nicht in der Lage waren, die orale HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Beladung renal in ausreichender Menge auszuscheiden.



**Abbildung 29: pH-Wert, Partialdruck von Kohlenstoffdioxid und Konzentration des Standardbikarbonats im Plasma von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$ .** Bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen war im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Tieren sowohl eine signifikante Erhöhung des pH-Werts als auch des  $\text{pCO}_2$  im Plasma zu beobachten. Ebenso war die Plasmakonzentration des  $(\text{HCO}_3^-)_{\text{st}}$  bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren signifikant erhöht (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=7-8$  pro Gruppe; Student's t-Test; \*\*\*\* $p<0,0001$ ).

### 3.4.3 Mögliche Ursache der Alkalose von $Ae4^{-/-}$ durch NHE3

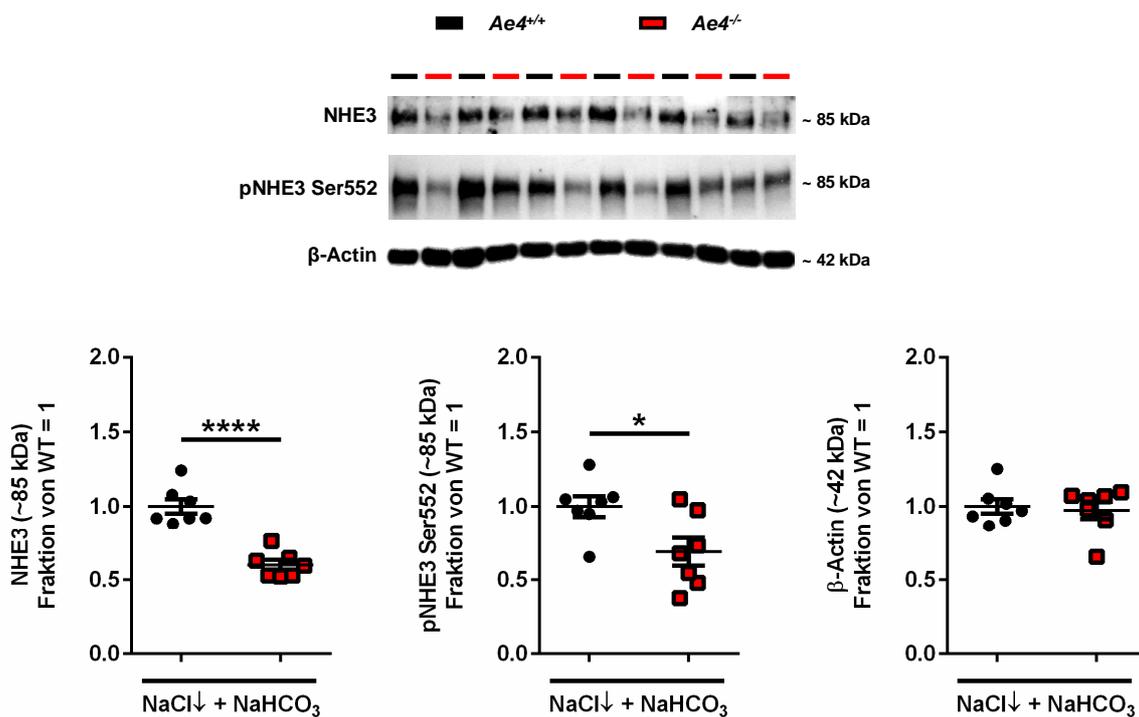
Eine möglicherweise erhöhte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters NHE3 in den proximalen Tubulusabschnitten und damit eine vermehrte  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption kann ursächlich für die unter der NaCl-Mangeldiät mit  $\text{NaHCO}_3$  beobachtete metabolische Alkalose sein. Um dies zu untersuchen, wurden die Proteinmengen des NHE3 sowie der phosphorylierten und damit aktivierten Form des NHE3 mittels Western Blot quantifiziert.

Die Organentnahme der Nieren für die molekularbiologische Analyse im Western Blot erfolgte am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  kurz vor Beginn der Dunkelphase der Tiere.

#### 3.4.3.1 NHE3 und pNHE3 Ser552

Die mittlere Proteinexpression des NHE3 (~85 kDa) war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen ( $0,60 \pm 0,03$ ;  $n=7$ ) im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren ( $1,00 \pm 0,05$ ;  $n=7$ ) signifikant erniedrigt ( $p<0,0001$ ). Ebenso wies die  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe gegenüber der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe eine signifikante Erniedrigung ( $p=0,0225$ ) des pNHE3 Ser552 (~85 kDa) auf. Die Proteinfraktion des pNHE3 Ser552 belief sich bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren im Mittel auf  $1,00 \pm 0,07$  ( $n=7$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen auf  $0,69 \pm 0,09$  ( $n=7$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 graphisch dargestellt. Der Western Blot von  $\beta$ -Actin (~42 kDa) diente als Ladekontrolle und war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Die mittlere Proteinfraktion von  $\beta$ -Actin belief sich bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren auf  $1,00 \pm 0,05$  ( $n=7$ ) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen auf  $0,98 \pm 0,06$  ( $n=7$ ).

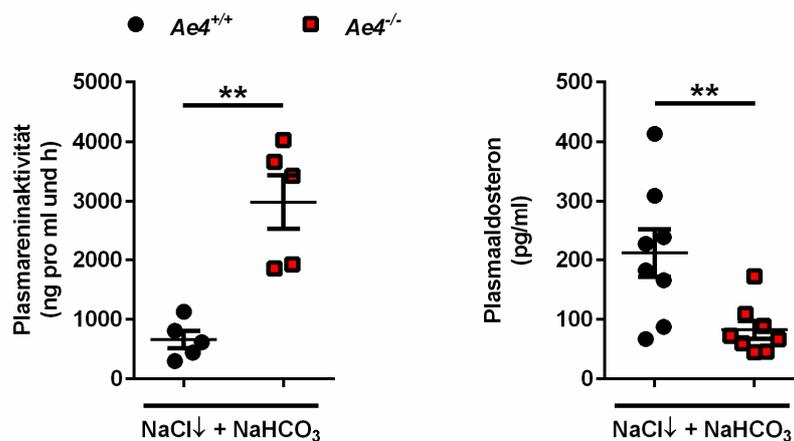
Eine vermehrte Aktivität des NHE3 schien somit als Ursache für die metabolische Alkalose bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Tieren nicht vorzuliegen. Es erfolgte aufgrund der Alkalose sogar eine verminderte Proteinexpression des NHE3 und pNHE3, was zur verminderten Resorption von  $\text{HCO}_3^-$  im proximalen Tubulus führen sollte. Die verminderte Aktivität des NHE3 könnte auch die vermehrte  $\text{Na}^+$ -Urinausscheidung der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  erklären: Bei einer verminderten Aktivität des NHE3, der im proximalen Tubulus etwa 2/3 der transzellulären  $\text{Na}^+$  Resorption vermittelt, kommt es zur vermehrten Ausscheidung von  $\text{Na}^+$  über den Urin.



**Abbildung 30: Western Blots und Proteinexpression des NHE3 und pNHE3 Ser552 sowie des β-Actin von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$ .** Für die Western Blots von NHE3, pNHE3 Ser552 und β-Actin wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Expression des NHE3 (~85 kDa) und pNHE3 Ser552 (~85 kDa) war bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant erniedrigt gegenüber den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren. Die Proteinmenge von β-Actin (~42 kDa) unterschied sich nicht zwischen den Genotypen und diente als gleichmäßige Ladekontrolle. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT (*Ae4<sup>+/+</sup>*) = 1) normiert (Mittelwerte ± SEM; n=7 pro Gruppe; Student's t-Test; \* $p < 0,5$  und \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.4.4 Kompensatorische Aktivierung des RAAS

Die Reninaktivität im Plasma (Abbildung 31) war nach der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe mit 2977 ± 455,7 ng pro ml und h (n=5) im Vergleich zur *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe mit 655,9 ± 145,0 ng pro ml und h (n=5) signifikant erhöht (p=0,0013). Im Gegensatz dazu wies die Plasmaaldosteronkonzentration bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen gegenüber den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren eine signifikante Erniedrigung auf (p=0,0095). Sie betrug in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Mittel 211,1 ± 40,2 pg/ml (n=8) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe 82,3 ± 14,9 pg/ml (n=8).



**Abbildung 31: Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> kurz vor Beginn der Dunkelphase.** Die Plasmareninaktivität (n=5 pro Gruppe) zeigte bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen im Vergleich zu den *Ae4<sup>+/+</sup>* Tieren eine signifikante Erhöhung. Demgegenüber war die Plasmaaldosteronkonzentration (n=8 pro Gruppe) der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe signifikant erniedrigt (Mittelwerte ± SEM; Student's t-Test; \*\*p<0,01).

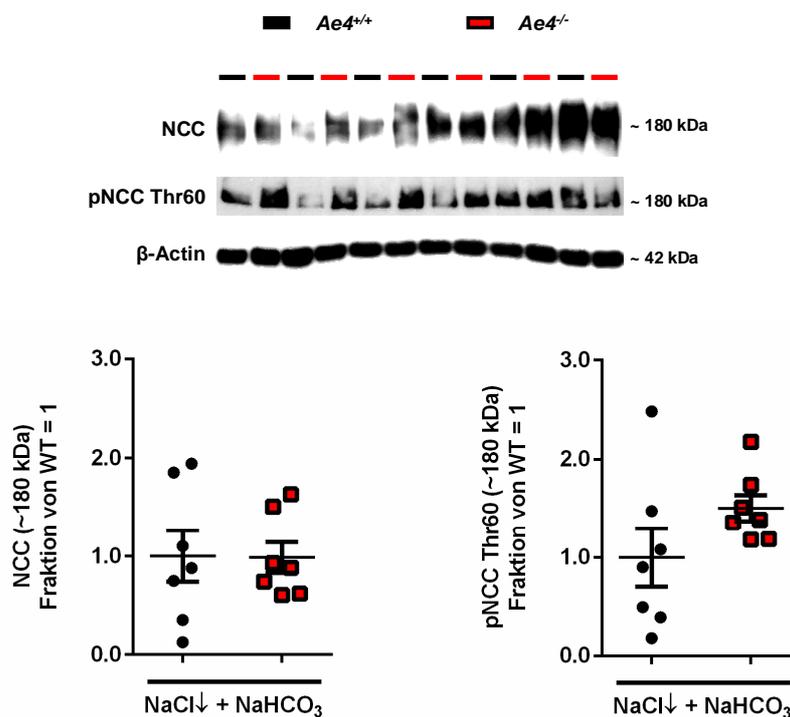
### 3.4.5 Kompensatorische Aktivierung anderer renaler Na<sup>+</sup>-Transportwege aufgrund des Na<sup>+</sup>-Verlusts von *Ae4<sup>-/-</sup>*

Da die AE4-defizienten Mäuse eine verminderte Aktivität des NHE3 sowie eine vermehrte renale Na<sup>+</sup>-Ausscheidung am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> zeigten, wurde untersucht, ob andere Na<sup>+</sup>-Transportwege im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter NCC und epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC) vermehrt exprimiert oder aktiviert wurden, um den Na<sup>+</sup>-Verlust teilweise zu kompensieren. Dies erfolgte durch Analysen auf Proteinebene.

Die Organentnahme der Nieren für die molekularbiologische Analyse im Western Blot erfolgte am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> kurz vor Beginn der Dunkelphase der Tiere.

### 3.4.5.1 NCC und pNCC Thr60

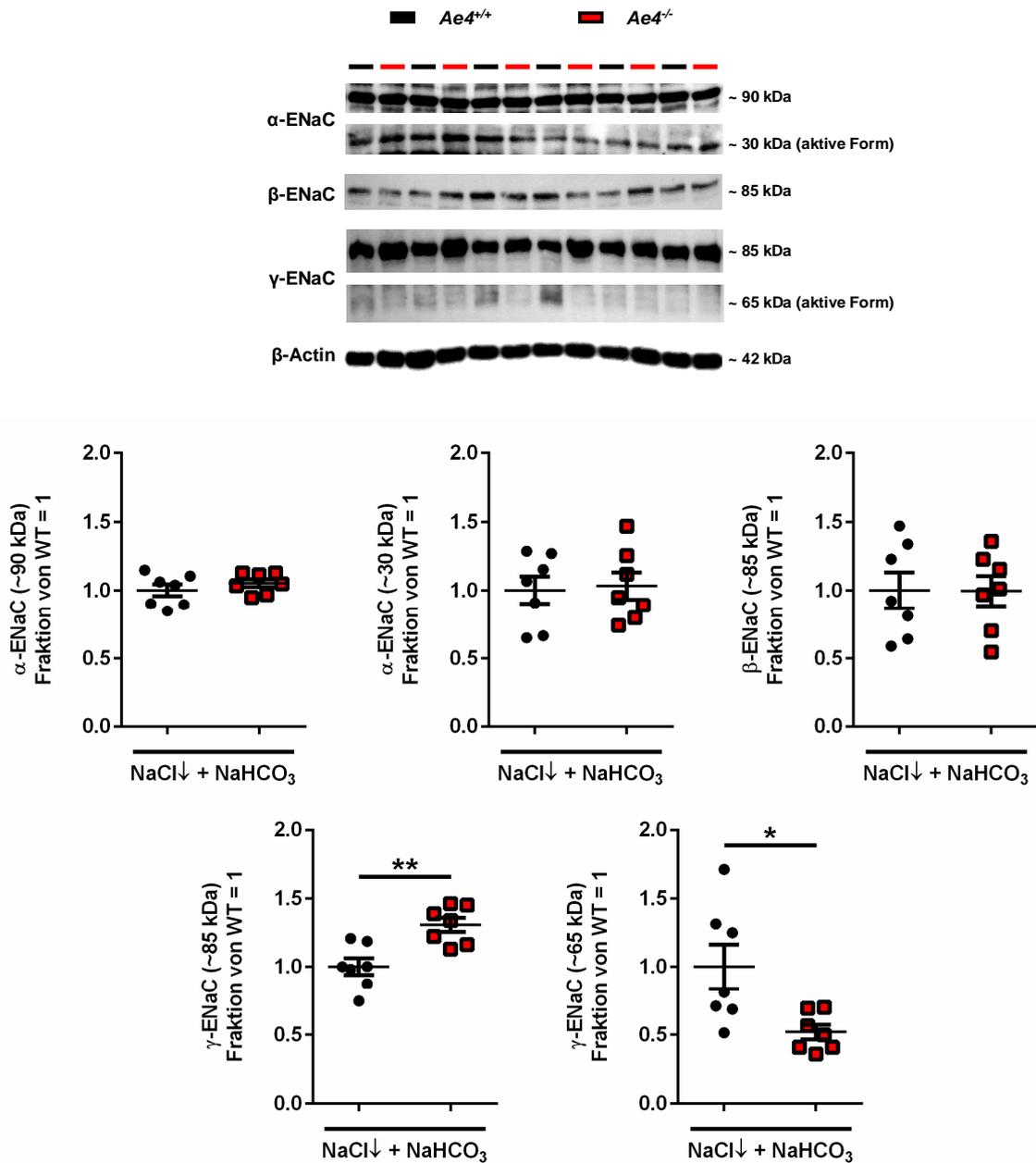
Die Proteinmenge des NCC (~180 kDa) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> (Abbildung 32). Die mittlere Proteinfraction von NCC betrug in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe  $1,00 \pm 0,26$  (n=7) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe  $0,99 \pm 0,16$  (n=7). Demgegenüber war die Proteinexpression des pNCC Thr60 bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen leicht, aber nicht signifikant, gegenüber den *Ae4<sup>+/+</sup>* Tieren erhöht. Die Proteinfraction des pNCC Thr60 belief sich in der *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Mittel auf  $1,00 \pm 0,30$  (n=7) und in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe auf  $1,51 \pm 0,13$  (n=7).



**Abbildung 32: Western Blots und Proteinexpression des NCC und pNCC Thr60 von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub>.** Für die Western Blots von NCC und pNCC Thr60 wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Expression des NCC (~180 kDa) war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu zeigte die Proteinmenge des pNCC Thr60 in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT (*Ae4<sup>+/+</sup>*) = 1) normiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=7 pro Gruppe; Student's t-Test).

### 3.4.5.2 ENaC

Die Proteinexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit des ENaC war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 33). Die mittlere Proteinfraction der ungespaltenen Form des  $\alpha$ -ENaC (~90 kDa) belief sich in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe auf  $1,00 \pm 0,04$  (n=7) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe auf  $1,05 \pm 0,03$  (n=7). Die Proteinfraction der aktiven Form des  $\alpha$ -ENaC (~30 kDa) betrug bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren im Mittel  $1,00 \pm 0,1$  (n=7) und bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen  $1,03 \pm 0,1$  (n=7). Die mittlere Proteinfraction des  $\beta$ -ENaC (~85 kDa) ergab in der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe  $1,00 \pm 0,13$  (n=7) und in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe  $0,99 \pm 0,11$  (n=7). Die ungespaltene Form des  $\gamma$ -ENaC (~85 kDa) war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen im Mittel ( $1,31 \pm 0,05$ ; n=7) signifikant gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren ( $1,00 \pm 0,06$ ; n=7) erhöht (p=0,0023). Demgegenüber war die mittlere Proteinfraction der aktiven Form des  $\gamma$ -ENaC (~65 kDa) in der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe ( $0,52 \pm 0,05$ ; n=7) verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Gruppe ( $1,00 \pm 0,16$ ; n=7) signifikant erniedrigt (p=0,0161). Die verminderte Abundanz der aktiven Form der  $\gamma$ -Untereinheit (~65 kDa) des ENaCs zeigt, dass die Aktivität des ENaC bei den  $Ae4^{-/-}$  Tieren nicht erhöht, sondern sogar erniedrigt war.



**Abbildung 33: Western Blots und Proteinexpression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub>.** Für die Western Blots von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC wurde das Protein zuvor membranangereichert. Die Proteinmengen der  $\alpha$ - (~90 und 30 kDa) und  $\beta$ -Untereinheit (~85 kDa) des ENaC waren bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht signifikant höher als bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren. Die ungespaltene  $\gamma$ -Untereinheit (~85 kDa) zeigte in der *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Ae4<sup>+/+</sup>*-Gruppe eine signifikante Erhöhung. Im Gegensatz dazu war die aktive Form der  $\gamma$ -Untereinheit (65 kDa) bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Tieren signifikant erniedrigt. Die Werte der Proteinmenge wurden auf die mittlere Proteinexpression der Wildtypen (Fraktion von WT (*Ae4<sup>+/+</sup>*) = 1) normiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=7 pro Gruppe; Student's t-Test; \*p<0,5; \*\*p<0,01).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse unter der NaCl-Mangeldiät mit NaHCO<sub>3</sub> bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen aufgrund des Cl<sup>-</sup>-Mangels und der Basenbeladung (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) erhebliche Störungen in der Plasmakonzentration von K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> sowie im Säure-Basen-Haushalt. Die unter NaCl-Mangel beobachtete metabolische hypochlorämische Alkalose wurde unter der NaCl-Mangeldiät mit NaHCO<sub>3</sub> nochmals verstärkt und entwickelte sich zu einer schwerwiegenden hypochlorämischen metabolischen Alkalose mit deutlicher respiratorischer sekundärer Antwort (Hypoventilation). Die erhöhte renale Na<sup>+</sup>-Ausscheidung und die Western Blot Analysen am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> zeigten zudem, dass einer weiteren pH-Entgleisung der *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse durch die verminderte Aktivität des NHE3 und pNHE3 Ser552 im proximalen Tubulus entgegengewirkt wurde. Die renalen Kompensations-mechanismen und die respiratorische Kompensation reichten aber nicht aus, um den pH-Wert des Blutes bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen zu normalisieren. Die Ergebnisse zeigten letztendlich, dass der AE4 Knockout in der renalen Cl<sup>-</sup>-Resorption und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion eingeschränkt war und nicht in der Na<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorption. Das sprach wiederum dafür, dass der AE4-Transporter für die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion und Cl<sup>-</sup>-Resorption der  $\beta$ -Schaltzelle essentiell ist, jedoch nicht für die Na<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorption.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Funktion des renalen  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporters AE4 bei der Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ - und Volumenhomöostase sowie des Säure-Basen-Haushalts im Mausmodell ( $Ae4^{+/+}$  vs.  $Ae4^{-/-}$  Tiere) anhand unterschiedlicher Diätbedingungen zu klären. In den folgenden Abschnitten werden wesentliche Versuchsergebnisse im Zusammenhang erläutert und die Bedeutung des AE4 in den  $\beta$ -Schaltzellen des Sammelrohrs einerseits für die  $\text{Na}^+$ -Balance und Volumenhomöostase sowie andererseits für den Säure-Basen-Haushalt diskutiert.

### 4.1 Die Rolle des AE4 im $\text{Na}^+$ - und Volumenhaushalt

Laut aktueller Literatur erfolgt die apikale Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  aus dem Tubuluslumen in die  $\beta$ -Schaltzelle über den NDCBE (Leviel *et al.*, 2010; Sinning *et al.*, 2017). Aufgrund von *In-vitro*-Untersuchungen an isolierten mikroperfundierten CCDs von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen wird angenommen, dass der AE4 die basolaterale Abgabe der beiden Ionen aus der Zelle ins *Interstitium* bzw. Blut gewährleistet (Chambrey *et al.*, 2013). Daher wird eine enge Zusammenarbeit zwischen dem NDCBE und dem AE4 bei der Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  vermutet. Dementsprechend sollte zunächst untersucht werden, ob die Gendefizienz des AE4 einen ähnlichen Phänotyp wie ein NDCBE Knockout zur Folge hat. Insbesondere sollte dabei geklärt werden, ob der AE4 einen essentiellen basolateralen  $\text{Na}^+$ -Resorptionsweg in den  $\beta$ -ICs darstellt und somit eine wichtige Rolle bei der renalen  $\text{NaCl}$ -Resorption der  $\beta$ -ICs einnimmt. Da Pendrin den für die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption über den NDCBE notwendigen  $\text{Cl}^-$ -Gradienten aufbaut und für seine Beteiligung am Volumenhaushalt bekannt ist, war zudem von Interesse, ob eine Pendrin- und AE4-Defizienz phänotypische Gemeinsamkeiten aufweisen.

Eine NDCBE-Gendefizienz hat keinerlei Einfluss auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt unter Normaldiät-Bedingungen (0,3 %  $\text{Na}^+$ ). Die  $Ndcbe^{-/-}$  Mäuse zeigten im Vergleich zu den  $Ndcbe^{+/+}$  Kontrolltieren weder eine Veränderung der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration noch wiesen sie einen erhöhten Hämatokrit als indirekten Hinweis für eine Volumendepletion auf. Auch die Urinausscheidung von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  unterschied sich nicht zwischen den  $Ndcbe^{+/+}$  und  $Ndcbe^{-/-}$  Mäusen (Sinning *et al.*, 2017). Eine Pendrin-Defizienz führt bei einem ausreichenden Angebot an  $\text{NaCl}$  ebenfalls nicht zu Effekten auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt. Die Plasmakonzentration sowie die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung und der Hämatokrit waren zwischen den  $Pds^{+/+}$  und  $Pds^{-/-}$  Mäusen nicht unterschiedlich (Wall *et al.*, 2004). Vergleichbare Befunde waren bei den AE4-defizienten Mäusen unter der Normaldiät feststellbar. Die Plasmakonzentration von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  ebenso wie der Hämatokrit

und die renale  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung unterschieden sich nicht zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen. Somit konnte unter Normaldiät-Bedingungen ebenfalls keine essentielle Rolle des AE4 für den  $\text{Na}^+$ - und Volumenhaushalt nachgewiesen werden.

Um den  $\text{Na}^+$ -Resorptionsweg über die  $\beta$ -Schaltzellen durch die Zusammenarbeit von Pendrin/NDCBE luminal und durch den AE4 basolateral zu provozieren, wurden Versuche unter einer NaCl-Mangeldiät durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob der AE4 für die Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance und der Volumenhomöostase unter einem NaCl-Mangel essentiell ist. Hierbei wurde vermutet, dass eine AE4-Defizienz durch eine eingeschränkte  $\text{Na}^+$ -Resorption in den  $\beta$ -ICs zu einer vermehrten renalen  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung und dadurch möglicherweise zur einer verringerten Plasmakonzentration von  $\text{Na}^+$  führen könnte. Da ein renaler  $\text{Na}^+$ -Verlust eine vermehrte Wasserausscheidung bedingt, wurde zudem eine mögliche Volumendepletion bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen untersucht. Die  $\text{Na}^+$ -Plasmakonzentration war zwischen der  $Ae4^{+/+}$ - und  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe nicht unterschiedlich. Auch war weder das Plasmavolumen noch der Hämatokrit am Ende der NaCl-Mangeldiät zwischen den Genotypen signifikant unterschiedlich, sodass keine Hinweise auf eine Volumenabnahme infolge der AE4-Defizienz gefunden werden konnten. Da eine erhöhte Konzentration des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (BUN) in der Literatur ebenfalls als Hinweis auf eine Volumendepletion herangezogen wird (Wall *et al.*, 2004; Verlander *et al.*, 2006; Soleimani *et al.*, 2012), wurde bei den AE4 Tieren zusätzlich die BUN-Konzentration bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die BUN-Konzentration ebenfalls nicht unterschiedlich zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen war. Dies bestätigt die mittels Indikatorverdünnungsmethode und Hämatokrit gefundenen Daten und zeigt, dass bei einer AE4-Defizienz keine Abnahme des Plasmavolumens unter NaCl-Mangeldiät nachgewiesen werden konnte.

Zudem ließen die Ergebnisse zur renalen  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung innerhalb der ersten 24 h der NaCl-Mangeldiät bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nicht auf einen renalen  $\text{Na}^+$ -Verlust schließen. Nach dem Wechsel von der Normaldiät auf die NaCl-Mangeldiät war in der  $Ae4^{+/+}$ - und  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe eine gleich stark reduzierte  $\text{Na}^+$ -, aber auch  $\text{Cl}^-$ -Urinausscheidung zu beobachten. Auch nach 10 Tagen NaCl-Mangel konnte keine unterschiedliche renale Ausscheidung von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  zwischen den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nachgewiesen werden. Da der Urin erst 20 h nach dem Diätwechsel für 4 h gesammelt wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zu einem früheren Zeitpunkt eine unterschiedliche Elektrolytausscheidung zwischen den Genotypen bestand. Auf eine längere Aufenthaltsdauer im metabolischen Käfig wurde aber bewusst verzichtet, da die Tiere im metabolischen Käfig einem hohen Stressfaktor ausgesetzt sind. Dies kann wiederum zu

einer reduzierten Futter- und Wasseraufnahme führen, wodurch die Versuchsergebnisse verfälscht werden könnten.

Auffällig war hingegen, dass die  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe verglichen mit der  $Ae4^{+/+}$ -Kontrollgruppe eine signifikant erniedrigte Plasmakonzentration von  $Cl^{-}$  aufwies. Zudem war die  $[HCO_3^{-}]_{st}$  im Plasma signifikant erhöht. Dies zeigt, dass die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse unter NaCl-Mangeldiät eine metabolische Alkalose entwickelten. Besprochen werden diese Befunde ausführlich im Abschnitt 4.2. Anhand der bisher beschriebenen Ergebnisse scheint der AE4 Knockout somit keinen Effekt auf die  $Na^{+}$ -Balance und die Volumenhomöostase, aber auf die Säure-Basen-Homöostase und den  $Cl^{-}$ -Haushalt zu haben.

Bei den NDCBE-defizienten Mäusen war, wie bei einer AE4-Defizienz, ebenfalls nach einer 7-tägigen NaCl-freien Diät (0 %  $Na^{+}$ ) kein Einfluss auf die Plasmakonzentration von  $Na^{+}$  zu beobachten. Ein NDCBE-Verlust führte unter NaCl-Mangel auch nicht zu Auswirkungen auf den Hämatokrit, sodass eine Volumendepletion ausgeschlossen werden konnte. Die  $Ndcbe^{+/+}$  Kontrolltiere und  $Ndcbe^{-/-}$  Mäuse zeigten nach einem Diätwechsel sowie am Ende der 7-tägigen NaCl-freien Diät ebenfalls kein Unterschied in der  $Na^{+}$ - und  $Cl^{-}$ -Urinausscheidung. Dabei erfolgte die Sammlung des Urins über 24 h im metabolischen Käfig, um circadiane Schwankungen der renalen Elektrolytausscheidung auszuschließen und eine 24 h-Bilanzierung zu erhalten. Im Unterschied zu den AE4-Versuchen konnte infolge einer NDCBE-Gendefizienz aber keine Hypochlorämie unter NaCl-Mangel nachgewiesen werden, da die  $Cl^{-}$ -Plasmakonzentration bei den  $Ndcbe^{-/-}$  Mäusen gegenüber den  $Ndcbe^{+/+}$  Tieren unverändert war (Sinning *et al.*, 2017).

Ein Vergleich der AE4-Versuche unter NaCl-Mangel mit Untersuchungen zur Pendrin-Defizienz lässt Unterschiede erkennen. Verschiedene Studien sprechen dafür, dass Pendrin durch seine renale Aldosteron-sensitive  $Cl^{-}$ -Resorption eine wichtige Rolle bei der Regulation der Volumenhomöostase und des Blutdrucks einnimmt. Unter anderem zeigten  $Pds^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den  $Pds^{+/+}$  Kontrolltieren nach einer 7-tägigen NaCl-Restriktion eine erhöhte Urinausscheidung von  $Cl^{-}$  (Chlorurese). Zudem konnte im Gegensatz zu den AE4-Versuchen infolge einer Pendrin-Gendefizienz keine Hypochlorämie unter NaCl-Mangel beobachtet werden. Die  $Cl^{-}$ -Plasmakonzentration der  $Pds^{-/-}$  Mäuse war verglichen mit den  $Pds^{+/+}$  Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedlich. Außerdem ließ eine Erhöhung des Hämatokrits und der Konzentration des BUN in der  $Pds^{-/-}$ -Gruppe auf eine Minderung des Plasmavolumens schließen. Eine NaCl-Mangeldiät (NaCl-Aufnahme <0,01 mmol pro Tag) führte bei den  $Pds^{-/-}$  Mäusen sogar zu einem Abfall des systolischen Blutdrucks (Wall *et al.*, 2004).

Anhand der Befunde aus der Literatur war bei den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäusen keine Störung der Na<sup>+</sup>- und Volumenbalance erkennbar. Jedoch zeigte sich in der *Ndcbe*<sup>-/-</sup>-Gruppe, dass der Verlust des Na<sup>+</sup>-Resorptionsweges in den  $\beta$ -ICs zu einer erhöhten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) führt. Sowohl die Plasmareninaktivität als auch die Urinausscheidung von Aldosteron war bei den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht. Zudem schienen die *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäuse die Inaktivität des NDCBE durch eine erhöhte Aktivierung des Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters NCC zu kompensieren. Dies zeigte sich anhand von Immunoblot-Analysen und Elektrolytausscheidungsdaten nach NCC-Blockade durch HCTZ. Die Proteinmenge des NCC und pNCC war bei den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäusen bereits unter der Normaldiät gegenüber den *Ndcbe*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren signifikant erhöht. Die Gabe von HCTZ induzierte unter der NaCl-freien Diät bei den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäusen zudem eine signifikant höhere Na<sup>+</sup>-Urinausscheidung verglichen mit den *Ndcbe*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren. Einem Na<sup>+</sup>-Verlust, der durch das Fehlen des NDCBE-vermittelten Na<sup>+</sup>-Resorptionsweges entsteht, wird somit durch eine erhöhte Na<sup>+</sup>-Resorption über den NCC weitgehend entgegengewirkt. Dadurch werden die Effekte einer NDCBE-Gendefizienz fast vollständig maskiert (Sinning *et al.*, 2017). Aufgrund dieser Resultate wurde bei den *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls untersucht, ob während der NaCl-Mangeldiät eine kompensatorische Aktivierung des RAAS vorliegt und ob andere Na<sup>+</sup>-Transportwege im proximalen Tubulus (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NHE3) oder im Aldosteronsensitiven distalen Nephron (Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter NCC und epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC) zur Kompensation der AE4-Defizienz vermehrt aktiviert wurden. Die Ergebnisse ließen jedoch bei den *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht auf eine erhöhte Aktivierung des RAAS schließen. Die Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma war zwischen der *Ae4*<sup>+/+</sup>-Kontrollgruppe und der *Ae4*<sup>-/-</sup>-Gruppe nicht unterschiedlich. Die Proteinexpressionsanalysen des NHE3, NCC und ENaC sowie die Elektrolytausscheidungsdaten nach Transporter- bzw. Kanalblockade mittels Diuretika lieferten ebenfalls keine Hinweise darauf, dass bei den *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen der Verlust eines Na<sup>+</sup>-Resorptionsweges kompensiert wurde. Die Proteinexpression des NHE3, pNHE3, NCC und pNCC sowie des ENaC war zwischen den *Ae4*<sup>+/+</sup> und *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen nach 10 Tagen NaCl-Mangel nicht unterschiedlich, was für eine gleiche Transporter- bzw. Kanalaktivierung in beiden Gruppen spricht. Eine subkutane Injektion von HCTZ induzierte bei den *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen keine vermehrte Na<sup>+</sup>-Urinausscheidung gegenüber den *Ae4*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren, sodass bei den *Ae4*<sup>+/+</sup> und *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls von einer gleichen NCC-Aktivierung ausgegangen werden konnte. Da das Thiazid-sensitive Pendrin/NDCBE-Transportsystem bei den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Mäusen durch den NDCBE-Verlust bereits blockiert war, konnte bei den Versuchen mit den *Ndcbe*<sup>-/-</sup> Tieren eine hohe Dosis an HCTZ (50 mg/kg Körpergewicht) zum Einsatz kommen. Im Gegensatz dazu wurde bei den AE4-Versuchen eine vergleichsweise niedrige HCTZ-Dosierung von 10 mg/kg verwendet,

um eine zusätzliche Blockade des Thiazid-sensitiven Pendrin/NDCBE-Transportsystems zu vermeiden. Somit kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass eine höhere HCTZ-Dosis, die den NCC- und Pendrin/NDCBE-Weg blockiert, auch bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Tieren eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung zur Folge hätte. Interessanterweise führte die subkutane Gabe von Amilorid (1,45 mg/kg Körpergewicht), einem ENaC-Blocker, bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen sogar zu einer signifikanten Erniedrigung der renalen  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung verglichen mit den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren. Dieses Ergebnis deutet sogar auf eine geringere Aktivität des ENaC bei den AE4-defizienten Mäusen hin.

Zusammenfassend scheint eine NDCBE-Defizienz bereits unter den Normaldiät-Bedingungen zu einer vermehrten Aktivität des NCC und pNCC zu führen sowie unter dem NaCl-Mangel zu einer erhöhten RAAS-Aktivierung. Daher wird bei den *Ndcbe<sup>-/-</sup>* Mäusen von einer milden kompensierten Störung der NaCl- und Volumenbalance ausgegangen. Schlussfolgernd hat der NDCBE aufgrund seiner  $\text{Na}^+$ -Resorption in den  $\beta$ -ICs des ASDN eine Bedeutung im  $\text{Na}^+$ - und Volumenhaushalt. Ebenso hat Pendrin aufgrund der Resorption von  $\text{Cl}^-$  eine wichtige Rolle bei der Regulation der Volumenhomöostase und des Blutdrucks. Demgegenüber resultiert ein Verlust des AE4 unter der NaCl-Mangeldiät nicht in einer vermehrten RAAS-Aktivierung und erhöhten Aktivität anderer  $\text{Na}^+$ -Transportwege wie dem NHE3, NCC und ENaC. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen somit dafür, dass der AE4 trotz seiner vermuteten Funktion als basolateraler  $\text{Na}^+$ -Resorptionsweg keine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance und des Volumenhaushalts unter NaCl-Mangel spielt.

## 4.2 Die Rolle des AE4 im Säure-Basen-Haushalt

Anhand von Literaturangaben zeigte sich, dass eine Pendrin-Gendefizienz bei Mäusen unter Normaldiät-Bedingungen keinen Einfluss auf den Säure-Basen-Haushalt hat (Royaux *et al.*, 2001; Wall *et al.*, 2004). Demgegenüber ließ sich bei *Pds<sup>-/-</sup>* Mäusen infolge einer 7-tägigen NaCl-Restriktion eine metabolische Alkalose feststellen, die bei den *Pds<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren nicht zu beobachten war. Dies spricht dafür, dass *Pds<sup>-/-</sup>* Mäuse eine eingeschränkte Fähigkeit haben eine entstehende Alkalose zu korrigieren. Somit dämpft Pendrin eine unter NaCl-Mangel auftretende Alkalose durch die Sekretion von  $\text{HCO}_3^-$  und ist aufgrund dessen wesentlich an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts beteiligt (Wall *et al.*, 2004). Vergleichbare Befunde waren bei den AE4-Versuchen zu beobachten. Eine AE4-Defizienz führte unter einer Normaldiät auch zu keinem Effekt auf den Säure-Basen-Haushalt. Infolge einer 11-tägigen NaCl-Mangeldiät entwickelten die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse aber ebenfalls eine metabolische Alkalose. Hinzu kam bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen aufgrund einer erniedrigten  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration jedoch noch eine Hypochlorämie, die die *Pds<sup>-/-</sup>* Mäuse nicht zeigten.

Dieser Unterschied könnte aber möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die tägliche NaCl-Aufnahme unterschiedlich war und die Versuche daher nicht direkt miteinander vergleichbar sind: Wall und ihre Kollegen gaben in ihrer Studie mit Pendrin-defizienten Mäusen bei der NaCl-restriktiven Diät eine tägliche NaCl-Aufnahme von 0,13 mmol an (Wall *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu nahmen die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse bei einer durchschnittlichen Aufnahme von 3 g Diätfutter pro Tag nur ca. 0,02 mmol Na<sup>+</sup> und ca. 0,01 mmol Cl<sup>-</sup> zu sich. Da der AE4 Knockout ebenso wie eine Pendrin-Defizienz unter NaCl-Mangel eine Alkalose zur Folge hatte, ist eine wesentliche Rolle des AE4 bei der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Haushalts wahrscheinlich. Versuche zur NDCBE-Defizienz lassen im Gegensatz dazu aber nicht darauf schließen, dass der NDCBE trotz seiner Funktion als HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorptionsweg essentiell für die Säure-Basen-Homöostase ist. Sowohl unter Normaldiät-Bedingungen als auch nach einer 7-tägigen NaCl-freien Diät war der pH-Wert, der pCO<sub>2</sub> und die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Plasmakonzentration zwischen den *Ndcbe<sup>+/+</sup>* und *Ndcbe<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht unterschiedlich (Sinning *et al.*, 2017).

Da sich bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen unter der NaCl-Mangeldiät eine Störung der Säure-Basen-Homöostase abzeichnete, wurde bei den *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen der Effekt einer Säure- oder Basenbelastung untersucht. Zur Säurebelastung erhielten die Tiere eine NaCl-Mangeldiät in Kombination mit NH<sub>4</sub>Cl im Trinkwasser über 7 Tage. Durch die Substitution von Cl<sup>-</sup> lag nur noch ein Na<sup>+</sup>-Mangel vor. Durch die Gabe von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> erfolgte die Säurebelastung, sodass ein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Mangel entstand. Da der AE4 laut Literaturangaben die basolaterale Resorption von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in den  $\beta$ -ICs vermittelt, wurde vermutet, dass die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse während einer Säurebelastung eine eingeschränkte Fähigkeit haben HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu resorbieren. Die ungenügende renale HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorptionskapazität könnte bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen eine Erniedrigung der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Plasmakonzentration zur Folge haben, wodurch sich letztendlich eine metabolische Azidose entwickeln würde. Überraschenderweise zeigten die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse, trotz des Fehlens des basolateralen Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorptionsweges in den  $\beta$ -ICs, gegenüber den *Ae4<sup>+/+</sup>* Kontrolltieren keine verstärkte metabolische Azidose. Sowohl der pH-Wert als auch die [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>st</sub> und der BE im Plasma waren zwischen den *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht signifikant unterschiedlich. Daher sprechen die Ergebnisse zur Säurebelastung dafür, dass die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse nicht in der renalen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorption eingeschränkt sind. Zudem konnte unter dem alleinigen Na<sup>+</sup>-Mangel mit Säurebelastung anhand der Blutwerte nochmals bestätigt werden, dass der AE4 trotz des ursprünglich vermuteten Na<sup>+</sup>-Resorptionsweges keine essentielle Rolle im Na<sup>+</sup>- und Volumenhaushalt spielt. Die Plasmakonzentration von Na<sup>+</sup> und der Hämatokrit waren zwischen der *Ae4<sup>+/+</sup>*- und *Ae4<sup>-/-</sup>*-Gruppe gleich, sodass eine Volumendepletion ausgeschlossen werden konnte.

Bei den Versuchen zur Basenbelastung erhielten die Mäuse zusätzlich zur NaCl-Mangeldiät  $\text{NaHCO}_3$  im Trinkwasser für eine Dauer von 7 Tagen. Somit bekamen die Tiere zwar  $\text{Na}^+$  in annähernd gleicher Menge wie unter der Normaldiät, jedoch deutlich reduzierte Mengen an  $\text{Cl}^-$ . Zusätzlich wurden die Mäuse durch die Gabe von  $\text{HCO}_3^-$  einer Basenbelastung ausgesetzt. Normalerweise verfügt die Niere über eine hohe  $\text{HCO}_3^-$ -Ausscheidungskapazität, sodass eine hohe orale Aufnahme von Basen nicht zu einer starken metabolischen Alkalose führt. Dies zeigte sich auch bei den  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltieren. Die Gabe von 230 mM oder 280 mM  $\text{NaHCO}_3$  führte trotz  $\text{Cl}^-$ -Mangel und Basenbelastung nur zu einem leichten Anstieg der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration und des BE im Blut. Die  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration blieb im Normbereich. Im Gegensatz dazu wurde die 280 mM  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung im Trinkwasser von den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen nicht gut toleriert. Um bei den Tieren einen Gewichtsverlust von mehr als 20 % zu verhindern, musste eine Intervention durch die Gabe einer Glucoselösung erfolgen. Nach der Gabe einer 230 mM  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung war der Gewichtsverlust der  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse weniger ausgeprägt, jedoch zeigten die  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse eine schwerwiegende hypochlorämische metabolische Alkalose mit deutlicher respiratorischer Sekundärantwort (Hypoventilation). Die Plasmakonzentration von  $\text{Cl}^-$  war mit  $77,9 \pm 2,0$  mmol/l stark erniedrigt, die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration mit  $53,7 \pm 1,9$  mmol/l und der BE mit  $32,0 \pm 1,8$  mmol/l stark erhöht. Die schwerwiegende metabolische Alkalose der  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse deutet darauf hin, dass eine AE4-Defizienz entweder zu einer verstärkten  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption führt oder, dass die Tiere in ihrer Fähigkeit zur renalen  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion eingeschränkt sind. Die Resorption des renal filtrierten  $\text{HCO}_3^-$  wird zum Großteil durch die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters NHE3 im proximalen Tubulus gewährleistet. Daher war nicht auszuschließen, dass die starke metabolische Alkalose der  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse durch eine vom NHE3 vermittelten erhöhten  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption verursacht wurde. Jedoch zeigten molekularbiologische Analysen, dass der NHE3 bei den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen weniger phosphoryliert war. Somit konnte eine vermehrte Aktivierung des NHE3 als Ursache der metabolischen Alkalose ausgeschlossen werden. Vielmehr führte die starke Alkalose zur verminderten Expression des NHE3, was zu einer verringerten  $\text{HCO}_3^-$ -Resorption im proximalen Tubulus führt. Dies wirkt der metabolischen Alkalose sogar entgegen. Die geringere Aktivierung des NHE3 hat zudem eine verminderte Rückresorption von  $\text{Na}^+$  zur Folge, was zu einem renalen  $\text{Na}^+$ -Verlust und aufgrund der nachfolgenden vermehrten Wasserausscheidung zu einer Volumendepletion führen kann. Ein renaler  $\text{Na}^+$ -Verlust ließ sich letztendlich anhand der Daten zur renalen Elektrolytausscheidung vom 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  bestätigen. Aufgrund einer leichten, aber nicht signifikanten Erniedrigung der GFR bei den  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäusen filtrierten die  $\text{Ae4}^{-/-}$  Tiere ca. ein Fünftel weniger an  $\text{Na}^+$  als die  $\text{Ae4}^{+/+}$  Kontrolltiere. Trotz dessen schieden die  $\text{Ae4}^{-/-}$  Mäuse ca. 6-mal mehr  $\text{Na}^+$  über den Urin aus als die  $\text{Ae4}^{+/+}$  Tiere.

Anhand des Hämatokrits und der Konzentration des BUN konnte zudem indirekt die vermutete Volumenabnahme nachgewiesen werden. Bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen zeigte sich gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung des Hämatokrits ebenso wie der Konzentration des BUN. Im Gegensatz dazu war das mittels Evans Blue-Methode bestimmte Plasmavolumen unter der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich. Ein Grund hierfür könnte aber sein, dass die Plasmavolumenbestimmung mittels Evans Blue-Methode nicht hinreichend sensitiv war.

Aufgrund der beobachteten Volumendepletion der  $Ae4^{-/-}$  Tiere unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  wurde eine mögliche Aktivierung des RAAS untersucht. Dabei zeigten die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren eine erhöhte Plasmareninaktivität. Erstaunlicherweise war aber bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen die Aldosteronkonzentration im Plasma gegenüber den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren erniedrigt. Da bekannt ist, dass eine verminderte  $\text{K}^+$ -Plasmakonzentration die Ausschüttung von Aldosteron senkt (Kamel *et al.*, 2018), könnte der niedrige Aldosteronspiegel durch die bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen beobachtete Hypokaliämie bedingt sein. Die erniedrigte  $\text{K}^+$ -Plasmakonzentration könnte wiederum durch die Alkalose verursacht worden sein, welche zu einer vermehrten Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt. Infolge dessen erhöht sich der Transport von  $\text{K}^+$  nach intrazellulär (Aronson & Giebisch, 2011).

Der beobachtete  $\text{Na}^+$ -Verlust scheint im ASDN durch die erhöhte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters NCC teilweise kompensiert zu werden, da die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse eine erhöhte Phosphorylierung des NCC aufwiesen, die jedoch nicht signifikant war. Die Aktivität des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals ENaC scheint aber trotz verminderter Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters NHE3 nicht vermehrt zu sein. Zwar waren die Proteinlevel der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des ENaC nicht unterschiedlich zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen, jedoch war die aktive Form des  $\gamma$ -ENaCs bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen weniger exprimiert. Die verminderte Proteinexpression der aktiven Form der  $\gamma$ -Untereinheit deutet darauf hin, dass der ENaC bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen geringer aktiviert war. Als Ursache für die niedrige ENaC-Aktivität kommt bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen die beobachtete Hypokaliämie in Betracht, welche, wie bereits beschrieben, die Ausschüttung von Aldosteron senkt. Aufgrund dessen ist weniger Aldosteron vorhanden, um die Aktivität des ENaC über den Mineralokortikoidrezeptor zu erhöhen (Kamel *et al.*, 2018).

Da unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  eine erhöhte NHE3-Aktivierung als Ursache für die metabolische Alkalose der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse ausgeschlossen werden konnte, lag nahe, dass ein gestörter Mechanismus der  $\beta$ -ICs für die Alkalose verantwortlich war: Die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse zeigten somit eine eingeschränkte Fähigkeit,  $\text{HCO}_3^-$  über die  $\beta$ -ICs zu sezernieren. Neben diesem Aspekt zeichnete sich bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen aufgrund der

beobachteten Hypochlorämie eine verminderte Fähigkeit zur renalen  $\text{Cl}^-$ -Resorption ab. Anhand der Daten zur renalen Elektrolytausscheidung konnte diese Vermutung bestätigt werden. Die ohnehin schon erniedrigte  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration der  $Ae4^{-/-}$ -Gruppe führte in Kombination mit der leicht verminderten GFR zu einer ca. um die Hälfte reduzierten filtrierten Menge an  $\text{Cl}^-$  im Vergleich zu der  $Ae4^{+/+}$ -Kontrollgruppe. Dennoch war die renale  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung zwischen den beiden Genotypen am 7. Tag der Diät annähernd gleich. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse eine verminderte Fähigkeit zur renalen  $\text{Cl}^-$ -Resorption aufweisen. Der AE4 ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase und des  $\text{Cl}^-$ -Haushalts.

Wodurch die Fähigkeit der  $\beta$ -ICs zur  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion und  $\text{Cl}^-$ -Resorption aufgrund der AE4-Defizienz beeinflusst wird, bleibt in der vorliegenden Arbeit ungeklärt. Denkbar ist, dass der AE4 möglicherweise wichtig für die in der Literatur beschriebene Entwicklung bzw. Umwandlung der gesamten  $\beta$ -Schaltzelle ist. Die Induktion einer Azidose durch Säurebelastung, wie sie bei den AE4 Tieren unter der NaCl-Mangeldiät mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erfolgte, führt normalerweise neben einer vermehrten Transporteraktivierung der  $\alpha$ -ICs, wie z.B. der  $\text{H}^+$ -ATPase und des AE1 (Verlander *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 2015), zu einer vermehrten Umwandlung von  $\beta$ -ICs zu  $\alpha$ -ICs (Schwartz *et al.*, 2002; Al-Awqati, 2011). Dieser Umwandlungsprozess scheint unter anderem von der Sekretion und Lage des extrazellulären Matrixproteins Hensin (DMBT1) abhängig zu sein. Hensin-defiziente Mäuse entwickelten eine metabolische Azidose, da typische  $\alpha$ -Schaltzellen nicht vorhanden waren. Zudem wiesen die Hensin-defizienten Mäuse eine Akkumulation an  $\beta$ -ICs auf (Gao *et al.*, 2010). Umgekehrt führt eine metabolische Alkalose, wie sie bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen beobachtet wurde, normalerweise neben einer vermehrten Aktivierung der Transporter der  $\beta$ -Schaltzellen auch zu einer gesteigerten Umwandlung der  $\alpha$ -ICs zu  $\beta$ -ICs, sodass die Anzahl der  $\beta$ -ICs zunimmt. Infolge dieser Mechanismen erhöht sich die  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion ins Tubuluslumen über Pendrin, um der Alkalose entgegen zu wirken (Schwartz *et al.*, 2002; Al-Awqati, 2011). Ob dieser Prozess ebenfalls Hensin-abhängig ist, ist gegenwärtig nicht bekannt (Gao *et al.*, 2010). Es wäre aber möglich, dass die Umwandlung von  $\alpha$ -ICs zu  $\beta$ -ICs unter anderem AE4-abhängig ist. Eine AE4-Defizienz könnte somit, ähnlich wie eine Hensin-Defizienz bei  $\alpha$ -Schaltzellen, zu einer gestörten Entwicklung oder zu einem gänzlichen Fehlen der  $\beta$ -ICs und womöglich zu einer erhöhten Anzahl an  $\alpha$ -ICs führen. Dies hätte aufgrund des Mangels oder Fehlens von Pendrin möglicherweise eine metabolische Alkalose zur Folge, wie sie bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen beobachtet wurde. Ob die AE4-Defizienz ein Fehlen oder eine Verringerung der Anzahl an  $\beta$ -ICs bedingen und damit womöglich zu einer

erhöhten Anzahl an  $\alpha$ -ICs führen, könnte z.B. durch immunhistochemische Analysen und die Bestimmung des mRNA- und Protein-expressionsniveaus von Pendrin und dem NDCBE ermittelt werden.

Neben einem gestörten Entwicklungsprozess der gesamten  $\beta$ -Schaltzelle als Ursache für die hypochlorämische Alkalose kommt auch in Betracht, dass die AE4-Defizienz einzelne Transporter der  $\beta$ -IC in ihrer Funktion und Häufigkeit negativ beeinflusst. Da Pendrin in der luminalen Membran der  $\beta$ -ICs sowohl die Sekretion von  $\text{HCO}_3^-$  als auch die Resorption von  $\text{Cl}^-$  vermittelt, deutet die eingeschränkte renale  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion und  $\text{Cl}^-$ -Resorption der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse auf eine verminderte Aktivität von Pendrin hin. Damit wäre Pendrin von der Anwesenheit oder sogar den Transporteigenschaften des AE4 abhängig. Dies führt wiederum zu der Überlegung, dass beide Transporter möglicherweise zusammenarbeiten: Der AE4 könnte dem Pendrin intrazellulär  $\text{HCO}_3^-$  zur Verfügung stellen, indem er die Aufnahme von  $\text{HCO}_3^-$  aus dem Blut in die  $\beta$ -Schaltzelle gewährleistet. Dieser Prozess könnte womöglich im Austausch mit intrazellulärem  $\text{Cl}^-$  erfolgen, was zuvor über Pendrin in die Zelle gelangt ist. Daraus würde sich für den AE4 die Funktion eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters ergeben. Dass der AE4 als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter fungieren kann, wurde bereits für die Azinuszellen der Speicheldrüse von Mäusen gezeigt (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2016).

Beim Vergleich der Befunde von  $Ae4^{-/-}$  Mäusen mit Studien zu einer Pendrin-Defizienz lassen sich Parallelen erkennen. Dies stützt die Hypothese, dass eine AE4-Defizienz eine verminderte Pendrinaktivität verursacht. Eine 7-tägige NaCl-Restriktion in Kombination mit  $\text{NaHCO}_3$  führte bei  $Pds^{-/-}$  Mäusen ebenso zu einer metabolischen Alkalose. Diese war aber gegenüber der bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen beobachteten Alkalose vergleichsweise mild. Eine erhöhte BUN-Konzentration ließ bei den  $Pds^{-/-}$  Mäusen zusätzlich auf eine Volumendepletion schließen. Außerdem zeigte die  $Pds^{-/-}$ -Gruppe ebenso wie die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse eine erhöhte Plasminreninaktivität gegenüber der  $Pds^{+/+}$ -Gruppe. Auch eine erhöhte renale  $\text{Cl}^-$ -Ausscheidung konnte bei den  $Pds^{-/-}$  Mäusen nachgewiesen werden, was auf eine negativere  $\text{Cl}^-$ -Balance gegenüber den  $Pds^{+/+}$  Mäusen hindeutete (Verlander *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den  $Ae4^{-/-}$  Tieren war bei den  $Pds^{-/-}$  Mäusen jedoch keine signifikant verminderte  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentration gegenüber den  $Pds^{+/+}$  Kontrolltieren feststellbar. Zudem war die Plasmaaldosteronkonzentration zwischen den  $Pds^{+/+}$  und  $Pds^{-/-}$  Mäusen nicht unterschiedlich, wohingegen das Aldosteronlevel der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren signifikant erniedrigt war. Die Unterschiede zwischen den  $Pds^{-/-}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen können aber womöglich durch die unterschiedlichen aufgenommenen Mengen an  $\text{Cl}^-$  und  $\text{NaHCO}_3$  erklärt werden. Die AE4 Mäuse tranken pro Tag durchschnittlich 6 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (230 mM), sodass sie ca. 1,38 mmol an  $\text{NaHCO}_3$  aufgenommen haben.

Hinzu kam die Aufnahme von ca. 0,02 mmol Na<sup>+</sup> und ca. 0,01 mmol Cl<sup>-</sup> über das Diätfutter. Demgegenüber nahmen die Pendrin Mäuse über ein Gelfutter 0,13 mmol an NaCl auf, welches mit 0,87 mmol an NaHCO<sub>3</sub> supplementiert wurde. Folglich hatten die AE4 Mäuse einen stärkeren Cl<sup>-</sup>-Mangel und haben ca. 60 % mehr HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aufgenommen als die Pendrin Mäuse.

Dass die AE4-Defizienz möglicherweise zu einer verminderten Pendrinaktivität und damit einer verringerten HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion führt, zeigte auch die verminderte ENaC-Expression und -Aktivität der *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäuse. Neben der verminderten Proteinexpression der aktiven Form der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> deutete auch die verminderte natriuretische Antwort der *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäuse nach der Amilorid-Blockade unter der NaCl-Mangeldiät darauf hin, dass der ENaC weniger aktiviert war. Bei *Pds*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde bereits ein indirekter Effekt auf die ENaC-Aktivität nachgewiesen. Die Pendrin-Defizienz führte aufgrund der verringerten HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion zu einer verminderten Proteinexpression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und vor allem  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC (Kim *et al.*, 2007). Dabei wurde angenommen, dass der ENaC pH-sensitiv ist (Pech *et al.*, 2010). Die pH-Änderung bzw. die verringerte HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration im Tubuluslumen schien aufgrund der Pendrin-Defizienz eine Herunterregulation des ENaC zur Folge zu haben. Als möglicher Grund der verminderten ENaC-Aktivität der *Ae4*<sup>-/-</sup> Mäuse ist daher nicht auszuschließen, dass bei einer AE4-Defizienz möglicherweise derselbe Mechanismus zum Tragen kommt wie bei einer Pendrin-Defizienz.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse zum Säure-Basen-Haushalt dafür, dass der AE4 Knockout nicht in der Fähigkeit eingeschränkt ist HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu resorbieren, sondern über die  $\beta$ -Schaltzellen auszuschcheiden. Wie bei einem Pendrin-Verlust beobachtet, verursachte eine AE4-Defizienz unter NaCl-Mangel eine Alkalose. Die Alkalose wurde unter einem alleinigen Cl<sup>-</sup>-Mangel mit Basenbeladung verstärkt. Aufgrund dessen scheint der AE4 wie Pendrin an der Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase beteiligt zu sein. Die beobachtete Hypochlorämie sowie die reduzierte Cl<sup>-</sup>-Resorption unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM NaHCO<sub>3</sub> deuten zudem auf eine Beteiligung am Cl<sup>-</sup>-Haushalt hin. Dabei ist der AE4 möglicherweise wichtig für die Entwicklung der gesamten  $\beta$ -ICs oder für die Pendrinaktivität.

### 4.3 Schlussfolgerung zur physiologischen Funktion des AE4

Die bislang beschriebene Funktion des AE4 als wichtiger, basolateraler  $\text{Na}^+$ -Resorptionsweg in den  $\beta$ -ICs und somit die essentielle Rolle des AE4 für die Aufrechterhaltung des Volumenhaushalts ließ sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigen. Dies wird dadurch belegt, dass bei einem AE4-Verlust im Gegensatz zu einer NDCBE-Gendefizienz keine kompensatorische Aktivierung des RAAS und anderer renaler  $\text{Na}^+$ -Transportwege zu beobachten war. Auch Chambrey und seine Kollegen, auf deren Versuche sich die bisher vermutete Funktion des AE4 stützte, schlossen nicht aus, dass ein zusätzlicher  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter in der basolateralen Membran der  $\beta$ -Schaltzellen existieren könnte, der  $\text{Na}^+$  ins *Interstitium* abgibt und damit die  $\text{Na}^+$ -Balance und Volumenhomöostase gewährleistet (Chambrey *et al.*, 2013).

Fraglich ist auch, ob es sich bei dem AE4 tatsächlich um einen  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter handelt. Die *In-vitro*-Versuche von Chambrey und seinen Kollegen an isolierten mikroperfundierten CCDs von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen deuteten darauf hin, dass der AE4 basolateral einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Transport vermittelt (Chambrey *et al.*, 2013). Die AE4-Defizienz führte hierbei aber nicht zum vollkommenen Ausbleiben des  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{HCO}_3^-$ -Flusses.

Die Forschergruppe von Pena-Münzenmayer schloss hingegen aus ihren Experimenten, dass der AE4 in den Azinuszellen der Speicheldrüse von Mäusen ein elektroneutraler Kationen-abhängiger  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter ist (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2016).

Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass der AE4 essentiell für die Aufrechterhaltung des  $\text{Cl}^-$ - und Säure-Basen-Haushalts bei  $\text{NaCl}$ -Mangel und bei  $\text{Cl}^-$ -Mangel mit einer Basenbeladung ist. Dies könnte beispielsweise bei starkem Erbrechen für die Abwendung einer lebensbedrohlichen metabolischen Alkalose entscheidend sein.

Ungeklärt bleibt bislang, ob die Funktion von Pendrin als  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretions- und  $\text{Cl}^-$ -Resorptionsweg vom AE4 abhängig ist. Entweder könnte der AE4 dabei aufgrund seiner Transporteigenschaften als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter wichtig für die Aktivität von Pendrin sein oder der AE4 ist möglicherweise allgemein bedeutsam für die Entwicklung der gesamten  $\beta$ -IC.

Da eine erhöhte Plasmakonzentration an  $\text{HCO}_3^-$  bekanntlich häufig zu einer  $\text{Cl}^-$ -Depletion führt (Hamm *et al.*, 2015), bleibt zudem fraglich, ob die Hypochlorämie der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse durch die Alkalose verursacht wurde oder durch das Fehlen eines renalen  $\text{Cl}^-$ -Resorptionsweges über den AE4.

#### 4.4 Ausblick

Die bisherigen Versuche konnten keinen Aufschluss darüber geben, ob die bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen entstehende starke hypochlorämische metabolische Alkalose durch ein generelles Fehlen von  $\beta$ -Schaltzellen oder nur durch eine verminderte Aktivität des apikalen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters Pendrin zustande kommt. Um diese Fragestellung zu beantworten, sollten weitere Untersuchungen erfolgen. Mögliche Hinweise könnte die Bestimmung der mRNA- und Proteinexpression von Pendrin und NDCBE in *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen unter den verschiedenen Diäten liefern. Ebenso könnte die Häufigkeit und Lokalisation des für die  $\beta$ -ICs typischen Transporters Pendrin durch immunhistochemische Analysen bestimmt werden und damit aufzeigen, ob die *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäuse tatsächlich weniger  $\beta$ -Schaltzellen besitzen. Zur Untersuchung der genauen Transporteigenschaften des AE4 wären zudem Versuche an isolierten mikroperfundierten CCDs von *Ae4<sup>+/+</sup>* und *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen sinnvoll. Hierbei könnte eine mögliche  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Abhängigkeit des AE4-Transporters getestet werden. Eine Blutgasanalyse am 1. Tag der NaCl-Mangeldiät in Kombination mit  $\text{NaHCO}_3$  wäre ebenfalls denkbar, um zu untersuchen, ob sich bei den *Ae4<sup>-/-</sup>* Mäusen bereits initial eine hypochlorämische Alkalose entwickelt. Die Überprüfung der Aktivität anderer  $\text{Na}^+$ -Transporter (NHE3 sowie NCC und ENaC) unter der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $\text{NaHCO}_3$  erfolgte bereits auf molekularem Weg durch Proteinexpressionsanalysen. Zur Überprüfung auf funktioneller Ebene könnten die Transportwege mit Hilfe von Diuretika bzw. Blockern untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

### **Der renale AE4-Transporter (Slc4a9) ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase und Cl<sup>-</sup>-Balance**

Die  $\beta$ -Schaltzellen ( $\beta$ -ICs) vermitteln im renalen Sammelrohr die Sekretion von Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und tragen somit wesentlich zur Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase bei. Durch die Resorption von Natrium ( $\text{Na}^+$ ) und Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) sind die  $\beta$ -ICs zudem an der Regulation des Elektrolyt- und Volumenhaushalts beteiligt. Die Aufnahme von NaCl erfolgt auf der luminalen Seite der  $\beta$ -ICs durch die Zusammenarbeit des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters Pendrin (SLC26A4) und des  $\text{Na}^+$ -getriebenen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporters NDCBE (SLC4A8). Aufgrund von *In-vitro*-Untersuchungen wird angenommen, dass die basolaterale  $\text{Na}^+$ -Abgabe durch den Anionen-Austauscher 4 (AE4; SLC4A9) als  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransport vermittelt wird. Bisher wurde die Rolle des AE4 bei der Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance und des Volumenhaushalts *in vivo* nicht untersucht. Daher war es Ziel der Arbeit, die physiologische Funktion des AE4 während eines NaCl-Mangels und während einer Säure- oder Basenbelastung zu untersuchen.

Wildtyp-Mäuse ( $Ae4^{+/+}$ ) und AE4-defiziente Mäuse ( $Ae4^{-/-}$ ) wurden während einer NaCl-Mangeldiät sowie einer  $\text{Na}^+$ -Mangeldiät mit Säurebelastung oder einer  $\text{Cl}^-$ -Mangeldiät mit Basenbelastung untersucht. Es erfolgte eine Analyse der Plasmakonzentration sowie Urinausscheidung von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ . Das Plasmavolumen wurde mittels Evans Blue Methode bestimmt und durch den Hämatokrit abgeschätzt. Die Proteinexpression des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters NHE3, des  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters NCC und des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals ENaC wurden mittels Western Blot untersucht. Die Aktivität des NCC und ENaC wurden zusätzlich durch die Blockade mit Diuretika charakterisiert. Zudem wurde die Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma bestimmt. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde mit Hilfe transkutaner Fluoreszenz-Messung ermittelt. Mit einem Blutgasanalysegerät wurde der Säure-Basen-Status der Mäuse bestimmt.

Während der NaCl-Mangeldiät ließen sich keine Effekte der AE4-Defizienz auf die  $\text{Na}^+$ - und Volumenbalance beobachten. Die  $\text{Na}^+$ -Urinausscheidung der  $Ae4^{-/-}$  Mäuse war im Vergleich zu den  $Ae4^{+/+}$  Mäusen nicht erhöht. Nach 10 Tagen NaCl-Mangel war auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bei beiden Genotypen gleich aktiviert. Ein Fehlen des AE4 führte auch nicht zur vermehrten, kompensatorischen Aktivierung anderer renaler  $\text{Na}^+$ -Resorptionswege. Die  $\text{Na}^+$ -Mangeldiät mit Säurebelastung führte bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen nicht zur verstärkten Induktion einer metabolischen Azidose, da weder der pH-Wert noch die Standardbikarbonat-Konzentration im Plasma zwischen den  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  Mäusen unterschiedlich war. Demgegenüber zeigten die  $Ae4^{-/-}$  Mäuse unter der NaCl-Mangeldiät

eine hypochlorämische metabolische Alkalose, die bei den  $Ae4^{+/+}$  Kontrolltieren nicht zu beobachten war. Die  $Cl^-$ -Mangeldiät mit Basenbeladung verstärkte diesen Effekt, sodass sich eine schwerwiegende hypochlorämische metabolische Alkalose entwickelte. Der NHE3 im proximalen Tubulus, als wichtigster renaler  $HCO_3^-$ -Resorptionsweg, war bei den  $Ae4^{-/-}$  Mäusen weniger aktiviert. Daher wurde die beobachtete metabolische Alkalose durch eine eingeschränkte Kapazität zur renalen  $HCO_3^-$ -Sekretion verursacht.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der AE4 nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der  $Na^+$ -Balance und des Volumenhaushalts ist. Jedoch führt die AE4-Defizienz zu einer eingeschränkten renalen  $HCO_3^-$ -Sekretion und  $Cl^-$ -Resorption. Diese war bereits unter der NaCl-Mangeldiät zu beobachten, wurde jedoch unter dem  $Cl^-$ -Mangel mit Basenbeladung aggraviert. Daher besitzt der renale AE4 eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der Säure-Basen-Homöostase und des  $Cl^-$ -Haushalts.

## 6 Summary

### **The renal AE4 transporter (Slc4a9) is essential to maintain Cl<sup>-</sup> balance and acid-base homeostasis**

$\beta$ -intercalated cells ( $\beta$ -ICs) mediate the secretion of bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) in the renal collecting duct and are therefore essential for acid-base homeostasis. It has been shown that the  $\beta$ -ICs also participate in the regulation of electrolyte balance and volume homeostasis by the reabsorption of sodium ( $\text{Na}^+$ ) and chloride ( $\text{Cl}^-$ ). Luminal NaCl uptake is mediated by the parallel action of the  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger pendrin (SLC26A4) and the  $\text{Na}^+$ -driven  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger NDCBE (SLC4A8). It was suggested that the anion exchanger 4 (AE4; SLC4A9) mediates basolateral  $\text{Na}^+$  extrusion by  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransport. In vivo studies showing the function of AE4 are still lacking. Therefore, the aim of this study was to examine the physiological role of the AE4 during dietary NaCl depletion and during  $\text{Na}^+$ -depleted and acid-loaded diet or  $\text{Cl}^-$ -depleted and alkali-loaded diet using wild-type ( $Ae4^{+/+}$ ) and AE4-deficient mice ( $Ae4^{-/-}$ ).

Plasma concentration and urinary excretion of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  were analyzed. The plasma volume was determined by the Evans blue method and assessed by hematocrit. The protein abundance of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE3, the  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter NCC, and the epithelial  $\text{Na}^+$  channel ENaC were estimated by western blotting. The activity of the NCC and ENaC were analyzed by use of diuretics. The plasma renin activity and aldosterone concentration were determined. The glomerular filtration rate (GFR) was detected by transcutaneous fluorescence measurement. The acid-base status of the mice was determined with a blood-gas analyzer.

During NaCl-depleted diet, AE4 deficiency showed no effects on  $\text{Na}^+$  and volume balance. The urinary  $\text{Na}^+$  excretion of  $Ae4^{-/-}$  mice was not increased compared to  $Ae4^{+/+}$  mice. After 10 days of NaCl-depletion the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) was similarly activated in both genotypes and no compensatory activation of other renal  $\text{Na}^+$  reabsorption pathways was found in  $Ae4^{-/-}$  mice. After  $\text{Na}^+$ -depleted and acid-loaded diet the acid-base status of  $Ae4^{-/-}$  mice was not impaired, indicated by measurements of the pH and standard bicarbonate concentration in plasma. In contrast,  $Ae4^{-/-}$  mice exhibited a hypochloremic metabolic alkalosis after NaCl-depleted diet, which was not observed in  $Ae4^{+/+}$  mice. The  $\text{Cl}^-$ -depleted and alkali-loaded diet aggravated the effect and  $Ae4^{-/-}$  mice developed a severe hypochloremic metabolic alkalosis. The NHE3 in the proximal tubule, the main renal  $\text{HCO}_3^-$  reabsorption pathway, was downregulated in  $Ae4^{-/-}$  mice. This indicates, that the observed metabolic alkalosis was due to an impaired ability of the  $\beta$ -ICs to secrete  $\text{HCO}_3^-$ .

## Summary

---

In conclusion, this study showed that the AE4 is not essential for the regulation of the Na<sup>+</sup> and volume balance. However, it was shown that the AE4 deficiency causes an impaired renal ability to secrete HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and reabsorb Cl<sup>-</sup>. This was already observed during NaCl-depleted diet, but was aggravated during Cl<sup>-</sup>-depleted and alkali-loaded diet. Therefore, the renal AE4 has an essential role in maintaining acid-base homeostasis and Cl<sup>-</sup> balance.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ad	addiere
ADH	antidiuretisches Hormon
AE1	engl. <i>anion exchanger 1</i> ; Chlorid/Hydrogencarbonat-Antiporter
AE4	engl. <i>anion exchanger 4</i> ; Natrium/Hydrogencarbonat-Cotransporter
<i>Ae4<sup>+/+</sup></i>	bzw. <i>Slc4a9<sup>+/+</sup></i> ; AE4 Wildtyp
<i>Ae4<sup>-/-</sup></i>	bzw. <i>Slc4a9<sup>-/-</sup></i> ; AE4 Knockout
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AQP1	Aquaporin 1
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
ATL	engl. <i>ascending thin limb</i> ; aufsteigender dünner Teil der Henle-Schleife
AT <sub>1</sub>	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenüberschuss
BGA	Blutgasanalyse
bp	Basenpaar
BUN	engl. <i>blood urea nitrogen</i> ; Blut-Harnstoff-Stickstoff
b.w.	engl. <i>body weight</i> ; Körpergewicht
°C	Grad Celsius
CA	Carboanhydrase
CCD	engl. <i>cortical collecting duct</i> ; kortikales Sammelrohr
CD	engl. <i>collecting duct</i> ; Sammelrohr
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CIC	engl. <i>chloride channel</i> ; Chlorid-Kanal
cm	Zentimeter
CNT	engl. <i>connecting tubule</i> ; Verbindungstubulus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Crea	Kreatinin
d	engl. <i>day</i> ; Tag
DCT	engl. <i>distal convoluted tubule</i> ; distaler konvoluter Tubulus
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid

## Abkürzungsverzeichnis

---

DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinukleotidtriphosphate
DOCP	engl. <i>desoxycorticosterone pivalate</i> ; Desoxycorticosteronpivalat
DTL	engl. <i>descending thin limb</i> ; absteigender dünner Teil der Henle-Schleife
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EZV	Extrazellularvolumen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
g-Wert	relative Zentrifugalbeschleunigung
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonat (=Hydrogencarbonat)
(HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <sub>St</sub>	Standardbikarbonat
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCTZ	Hydrochlorothiazid
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphat
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Dihydrogenphosphat
HWZ	Halbwertszeit
IC	engl. <i>intercalated cell</i> ; Schaltzelle
IgG	Immunglobulin G
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
l	Liter
M	Molar
MCD	engl. <i>medullary collecting duct</i> ; medulläres Sammelrohr
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{mol}$	Mikromol
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Magermilchpulver
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
$\text{Na}^+$	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
NBCe1	engl. <i>electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter 1</i> ; elektrogener Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Cotransporter 1
NCC	Natriumchlorid-Cotransporter
NDCBE	<i>Na<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger</i> ; Na <sup>+</sup> -abhängiger Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Antiporter
<i>Ndcbe</i> <sup>+/+</sup>	NDCBE Wildtyp
<i>Ndcbe</i> <sup>-/-</sup>	NDCBE Knockout
ng	Nanogramm
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NHE3	Natrium-Protonen-Antiporter
NIC	engl. <i>non-invasive clearance</i>
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pCO <sub>2</sub>	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid
pH	lat. <i>potentia Hydrogenii</i>
pNCC	phosphorylierter Natriumchlorid-Cotransporter
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PCT	engl. <i>proximal convoluted tubule</i> ; <i>Pars convoluta</i> des proximalen Tubulus

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>Pds</i> <sup>+/+</sup>	Pendrin Wildtyp
<i>Pds</i> <sup>-/-</sup>	Pendrin Knockout
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
PST	engl. <i>proximal straight tubule</i> ; <i>Pars recta</i> des proximalen Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	engl. <i>renal outer medullary potassium channel</i> ; renaler Kalium-Kanal
s	Sekunde
s.c.	lat. <i>subcutan</i> ; subkutan
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> ; Standardmessfehler
TAL	engl. <i>thick ascending limb</i> ; aufsteigender dicker Teil der Henle-Schleife
U	Umdrehungen
U/ $\mu$ l	Units pro Mikroliter
V	Volt
WT	Wildtyp

## 8 Literaturverzeichnis

Al-Awqati, Q. (2011). "Terminal differentiation in epithelia: the role of integrins in hensin polymerization." Annu Rev Physiol **73**: 401-412.

Aronson, P. S. and G. Giebisch (2011). "Effects of pH on potassium: new explanations for old observations." J Am Soc Nephrol **22**(11): 1981-1989.

Atkins, J. L. and M. B. Burg (1985). "Bicarbonate transport by isolated perfused rat collecting ducts." Am J Physiol **249**(4 Pt 2): F485-489.

Boron, W. F. (2006). "Acid-base transport by the renal proximal tubule." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2368-2382.

Boron, W. F. and E. L. Boulpaep (2017). "Medical physiology." **3rd Edition**.

Capasso, G., R. Unwin, M. Rizzo, A. Pica and G. Giebisch (2002). "Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation." J Nephrol **15 Suppl 5**: S88-96.

Chambrey, R., I. Kurth, J. Peti-Peterdi, P. Houillier, J. M. Purkerson, F. Leviel, M. Hentschke, A. A. Zdebik, G. J. Schwartz, C. A. Hübner and D. Eladari (2013). "Renal intercalated cells are rather energized by a proton than a sodium pump." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(19): 7928-7933.

Curthoys, N. P. and O. W. Moe (2014). "Proximal tubule function and response to acidosis." Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN **9**(9): 1627-1638.

de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright and T. Unger (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." Pharmacol Rev **52**(3): 415-472.

Eladari, D., R. Chambrey, N. Picard and J. Hadchouel (2014). "Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation." Cell Mol Life Sci **71**(15): 2879-2895.

Everett, L. A., B. Glaser, J. C. Beck, J. R. Idol, A. Buchs, M. Heyman, F. Adawi, E. Hazani, E. Nassir, A. D. Baxevanis, V. C. Sheffield and E. D. Green (1997). "Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)." Nat Genet **17**(4): 411-422.

Feraille, E., D. Mordasini, S. Gonin, G. Deschenes, M. Vinciguerra, A. Doucet, A. Vandewalle, V. Summa, F. Verrey and P. Y. Martin (2003). "Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct." Ann N Y Acad Sci **986**: 570-578.

Frische, S., T. H. Kwon, J. Frokiaer, K. M. Madsen and S. Nielsen (2003). "Regulated expression of pendrin in rat kidney in response to chronic NH<sub>4</sub>Cl or NaHCO<sub>3</sub> loading." Am J Physiol Renal Physiol **284**(3): F584-593.

Gao, X., D. Eladari, F. Leviel, B. Y. Tew, C. Miro-Julia, F. H. Cheema, L. Miller, R. Nelson, T. G. Paunescu, M. McKee, D. Brown and Q. Al-Awqati (2010). "Deletion of hensin/DMBT1 blocks conversion of beta- to alpha-intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21872-21877.

- Garcia-Austt, J., D. W. Good, M. B. Burg and M. A. Knepper (1985). "Deoxycorticosterone-stimulated bicarbonate secretion in rabbit cortical collecting ducts: effects of luminal chloride removal and in vivo acid loading." Am J Physiol **249**(2 Pt 2): F205-212.
- Geibel, J., G. Giebisch and W. F. Boron (1990). "Angiotensin II stimulates both Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in the rabbit proximal tubule." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7917-7920.
- Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten and R. Taugner (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-1116.
- Hadchouel, J., C. Busst, G. Procino, G. Valenti, R. Chambrey and D. Eladari (2011). "Regulation of extracellular fluid volume and blood pressure by pendrin." Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology **28**(3): 505-512.
- Hafner, P., R. Grimaldi, P. Capuano, G. Capasso and C. A. Wagner (2008). "Pendrin in the mouse kidney is primarily regulated by Cl<sup>-</sup> excretion but also by systemic metabolic acidosis." Am J Physiol Cell Physiol **295**(6): C1658-1667.
- Hamm, L. L., N. Nakhoul and K. S. Hering-Smith (2015). "Acid-base homeostasis." Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN **10**(12): 2232-2242.
- Hennings, J. C., O. Andrini, N. Picard, M. Paulais, A. K. Huebner, I. K. Cayuqueo, Y. Bignon, M. Keck, N. Corniere, D. Bohm, T. J. Jentsch, R. Chambrey, J. Teulon, C. A. Hübner and D. Eladari (2017). "The ClC-K2 chloride channel is critical for salt handling in the distal nephron." J Am Soc Nephrol **28**(1): 209-217.
- Hentschke, M., S. Hentschke, U. Borgmeyer, C. A. Hübner and I. Kurth (2009). "The murine AE4 promoter predominantly drives type B intercalated cell specific transcription." Histochem Cell Biol **132**(4): 405-412.
- Hirohama, D., N. Ayuzawa, K. Ueda, M. Nishimoto, W. Kawarazaki, A. Watanabe, T. Shimosawa, T. Marumo, S. Shibata and T. Fujita (2018). "Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin." J Am Soc Nephrol **29**(1): 57-68.
- Jacques, T., N. Picard, R. L. Miller, K. A. Riemondy, P. Houillier, F. Sohet, S. K. Ramakrishnan, C. J. Busst, M. Jayat, N. Corniere, H. Hassan, P. S. Aronson, J. C. Hennings, C. A. Hübner, R. D. Nelson, R. Chambrey and D. Eladari (2013). "Overexpression of pendrin in intercalated cells produces chloride-sensitive hypertension." J Am Soc Nephrol **24**(7): 1104-1113.
- Kamel, K. S., M. Schreiber and M. L. Halperin (2018). "Renal potassium physiology: integration of the renal response to dietary potassium depletion." Kidney Int **93**(1): 41-53.
- Karlberg, B. E. (1983). "Adrenergic regulation of renin release and effects on angiotensin and aldosterone." Acta Med Scand Suppl **672**: 33-40.
- Kim, Y. H., V. Pech, K. B. Spencer, W. H. Beierwaltes, L. A. Everett, E. D. Green, W. Shin, J. W. Verlander, R. L. Sutliff and S. M. Wall (2007). "Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice." Am J Physiol Renal Physiol **293**(4): F1314-1324.

- Ko, S. B., X. Luo, H. Hager, A. Rojek, J. Y. Choi, C. Licht, M. Suzuki, S. Muallem, S. Nielsen and K. Ishibashi (2002). "AE4 is a DIDS-sensitive Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct." Am J Physiol Cell Physiol **283**(4): C1206-1218.
- Kurtz, A. (2012). "Control of renin synthesis and secretion." Am J Hypertens **25**(8): 839-847.
- Levey, A. S. and J. Coresh (2012). "Chronic kidney disease." Lancet **379**(9811): 165-180.
- Leviel, F., C. A. Hübner, P. Houillier, L. Morla, S. El Moghrabi, G. Brideau, H. Hassan, M. D. Parker, I. Kurth, A. Kougioumtzes, A. Sinning, V. Pech, K. A. Riemondy, R. L. Miller, E. Hummler, G. E. Shull, P. S. Aronson, A. Doucet, S. M. Wall, R. Chambrey and D. Eladari (2010). "The Na<sup>+</sup>-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na<sup>+</sup> reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice." J Clin Invest **120**(5): 1627-1635.
- Liddle, G. W. (1963). "A familial renal disorder stimulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion." Trans Assoc Am Physicians **76**: 199-213.
- Liu, Y., J. Yang and L.-M. Chen (2015). "Structure and function of SLC4 family HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters." Frontiers in Physiology **6**: 355.
- Masilamani, S., G. H. Kim, C. Mitchell, J. B. Wade and M. A. Knepper (1999). "Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney." J Clin Invest **104**(7): R19-23.
- Nesterov, V., B. Krueger, M. Bertog, A. Dahlmann, R. Palmisano and C. Korbmacher (2016). "In Liddle syndrome, epithelial sodium channel is hyperactive mainly in the early part of the aldosterone-sensitive distal nephron." Hypertension **67**(6): 1256-1262.
- Nikolaeva, S., S. Pradervand, G. Centeno, V. Zavadova, N. Tokonami, M. Maillard, O. Bonny and D. Firsov (2012). "The circadian clock modulates renal sodium handling." J Am Soc Nephrol **23**(6): 1019-1026.
- Pape, H.-C., A. Kurtz and S. Silbermagl (2014). "Physiologie." **7. Auflage**.
- Parker, M. D., W. F. Boron and M. J. A. Tanner (2002). Characterization of human 'AE4' as an electroneutral, sodium-dependent bicarbonate transporter.
- Parker, M. D., P. Bouyer, C. M. Daly and W. F. Boron (2008). "Cloning and characterization of novel human SLC4A8 gene products encoding Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger variants NDCBE-A, -C, and -D." Physiol Genomics **34**(3): 265-276.
- Parker, M. D., W. F. Boron and M. J. A. Tanner (2013). "The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters." Physiol Rev **93**(2): 803-959.
- Pech, V., T. D. Pham, S. Hong, A. M. Weinstein, K. B. Spencer, B. J. Duke, E. Walp, Y. H. Kim, R. L. Sutliff, H. F. Bao, D. C. Eaton and S. M. Wall (2010). "Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>." J Am Soc Nephrol **21**(11): 1928-1941.
- Pech, V., S. M. Wall, M. Nanami, H.-F. Bao, Y. H. Kim, Y. Lazo-Fernandez, Q. Yue, T. D. Pham, D. C. Eaton and J. W. Verlander (2015). "Pendrin gene ablation alters ENaC subcellular distribution and open probability." American Journal of Physiology - Renal Physiology **309**(2): F154-F163.

- Pena-Münzenmayer, G., A. T. George, G. E. Shull, J. E. Melvin and M. A. Catalan (2016). "AE4 (Slc4a9) is an electroneutral monovalent cation-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger." J Gen Physiol **147**(5): 423-436.
- Peti-Peterdi, J., D. G. Warnock and P. D. Bell (2002). "Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT<sub>1</sub> receptors." J Am Soc Nephrol **13**(5): 1131-1135.
- Pinelli, L., A. Nissant, A. Edwards, S. Lourdel, J. Teulon and M. Paulais (2016). "Dual regulation of the native ClC-K2 chloride channel in the distal nephron by voltage and pH." J Gen Physiol **148**(3): 213-226.
- Quentin, F., R. Chambrey, M. M. Trinh-Trang-Tan, M. Fysekidis, M. Cambillau, M. Paillard, P. S. Aronson and D. Eladari (2004). "The Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance." Am J Physiol Renal Physiol **287**(6): F1179-1188.
- Rossier, B. C. (2014). "Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure." Curr Opin Pharmacol **15**: 33-46.
- Rothenberger, F., A. Velic, P. A. Stehberger, J. Kovacicova and C. A. Wagner (2007). "Angiotensin II stimulates vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct." J Am Soc Nephrol **18**(7): 2085-2093.
- Roy, A., M. M. Al-bataineh and N. M. Pastor-Soler (2015). "Collecting duct intercalated cell function and regulation." Clin J Am Soc Nephrol **10**(2): 305-324.
- Royaux, I. E., K. Suzuki, A. Mori, R. Katoh, L. A. Everett, L. D. Kohn and E. D. Green (2000). "Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells." Endocrinology **141**(2): 839-845.
- Royaux, I. E., S. M. Wall, L. P. Karniski, L. A. Everett, K. Suzuki, M. A. Knepper and E. D. Green (2001). "Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4221-4226.
- Schuster, V. L., J. P. Kokko and H. R. Jacobson (1984). "Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules." J Clin Invest **73**(2): 507-515.
- Schwartz, G. J., S. Tsuruoka, S. Vijayakumar, S. Petrovic, A. Mian and Q. Al-Awqati (2002). "Acid incubation reverses the polarity of intercalated cell transporters, an effect mediated by hensen." The Journal of Clinical Investigation **109**(1): 89-99.
- Sinning, A., N. Radionov, F. Trepiccione, K. I. Lopez-Cayuqueo, M. Jayat, S. Baron, N. Corniere, R. T. Alexander, J. Hadchouel, D. Eladari, C. A. Hübner and R. Chambrey (2017). "Double knockout of the Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger and Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter induces hypokalemia and volume depletion." J Am Soc Nephrol **28**(1): 130-139.
- Soleimani, M., S. M. Grassi and P. S. Aronson (1987). "Stoichiometry of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex." J Clin Invest **79**(4): 1276-1280.

- Soleimani, M., S. Barone, J. Xu, G. E. Shull, F. Siddiqui, K. Zahedi and H. Amlal (2012). "Double knockout of pendrin and NaCl cotransporter (NCC) causes severe salt wasting, volume depletion, and renal failure." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(33): 13368-13373.
- Star, R. A., M. B. Burg and M. A. Knepper (1985). "Bicarbonate secretion and chloride absorption by rabbit cortical collecting ducts. Role of chloride/bicarbonate exchange." J Clin Invest **76**(3): 1123-1130.
- Tetti, M., S. Monticone, J. Burrello, P. Matarazzo, F. Veglio, B. Pasini, X. Jeunemaitre and P. Mulatero (2018). "Liddle syndrome: review of the literature and description of a new case." Int J Mol Sci **19**(3).
- Toye, A. M., M. D. Parker, C. M. Daly, J. Lu, L. V. Virkki, M. F. Pelletier and W. F. Boron (2006). "The human NBCe1-A mutant R881C, associated with proximal renal tubular acidosis, retains function but is mistargeted in polarized renal epithelia." Am J Physiol Cell Physiol **291**(4): C788-801.
- Tsuganezawa, H., K. Kobayashi, M. Iyori, T. Araki, A. Koizumi, S. Watanabe, A. Kaneko, T. Fukao, T. Monkawa, T. Yoshida, D. K. Kim, Y. Kanai, H. Endou, M. Hayashi and T. Saruta (2001). "A new member of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney." J Biol Chem **276**(11): 8180-8189.
- Vallet, M., N. Picard, D. Loffing-Cueni, M. Fysekidis, M. Bloch-Faure, G. Deschenes, S. Breton, P. Meneton, J. Loffing, P. S. Aronson, R. Chambrey and D. Eladari (2006). "Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent." J Am Soc Nephrol **17**(8): 2153-2163.
- van der Lubbe, N., C. H. Lim, M. E. Meima, R. van Veghel, L. L. Rosenbaek, K. Mutig, A. H. Danser, R. A. Fenton, R. Zietse and E. J. Hoorn (2012). "Aldosterone does not require angiotensin II to activate NCC through a WNK4-SPAK-dependent pathway." Pflugers Arch **463**(6): 853-863.
- Verlander, J. W., K. M. Madsen, J. K. Cannon and C. C. Tisher (1994). "Activation of acid-secreting intercalated cells in rabbit collecting duct with ammonium chloride loading." Am J Physiol **266**(4 Pt 2): F633-645.
- Verlander, J. W., K. A. Hassell, I. E. Royaux, D. M. Glapion, M. E. Wang, L. A. Everett, E. D. Green and S. M. Wall (2003). "Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension." Hypertension **42**(3): 356-362.
- Verlander, J. W., Y. H. Kim, W. Shin, T. D. Pham, K. A. Hassell, W. H. Beierwaltes, E. D. Green, L. Everett, S. W. Matthews and S. M. Wall (2006). "Dietary Cl<sup>-</sup> restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells." Am J Physiol Renal Physiol **291**(4): F833-839.
- Verlander, J. W., S. Hong, V. Pech, J. L. Bailey, D. Agazatian, S. W. Matthews, T. M. Coffman, T. Le, T. Inagami, F. M. Whitehill, I. D. Weiner, D. B. Farley, Y. H. Kim and S. M. Wall (2011). "Angiotensin II acts through the angiotensin 1a receptor to upregulate pendrin." American Journal of Physiology - Renal Physiology **301**(6): F1314-F1325.
- Wagner, C. A., K. E. Finberg, P. A. Stehberger, R. P. Lifton, G. H. Giebisch, P. S. Aronson and J. P. Geibel (2002). "Regulation of the expression of the Cl<sup>-</sup>/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status." Kidney Int **62**(6): 2109-2117.

Wald, H. (1999). "Regulation of the ROMK potassium channel in the kidney." Exp Nephrol **7**(3): 201-206.

Wall, S. M. (2016). "The role of pendrin in blood pressure regulation." Am J Physiol Renal Physiol **310**(3): F193-203.

Wall, S. M., K. A. Hassell, I. E. Royaux, E. D. Green, J. Y. Chang, G. L. Shipley and J. W. Verlander (2003). "Localization of pendrin in mouse kidney." Am J Physiol Renal Physiol **284**(1): F229-241.

Wall, S. M., Y. H. Kim, L. Stanley, D. M. Glapion, L. A. Everett, E. D. Green and J. W. Verlander (2004). "NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl<sup>-</sup> conservation." Hypertension **44**(6): 982-987.

Wall, S. M. and A. M. Weinstein (2013). "Cortical distal nephron Cl<sup>-</sup> transport in volume homeostasis and blood pressure regulation." Am J Physiol Renal Physiol **305**(4): F427-438.

Wemeau, J. L. and P. Kopp (2017). "Pendred syndrome." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **31**(2): 213-224.

Xu, J., S. Barone, S. Petrovic, Z. Wang, U. Seidler, B. Riederer, K. Ramaswamy, P. K. Dudeja, G. E. Shull and M. Soleimani (2003). "Identification of an apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in gastric surface mucous and duodenal villus cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(6): G1225-1234.

Xu, J., S. Barone, M. B. Brooks and M. Soleimani (2013). "Double knockout of carbonic anhydrase II (CAII) and Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC) causes salt wasting and volume depletion." Cell Physiol Biochem **32**(7): 173-183.

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung einzelner Transporter des proximalen Tubulus zur NaCl- und $\text{HCO}_3^-$ -Resorption .....	4
<b>Abbildung 2:</b> A Schematische Darstellung der Abschnitte eines Nephrons und B NaCl-Resorption in den distalen Nephronsegmenten DCT1, DCT2 und CNT/CD .....	6
<b>Abbildung 3:</b> A Schematische Darstellung der Transporter der $\alpha$ -Schaltzelle und B Schematische Darstellung der Transporter der $\beta$ -Schaltzelle .....	8
<b>Abbildung 4:</b> Beispiel eines Agarosegels .....	29
<b>Abbildung 5:</b> Metabolischer Käfig .....	30
<b>Abbildung 6:</b> Vorbereitung GFR-Messung .....	34
<b>Abbildung 7:</b> Auswertung der Fluoreszenz-/Zeit-Kurve entsprechend der Ausscheidungsdynamik von FITC-Sinistrin.....	35
<b>Abbildung 8:</b> Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ unter Normaldiät .....	46
<b>Abbildung 9:</b> Hämatokrit von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ unter Normaldiät.....	47
<b>Abbildung 10:</b> Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ unter Normaldiät .....	48
<b>Abbildung 11:</b> Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät .....	49
<b>Abbildung 12:</b> Plasmavolumen, Hämatokrit und Konzentration des BUN von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät .....	50
<b>Abbildung 13:</b> Glomeruläre Filtrationsrate von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 7. oder 8. Tag der 11-tägigen NaCl-Mangeldiät.....	51
<b>Abbildung 14:</b> Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ unter der Normaldiät und 20 h nach dem Wechsel auf die NaCl-Mangeldiät in der Dunkelphase (Tiere aktiv).....	52
<b>Abbildung 15:</b> Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät in der Dunkelphase (Tiere aktiv).....	53
<b>Abbildung 16:</b> Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät kurz vor Beginn der Dunkelphase .....	54
<b>Abbildung 17:</b> Western Blots und Proteinexpression des NHE3 und pNHE3 Ser552 sowie des $\beta$ -Actins von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.....	56
<b>Abbildung 18:</b> Western Blots und Proteinexpression des NCC und pNCC Thr60 von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.....	57
<b>Abbildung 19:</b> Western Blots und Proteinexpression der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheit des ENaC von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 10. Tag der NaCl-Mangeldiät.....	58

**Abbildung 20:** Antwort der Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid auf Hydrochlorothiazid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät .....60

**Abbildung 21:** Antwort der Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid auf Amilorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät.....61

**Abbildung 22:** Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit  $NH_4Cl$ .....63

**Abbildung 23:** Hämatokrit von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit  $NH_4Cl$  .....64

**Abbildung 24:** Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  .....67

**Abbildung 25:** Plasmavolumen, Hämatokrit und Konzentration des BUN von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  .....68

**Abbildung 26:** Glomeruläre Filtrationsrate von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 6. Tag der 7-tägigen NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$ .....69

**Abbildung 27:** Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  unter der Normaldiät und 20 h nach dem Wechsel auf die NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  in der Dunkelphase (Tiere aktiv).....70

**Abbildung 28:** Urinausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bei  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  in der Dunkelphase (Tiere aktiv).....71

**Abbildung 29:** pH-Wert, Partialdruck von Kohlenstoffdioxid und Konzentration des Standardbikarbonats im Plasma von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$ .....73

**Abbildung 30:** Western Blots und Proteinexpression des NHE3 und pNHE3 Ser552 sowie des  $\beta$ -Actin von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$ .....74

**Abbildung 31:** Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  kurz vor Beginn der Dunkelphase .....75

**Abbildung 32:** Western Blots und Proteinexpression des NCC und pNCC Thr60 von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$  .....76

**Abbildung 33:** Western Blots und Proteinexpression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC von  $Ae4^{+/+}$  und  $Ae4^{-/-}$  am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 230 mM  $NaHCO_3$ .....78

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Substanzen für Standardansatz .....	28
<b>Tabelle 2:</b> Sequenzen der eingesetzten Primer .....	28
<b>Tabelle 3:</b> Phasen der PCR .....	28
<b>Tabelle 4:</b> Länge des amplifizierten Genabschnitts verschiedener Genotypen.....	29
<b>Tabelle 5:</b> Substanzen für die Herstellung von zwei Mini-Polyacrylamid-Gelen (Tris-HCl-Gele, 8 %ig) .....	42
<b>Tabelle 6:</b> Probenkonzentrationen, Bandenhöhen sowie Verdünnungen des 1. und 2. Antikörpers einzelner Transportproteine für den Western Blot.....	44
<b>Tabelle 7:</b> Säure-Basen-Status von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ unter Normaldiät .....	48
<b>Tabelle 8:</b> Säure-Basen-Status von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 11. Tag der NaCl-Mangeldiät .....	62
<b>Tabelle 9:</b> Säure-Basen-Status von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit $NH_4Cl$ .....	65
<b>Tabelle 10:</b> Konzentrationen der Plasmaelektrolyte von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 280 mM $NaHCO_3$ .....	66
<b>Tabelle 11:</b> Säure-Basen-Status von $Ae4^{+/+}$ und $Ae4^{-/-}$ am 7. Tag der NaCl-Mangeldiät mit 280 mM $NaHCO_3$ .....	71

## 11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit die Dissertation an seinem Institut anfertigen zu dürfen sowie für seine immer freundliche und professionelle Betreuung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Salah Amasheh danke ich für die Übernahme dieser Arbeit zur Vorlage beim Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sowie für die Beratung bei der Anfertigung der Promotionsschrift.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Helga Vitzthum für die umfassende Unterstützung, die Einarbeitung in die Methodik und ihre Hilfe bei der Versuchsplanung und -durchführung. Außerdem danke ich ihr für die unendliche Geduld, die unzähligen Ratschläge sowie für das zeitaufwändige Korrekturlesen dieser Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie für die freundliche und kollegiale Atmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit bedanken. Für die Genotypisierungen und das Anlernen von molekularbiologischen Methoden im Labor danke ich Frau Margrit Hölzel, Frau Annett Hasse und Frau Dipl.-Biol. Jessica Wollberg. Ebenso danke ich Frau Anke Grosse für die Arbeit im Hintergrund, ohne welche ein reibungsloser Ablauf im Labor und bei den Versuchen nicht möglich gewesen wäre. Einen lieben Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Isabel Meyer, Philipp Tessmer und Torben Neuss für die gegenseitige Unterstützung und lustigen Anekdoten im Gemeinschaftsbüro. Außerdem danke ich Herrn Dipl.-Ing. Peter Bassalay für die Hilfe bei technischen Problemen und Frau Claudia Kollien für die organisatorische Unterstützung des Arbeitsalltags.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche immer ein offenes Ohr für mich hatten und an mich geglaubt haben.

## 12 Publikationsverzeichnis

### 12.1 Poster

Koch, M., H. Vitzthum, C. A. Hübner, H. Ehmke (2017). "The renal AE4 transporter (Slc4a9) is not essential for maintaining Na<sup>+</sup> balance during dietary salt depletion." Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 14.-17.09.2017 in Mannheim

Koch, M., H. Vitzthum, C. A. Hübner, H. Ehmke (2018). "Na<sup>+</sup> and volume balance is maintained in AE4 (Slc4a9) knockout mice during Na<sup>+</sup> depletion." Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (*Europhysiology*), 13.-16.09.2018 in London

## **13 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 18.03.2019

Mirijam Koch