

**Die Rolle des mTOR2-Komplexes bei der Regulation  
der Natrium- und Kaliumausscheidung  
im distalen Tubulus der Niere**

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

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

**vorgelegt von  
Ahmed, Azaz**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Garaschuk

Meiner Familie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

3. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Nephrologie Berlin 2011:

*“Role of the mTOR complex in tubular homeostasis and stress response”*

F. Artunc, A. Ahmed, T. Cordts, F. Arnold, S. Schneider, W. Reichardt, D. Kerjaschki, M. Hall, M. Ruegg, T. B. Huber, F. Grahammer

4. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Nephrologie Hamburg 2012:

*“mTORC2 critically regulates distal tubular sodium and potassium homeostasis”*

F. Artunc, A. Ahmed, F. Steinhardt, M. Hall, M. Ruegg, T. B. Huber, F. Grahammer

51. Kongress der europäischen Nephrologenvereinigung ERA-EDTA Istanbul 2013:

*“Diverse roles of mTOR complexes in tubular function”*

F. Artunc, A. Ahmed, N. Haenisch, M. Roerden, T. Cordts, F. Arnold, D. Kerjaschki, M. Hall, T. B. Huber, F. Grahammer

Das Manuskript dieser Arbeit wurde in folgendem Journal eingereicht:

The Journal of Clinical Investigation (JCI):

*„mTORC2 critically regulates renal potassium handling“*

F. Grahammer, A. Ahmed, V. Nesterov, F. Steinhardt, L. Sandner, F. Arnold, T. Cordts, M. Bertog, S. Negrea, M. Ruegg, M. Hall, G. Walz, T. B. Huber, F. Artunc

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1. Aufbau und Funktion der Niere.....	4
1.2. Die Tubulusfunktion.....	6
1.2.1. Das distale Nephron und die Hauptzelle.....	8
1.3. Aldosteron .....	10
1.4. Mammalian target of rapamycin (mTOR) .....	11
1.4.1. mTORC2 und die distal-tubuläre Hauptzelle.....	14
1.5. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2. Material und Methodik.....</b>	<b>17</b>
2.1. Die Tierhaltung .....	17
2.2. Das Mausmodell.....	17
2.2.1. Das Cre/loxP-System .....	17
2.2.2. Die KspCre-Maus.....	18
2.2.3. Die Rictor <sup>fl/fl</sup> - und Rictor <sup>fl/fl</sup> *KspCre-Maus .....	19
2.3. Untersuchungen im metabolischen Käfig .....	19
2.3.1. Der Ablauf einer Versuchsserie .....	20
2.3.2. Narkose und venöse Blutentnahme .....	21
2.4. Eingesetzte Stressmodelle .....	21
2.4.1. Diäten .....	22
2.4.1.1. Kontrolldiät .....	22
2.4.1.2. Niedrigsalz/Normalkalium-Diät.....	22

# Inhaltsverzeichnis

---

2.4.1.3. Niedrigsalz/Hochkalium-Diät .....	22
2.4.1.4. Normalsalz/Hochkalium-Diät .....	22
2.4.1.5. Hochsalz/Hochkalium-Diät .....	23
2.4.2. Diuretika.....	23
2.4.2.1. Furosemid .....	23
2.4.2.2. Thiazid.....	23
2.4.2.3. Triamteren .....	23
2.5. Erfasste Parameter bei den Experimenten im metabolischen Käfig.....	24
2.5.1. Bestimmung des Gewichts .....	24
2.5.2. Bestimmung der Trink- und Fressmenge.....	24
2.5.3. Bestimmung der Urinmenge .....	24
2.6. Erfasste Laborparameter.....	25
2.6.1. Parameterbestimmungen aus den Urinproben .....	25
2.6.1.1. Natrium- und Kaliumkonzentration .....	25
2.6.1.2. Kreatininkonzentration.....	26
2.6.2. Parameterbestimmungen aus den Blutproben.....	27
2.6.2.1. Hämatokrit.....	27
2.6.2.2. Natrium- und Kaliumkonzentration .....	27
2.6.2.3. Harnstoff.....	28
2.6.2.4. Aldosteron .....	29
2.7. Blutdruckmessung.....	29
2.8. Statistische Datenanalyse .....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Homöostase von Wildtyp- und Rictor <sup>fl/fl</sup> *KspCre-Tiere unter diätetischen Interventionen.....	31
3.1.1. Körpergewicht und Körpergewichtsänderung .....	32
3.1.2. Fressmenge.....	34
3.1.3. Trinkmenge.....	35

# Inhaltsverzeichnis

---

3.1.4. Urinmenge .....	36
3.1.5. Serumharnstoff .....	37
3.1.6. Serumnatrium- und Serumkaliumkonzentration .....	38
3.1.7. Serumaldosteron .....	40
3.1.8. Urinnatrium- und Urinkaliumausscheidung .....	41
3.1.9. Blutdruck.....	43
3.2. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Homöostase der Wildtyp- und Rictor <sup>fl/fl</sup> *KspCre-Tiere unter diuretischen Interventionen .....	44
3.2.1. Diuretikadosis .....	45
3.2.2. Körpergewichtsänderung .....	46
3.2.3. Fressmenge .....	47
3.2.4. Trinkmenge .....	48
3.2.5. Urinmenge .....	49
3.2.6. Serumharnstoff .....	50
3.2.7. Serumnatrium- und Serumkaliumkonzentration .....	51
3.2.8. Serumaldosteron .....	53
3.2.9. Urinnatrium- und Urinkaliumausscheidung .....	54
3.2.10. Blutdruck.....	58
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µmol	Mikromolar
ACE	Angiotensin-I-Konversionsenzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CA	Karboanhydrase
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CAI	Karboanhydrase-Inhibitor
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENaC	epithelial Na <sup>+</sup> channel, epithelialer Natrium-Kanal
FKBP-12	FK506-binding protein 12
g	Gramm
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HM	hydrophobic motif
HS/HK	Hochsalz/Hochkalium
IGF-1	insulin-like growth factor 1
iNOS	induzierbare NO-Synthase



## Abkürzungsverzeichnis

---

K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
l	Liter
LS/HK	Niedrigsalz/Hochkalium
LS/NK	Niedrigsalz/Normalkalium
M	Molar
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mM	Millimolar
MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
Na <sup>+</sup>	Natrium
NCC	Natrium-Chlorid-Symporter
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NHERF2	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger releasing factor isoform 2
NKCC2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Kotransporter
nm	Nanometer
NS/HK	Normalsalz/Hochkalium
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphat
PRAS40	Proline rich AKT substrate of 40 kDa
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raptor	regulatory associated protein of mTOR

## Abkürzungsverzeichnis

---

Rictor	rapamycin insensitive companion of mTOR
ROMK	renal outer medullary K <sup>+</sup> channel, Kalium-Kanal des äußeren Nierenmarks
rpm	rounds per minute
Ser	Serin
SGK1	Serum- und Glukokortikoid-Kinase 1
SPF	spezifiziert pathogen frei
TAL	thick ascending limb, dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife
Thr	Threonin
TSC	tuberous sclerosis complex
WNK1	with no k 1, Lysin-defiziente Protein Kinase 1

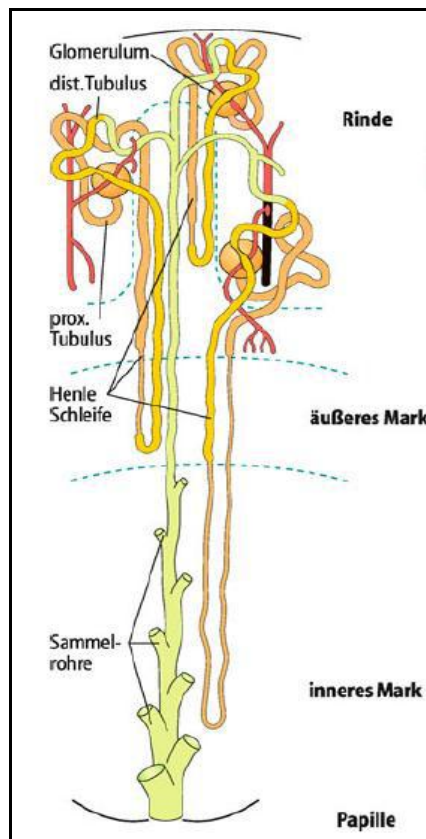
## 1. Einleitung

### 1.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig vorkommendes harnbereitendes Organ, welches in erster Linie als lebenswichtiges Ausscheidungsorgan fungiert. Die Niere ist maßgeblich an der Regulation des Salz- und Wasser- sowie des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Einstellung des Blutdrucks und erfüllt endokrine Funktionen, wie beispielsweise die Bildung des bei der Blutproduktion benötigten Erythropoietin und Calcitriol, welches eine wichtige Rolle im Mineralhaushalt spielt.

Das im Retroperitonealraum liegende etwa 150 g schwere Organ ist von einer bindegewebigen Kapsel und von einer Fettgewebekapsel umgeben und lässt sich makroskopisch in Nierenrinde und Nierenmark einteilen.

In der Nierenrinde befinden sich die funktionellen Einheiten der Niere, die sogenannten Glomerula. Die Nieren verfügen zusammen in etwa über zwei Millionen solcher Filtrationseinheiten. Diese bestehen aus einem Kapillarkonvolut und einer doppelwandigen Kapsel, der sogenannten Bowman-Kapsel. Die Bowman-Kapsel stellt den Anfang des folgenden Tubulussystems dar, an dessen Ende fusionierende Sammelrohre offen in die Nierenpapille münden. Diese Gesamtheit aus Glomerulum und des sich anschließenden Tubulusapparats wird als Nephron bezeichnet.



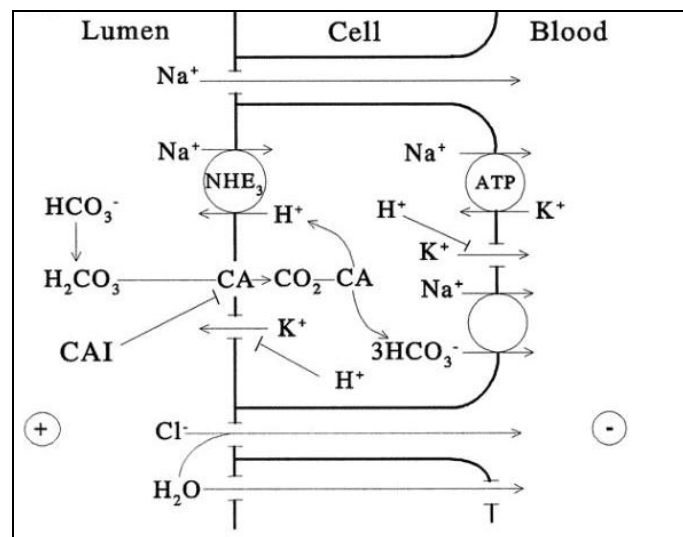
**Abbildung 1: Schematische Übersicht des Nephrons und seiner Abschnitte**  
(Schmidt and Lang 2007)

Die von der Aorta abgehenden Nierenarterien münden in ein komplexes Gefäßsystem, aus welchem die dem Glomerulum vor- und nachgeschalteten Vasa afferentia und Vasa efferentia hervorgehen. Der im Kapillarkonvolut herrschende Druck sorgt dafür, dass Wasser und darin gelöste Stoffe abfiltriert werden; zelluläre Bestandteile und Proteine mit einem Durchmesser  $> 4$  nm bzw. einem Molekulargewicht  $> 60$  kDa können den Filter jedoch nicht passieren. Diese Selektivität wird von einem gröÙenselektiven Filter sichergestellt, welcher aus fenestriertem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den Fußfortsätzen der Podozyten mit dazwischen aufgespannter Schlitzmembran besteht. Aus den so gebildeten 180 l Primärharn pro Tag wird der Großteil während der Passage durch den Tubulusapparat zurückgewonnen und ein konzentrierter Endharn von etwa 1,5 l pro Tag über die ableitenden Harnwege ausgeschieden (Paulsen and Lüllmann-Rauch 2012).

## 1.2. Die Tubulusfunktion

Die wesentliche Aufgabe des Tubulussystems ist die Bildung des Endharns aus dem Primärharn. Das Tubulussystem spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts. Das Filtrat gelangt zunächst in den proximalen Tubulus, welcher in die Henle-Schleife mündet. Diese besteht aus folgenden Abschnitten: der Pars recta des proximalen Tubulus, einem dünnen Teil und einem dicken aufsteigenden Teil (Thick Ascending Limb of Henle's Loop= TAL). Anschließend gelangt die filtrierte Flüssigkeit über den distalen Tubulus und das Verbindungsstück zum Sammelrohr. Über 300 solche Sammelrohre (Ductus papillares) gelangt der Urin in das Nierenbecken (Schmidt and Lang 2007).

Der proximale Tubulus weist eine hohe Transportkapazität auf, wobei keine hohen Konzentrationsgradienten aufgebaut werden können. Für eine stets niedrige intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration sorgt die basolateral gelegene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und stellt somit den Antrieb für jegliche Transportprozesse dar. Die wichtigsten Transportprozesse sind der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport, der  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symport,  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Symporte (Glukose, Galaktose, einige Aminosäuren, Phosphat, Sulfat, Laktat) und  $\text{H}^+$ -Kotransporte für Peptide.

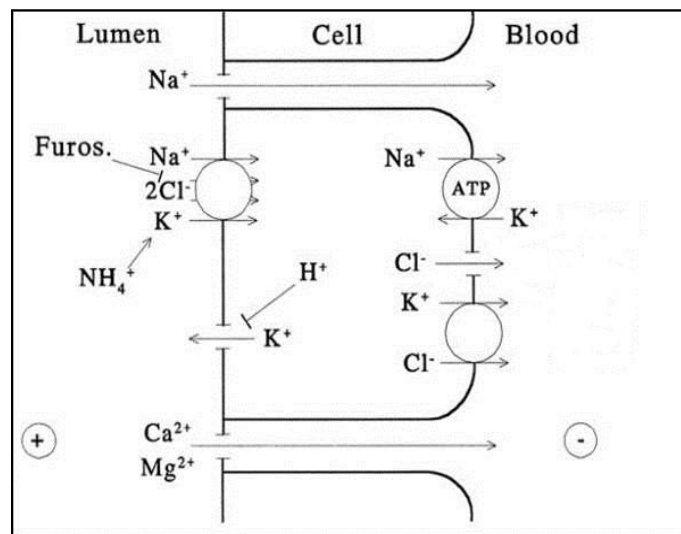


**Abbildung 2: Übersicht der Transportprozesse im proximalen Tubulus**

Darstellung der Basismechanismen der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ -,  $\text{HCO}_3^-$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Absorption im proximalen Tubulus. Veranschaulichung der parazellulären  $\text{NaCl}$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Absorption. CA: Carboanhydrase, CAI: Carboanhydrase-Inhibitor,  $\text{NHE}_3$ :  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, ATP (im Kreis):  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Greger 2000).

Die Henle-Schleife ist für den Prozess der Harnkonzentrierung unabdingbar. Sie stellt den Teil des Tubulussystems dar, welcher die Tubulusflüssigkeit aus der Nierenrinde ins Nierenmark und wieder zurück in die Nierenrinde leitet. Die NaCl-Resorption in der TAL über den furosemidsensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter (NKCC2) führt zur Bildung eines hypotonen Harns und einem hypertonen Interstitium, da  $\text{H}_2\text{O}$  wegen undurchlässiger tight junctions dem NaCl nicht folgen kann. Dies begünstigt die Wasserrückresorption im absteigenden Teil der Henle-Schleife, in welchem die tight junctions wasserdurchlässig sind, und im Sammelrohr, in welchem die Rückresorption über den Einbau von Aquaporinen in die apikale Membran gesteuert wird (Paulsen and Lüllmann-Rauch 2012).

Die treibende Kraft für die erläuterten Prozesse ist die basolateral gelegene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Greger 2000).



**Abbildung 3: Übersicht der Transportprozesse in der TAL**

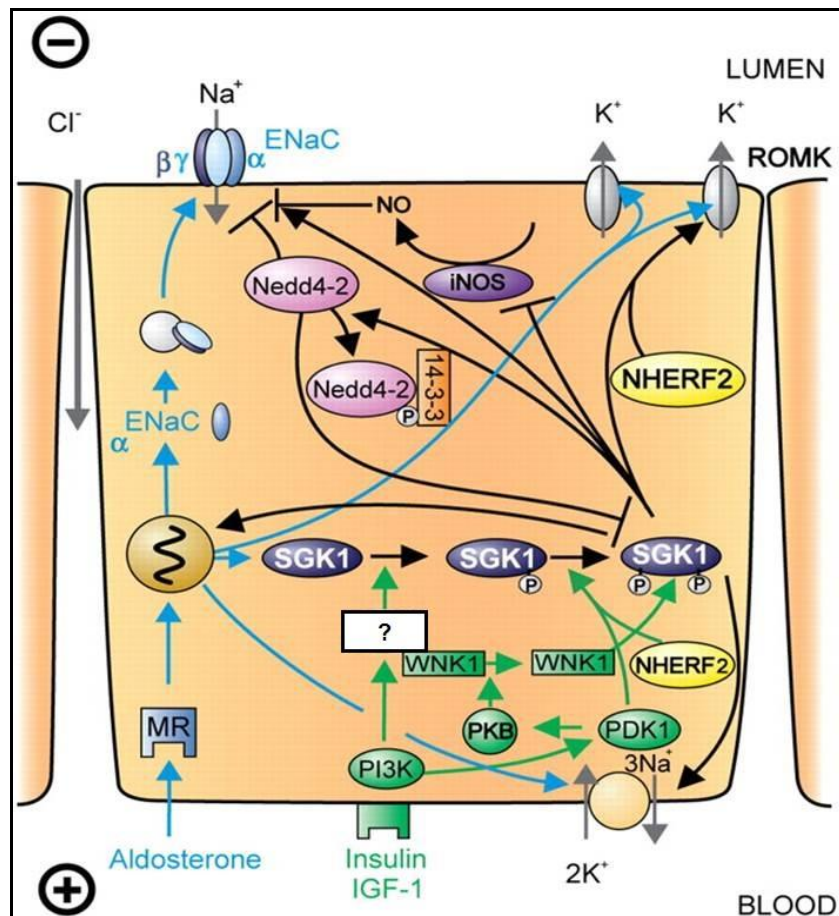
Darstellung der Basismechanismen der NaCl-Absorption in der TAL. ATP (im Kreis):  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Greger 2000).

### 1.2.1. Das distale Nephron und die Hauptzelle

Um die nierenspezifische Rolle des mTOR2-Komplexes adäquat einzuordnen und zu ergründen, ist es notwendig das distale Nephron (distaler Tubulus, Verbindungsstück und Sammelrohr) und im Speziellen den distalen Tubulus und dessen Bestandteile detailliert zu beleuchten.

Das distale Nephron ist als letzter Abschnitt des Tubulussystems für die endgültige Zusammensetzung des Harns verantwortlich. Hier kann gegen hohe Gradienten transportiert werden, wobei die Transportkapazität relativ gering ist. Aus diesem Grund kann eine eingeschränkte Resorptionsfähigkeit des proximalen Tubulus oder der Henle-Schleife nur bedingt durch gesteigerte Resorption im distalen Tubulus kompensiert werden. Das distale Nephron besteht aus mehreren unterschiedlichen Segmenten. Im fröhdistalen Abschnitt überwiegen die thiazidsensitiven NaCl- und  $\text{Ca}^{2+}$ -resorbierenden fröhdistalen Tubuluszellen, im Verbindungsstück und Sammelrohr die NaCl-resorbierenden und  $\text{K}^+$ -sezernierenden Hauptzellen. Die  $\text{H}^+$ - oder  $\text{HCO}_3^-$ -sezernierenden Schaltzellen (Typ A oder B) kommen im distalen Nephron ubiquitär vor.

Die aldosteronregulierte Hauptzelle hat im Rahmen unseres Forschungsprojekts eine besondere Bedeutung. Diese kommt vor allem im spätdistalen Tubulus und Sammelrohr vor und ist durch luminal gelegene  $\text{Na}^+$  (ENaC)- und  $\text{K}^+$  (ROMK)-Kanäle, sowie eine basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gekennzeichnet. Von luminal aufgenommenes  $\text{Na}^+$  wird über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wieder aus der Zelle gepumpt, somit resorbiert die Zelle  $\text{Na}^+$  im Austausch mit  $\text{K}^+$ . Folglich ist eine gesteigerte  $\text{Na}^+$ -Resorption an eine erhöhte  $\text{K}^+$ -Sekretion und -Ausscheidung gekoppelt. Eine besondere Rolle bei der Regulation dieser Mechanismen spielt das Hormon Aldosteron, welches über die Bindung an intrazelluläre Mineralkortikoidrezeptoren den Einbau von ENaC, ROMK und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen in die luminale bzw. basolaterale Zellmembran fördert. Die Wirkung von Aldosteron wird intrazellulär unter anderem von der Serum-Glukokortikoid-Kinase 1 (SGK1) vermittelt, deren Expression durch Aldosteron gesteigert wird (Schmidt and Lang 2007).



**Abbildung 4: SGK1-abhängige Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Regulation in der aldosteronsensitiven Hauptzelle**

Darstellung der von Aldosteron vermittelten intrazellulären Vorgänge in der Hauptzelle. Weitere Erläuterung in folgendem Text (Lang, Bohmer et al. 2006).

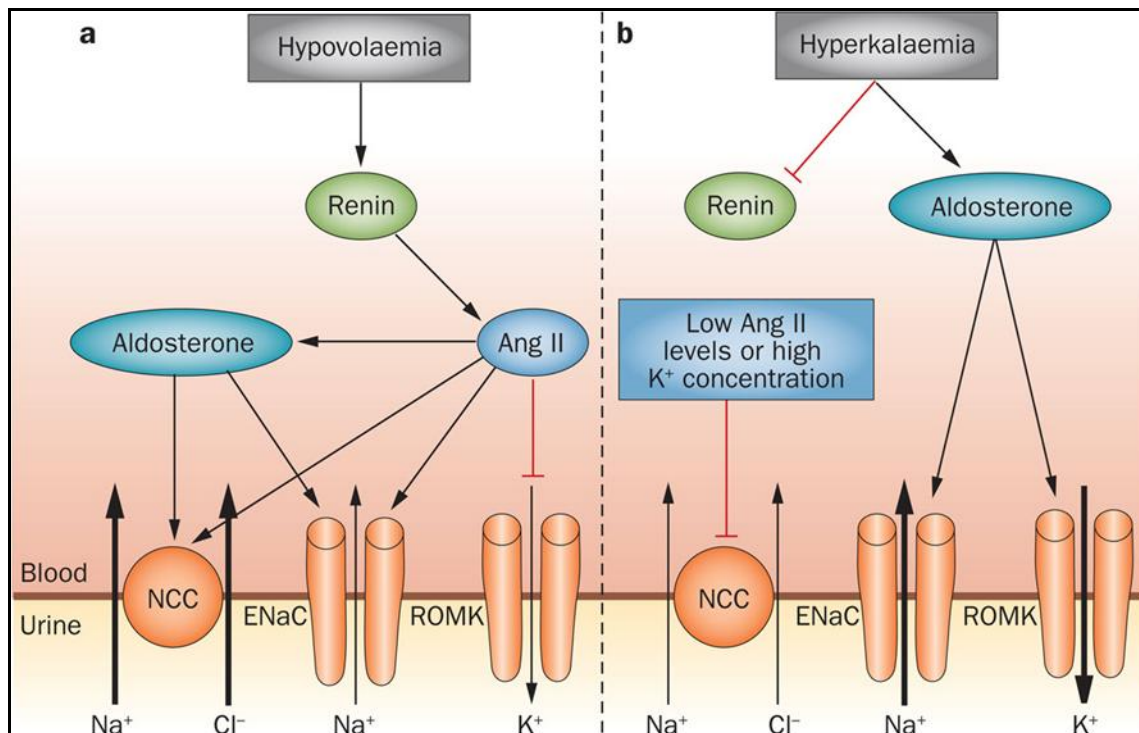
Die obige Abbildung zeigt, dass die Bindung von Aldosteron an den Mineralkortikoidrezeptor (MR) die Expression der SGK1, des ENaC und des ROMK stimuliert. Nach Vereinigung der α-, β- und γ-Untereinheiten des ENaC wird dieser vollständig aktiv. Die SGK1 wird durch Anregung von Insulin oder des insulin-like growth factor 1 (IGF-1) unter Einfluss der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und einer weiteren unbekannteten Kinase (in der Abbildung mit ? dargestellt) an <sup>422</sup>Ser erstmalig phosphoryliert. Diese phosphorylierte SGK1 muss nun durch Vermittlung von PDK1 und/oder Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger releasing factor isoform 2 (NHERF2) erneut an <sup>256</sup>Thr phosphoryliert werden, um so die weitere intrazelluläre Signalkaskade aufrechtzuerhalten. Möglicherweise kann PDK1 diesen Schritt auch indirekt durch Phosphorylierung der WNK1 (with no K= Lysin-defiziente Protein Kinase 1) katalysieren. Diese zweifach



phosphorylierte, vollständig aktive SGK1 steigert die Na<sup>+</sup>-Absorption durch Erhöhung der Membranexpression des ENaC, indem sie die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 phosphoryliert (Bhalla, Daidie et al. 2005), die im nicht-phosphoryliertem Zustand ENaC ubiquitiniert und damit dessen Abbau aus der Membran stimuliert (Abriel and Staub 2005). Weiterhin stimuliert die SGK1 die Expression des ENaC durch Hochregulation seiner Transkription und durch Hemmung der iNOS (inducible nitric oxide synthase). Zusätzlich zu den Effekten am ENaC stimuliert die SGK1 auch die Expression des ROMK und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Lang, Bohmer et al. 2006).

### **1.3. Aldosteron**

Aldosteron ist ein in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildetes Steroidhormon, das unter zwei scheinbar gegensätzlichen physiologischen Bedingungen ausgeschüttet wird: Hypovolämie und Hyperkaliämie. Zum einen wird bei Volumenmangel die Na<sup>+</sup>-Absorption gesteigert ohne gleichzeitige Kaliumverluste, zum anderen wird bei K<sup>+</sup>-Überschuss die K<sup>+</sup>-Sekretion ohne gleichzeitige Natriumretention gesteigert. Dieses Phänomen wird als Aldosteron-Paradoxon bezeichnet (Seva Pessoa, van der Lubbe et al. 2013). Eine wichtige Rolle scheint hierbei das Angiotensin II (AT II) zu spielen, welches bei Volumenmangel und der damit einhergehenden Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ausgeschüttet wird, nicht aber bei Hyperkaliämie (Arroyo, Ronzaud et al. 2011).



**Abbildung 5: Regulationsmechanismen bei Hypovolämie und Hyperkaliämie**

Darstellung der unterschiedlichen Regulationsmechanismen bei (a) Hypovolämie und (b) Hyperkaliämie. Aldosteron vermittelt bei einer Hypovolämie und Hyperkaliämie jeweils unterschiedliche Effekte. (a) Bei Hypovolämie agieren Angiotensin II und Aldosteron synergistisch, sie steigern die Aktivität des NCC und des ENaC, gleichzeitig inhibiert Angiotensin II die ROMK-Aktivität. Zusammen mündet dies in eine maximale Natrium-Reabsorption um die Hypovolämie zu korrigieren und Kalium einzusparen. (b) Bei Hyperkaliämie wird die Aldosteronausschüttung direkt stimuliert, unabhängig von Renin und Angiotensin II. Ohne die hohen Angiotensin II-Spiegel wird der ROMK nicht inhibiert, zudem hemmt die Hyperkaliämie die NCC-Aktivität. Aldosteron hingegen aktiviert den ENaC und ROMK maximal. Insgesamt kommt es hierdurch zu einer hohen luminalen Natriumzufuhr für den ENaC, was durch direkte Kopplung die Kaliumsekretion über den ROMK ermöglicht. (Seva Pessoa, van der Lubbe et al. 2013).

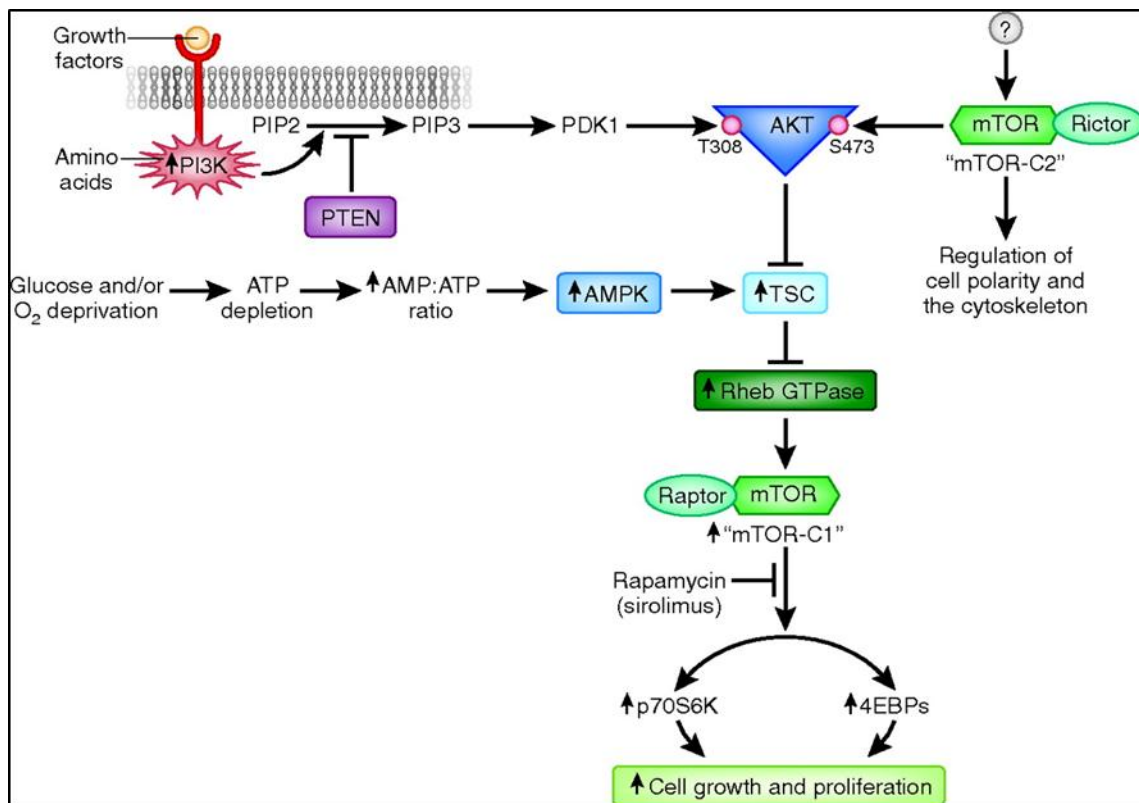
Neben dem erläuterten Einfluss auf den Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Haushalt hat Aldosteron stimulierende Wirkung auf die renale Mg<sup>2+</sup>-Resorption, H<sup>+</sup>-Sekretion und die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ausscheidung (Schmidt and Lang 2007).

#### 1.4. Mammalian target of rapamycin (mTOR)

mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche eine zentrale Rolle bei der Regulation der Zellgröße, -masse, -proliferation und des Zellüberlebens spielt

(Lieberthal and Levine 2009). Rapamycin (auch: Sirolimus) wurde im Jahre 1975 aus einem Bakterium isoliert (Sehgal 2003), was in der Folge zur Identifizierung und Entdeckung von mTOR im Jahre 1994 führte (Fingar, Richardson et al. 2004). Rapamycin ist ein spezifischer mTOR-Inhibitor und hat keinen weiteren bekannten Effekt auf andere Enzymsysteme. Nach Diffusion in die Zelle bindet Rapamycin an FK506-binding protein 12 (FKBP-12), dieser Komplex wiederum bindet und inhibiert anschließend mTOR (Hay and Sonenberg 2004). mTOR findet sich intrazellulär in zwei Komplexen, mTOR complex 1 (mTORC1) und mTOR complex 2 (mTORC2). Diese beiden Komplexe bestehen aus jeweils einem Gerüstprotein, regulatory associated protein of mTOR (Raptor; mTORC1) und rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor; mTORC2), und initiieren zwei separate Signalwege. Der mTORC1 besteht neben Raptor aus weiteren Proteinen: mLST8, PRAS40 und mTOR. Beim mTORC2 sind neben Rictor folgende Proteine beteiligt: mSIN1, mLST8 und mTOR (Huang and Manning 2009).

Nach Aktivierung des mTORC1 durch Wachstumsfaktoren und Aminosäuren stimuliert dieser das Zellwachstum. Eine Aktivierung des mTORC2 führt zu dessen Beteiligung an der Regulation des Zytoskeletts und der Zellpolarität. Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen Komplexen ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu mTORC2 nur mTORC1 durch Rapamycin inhibiert wird (Kim, Sarbassov et al. 2002, Jacinto, Loewith et al. 2004), wobei neuere Daten auch bei mTORC2 bei Langzeitanwendung von Rapamycin auf einen inhibierenden Einfluss hinweisen (Oh and Jacinto 2011).



**Abbildung 6: mTOR als Komponente von mTORC1 und mTORC2**

Darstellung der intrazellulären Signalkaskade im mTOR-Signalweg. Weitere Erläuterungen in folgendem Text (Lieberthal and Levine 2009).

Die obige Abbildung verdeutlicht, dass die beiden unterschiedlichen Gerüstproteine, Raptor im mTORC1 und Rictor im mTORC2, dafür sorgen, dass beide Komplexe stromabwärts verschiedene Effekte haben und damit eigenständige Wirkungen entfalten. Zum einen sind dies die Zellproliferation und das Zellwachstum durch mTORC1 und zum anderen ist es die Regulation der Zellpolarität und des Zytoskeletts durch mTORC2.

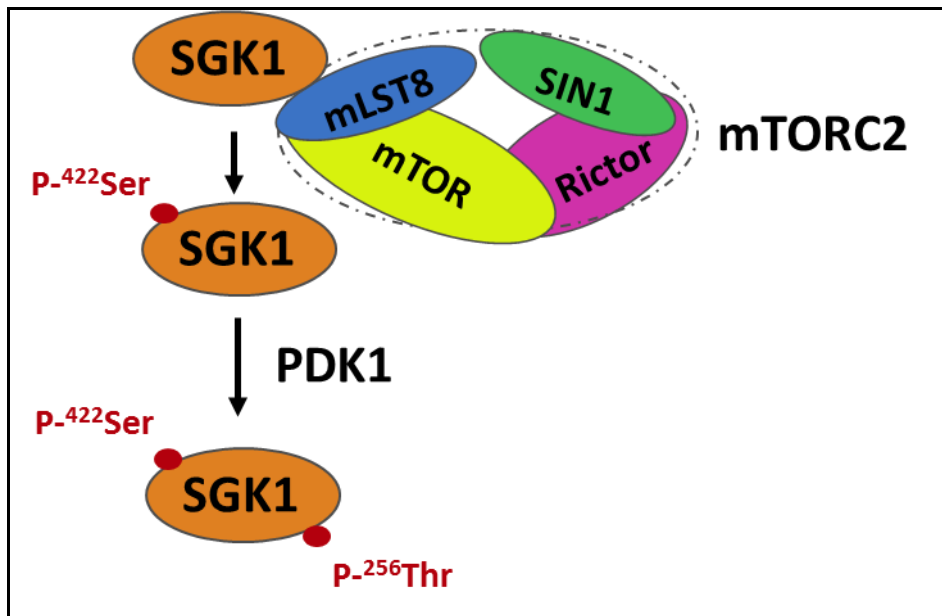
mTORC1 wird durch Wachstumsfaktoren und Aminosäuren aktiviert, welche die Lipidkinase Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphorylieren. Diese sorgt dafür, dass durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) entsteht. PIP3 aktiviert und bindet über Phosphorylierung der 3-Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PDK1) die Serin/Threonin-Kinase Akt (oder Proteinkinase B). Die Aktivität von PI3K kann durch PTEN, eine Phosphatase, welche PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert, gedrosselt werden. Die aktivierte Akt inhibiert den TSC

(tuberous sclerosis complex) und enthemmt damit mTORC1, da TSC seinerseits die Wirkung von mTORC1 durch Inhibierung der zytoplasmatischen GTPase Rheb inhibiert. Die AMP-Kinase (AMPK) wird bei jeglicher Form von ATP-verbrauchendem Zellstress aktiviert, erhöht dadurch das AMP:ATP-Verhältnis und inhibiert damit mTOR. mTORC2 ist auch in der Lage Akt zu phosphorylieren (an <sup>473</sup>Ser), wobei eine Akt-Phosphorylierung durch mTORC2 für die Aktivierung der Akt durch mTORC1 nicht notwendig ist. Der aktivierte mTORC1 führt durch Phosphorylierungsschritte zur Generierung von Proteinen, welche für das Zellwachstum benötigt werden. Eine weitere wichtige Tatsache ist, dass die stromaufwärts gelegenen Regulatoren des mTORC2 bis dato unbekannt sind (Lieberthal and Levine 2009), wobei neuere Erkenntnisse auf Insulin als einem upstream-Modulator hinweisen (Lamming, Ye et al. 2012). Aufgrund der angenommenen metabolischen Funktion und der Regulation durch Insulin sind die metabolisch aktiven Gewebe wie Muskulatur, Leber und Fettgewebe ins Zentrum der mTORC2-Forschung gerückt (Bentzinger, Romanino et al. 2008, Kumar, Harris et al. 2008, Kumar, Lawrence et al. 2010, Hagiwara, Cornu et al. 2012). Weiterhin stellt die etwaige anti-apoptotische Rolle des mTORC2 potenziell einen Ansatz für onkologische Behandlungsmöglichkeiten dar (Li, Lin et al. 2012, Willems, Chapuis et al. 2012, Zeng, Shi et al. 2012).

### **1.4.1. mTORC2 und die distal-tubuläre Hauptzelle**

Die SGK1 spielt wie unter 1.2.1. *Das distale Nephron und die Hauptzelle* bereits erwähnt eine zentrale Rolle beim ENaC-abhängigen Na<sup>+</sup>-Transport in der aldosteronabhängigen Hauptzelle im distalen Tubulus. Eine Phosphorylierung an „hydrophoben Gruppen“ (hydrophobic motif; HM) am C-terminalen Ende der SGK1 (<sup>422</sup>Serin) beeinflusst ihren Aktivitätszustand. Über die dafür zuständige HM-Kinase ist bislang wenig bekannt (Abbildung 4 als ? dargestellt). In in-vitro-Experimenten (Lu, Wang et al. 2010) fanden sich jedoch Hinweise für die essenzielle Bedeutung des mTORC2 (Rictor) für diesen Phosphorylierungsschritt und damit der Signaltransduktion der SGK1 und folglich der Aktivierung des ENaC in der distal-tubulären Hauptzelle (Lu, Wang et al. 2010). In selbiger Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des mTORC1 keinen Ein-

fluss auf diesen Phosphorylierungsschritt hat. Um die Funktion des mTORC2 zu inaktivieren war es ausreichend, das Gen für Rictor zu deletieren. Lu, Wang et al. erschlossen daraus, dass es sich bei der bis dahin unbekanntem HM-Kinase um mTORC2 handelt (Lu, Wang et al. 2010).



**Abbildung 7: mTORC2-abhängige Phosphorylierung der SGK1**

Darstellung der beiden notwendigen Phosphorylierungsschritte, wodurch die SGK1 aktiviert, und die Aldosteronwirkung an der distal-tubulären Hauptzelle erzielt wird. mTORC2 phosphoryliert hierbei Serin (<sup>422</sup>Ser) und fungiert als HM-Kinase, die PDK1 katalysiert den zweiten Phosphorylierungsschritt (an <sup>256</sup>Thr). (Garcia-Martinez and Alessi 2008).

Anhand obiger Abbildung wird die angenommene Rolle des mTORC2 verdeutlicht: Er ist für die Phosphorylierung der SGK1 und damit der vollen Wirkungsentfaltung von Aldosteron essenziell notwendig und scheint folglich bei der Regulierung des Na<sup>+</sup>-Haushalts (ENaC) eine wesentliche Rolle zu spielen. Diese Phosphorylierung findet nach Bindung der SGK1 an die SIN1-Untereinheit des mTORC2 statt (Lu, Wang et al. 2011). Demzufolge spielen die mTOR-Komplexe nicht nur eine Rolle beim Zellwachstum und der Zellproliferation, sondern auch bei zellulären Regulationsmechanismen wie dem distal-tubulären Na<sup>+</sup>-Haushalt (Lu, Wang et al. 2010).

### 1.5. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die in-vitro-experimentellen Daten (Lu, Wang et al. 2010) liefern Hinweise auf eine Beteiligung des mTORC2 an der renalen Elektrolytregulation, jedoch bedürfen diese Erkenntnisse weiterer Aufklärung in vivo. Um diesem Ziel näher zu kommen, arbeiteten wir mit Mäusen, die eine tubulusspezifische Deletion des mTORC2 durch genetische Ablation von Rictor aufweisen (Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäuse).

Die durchgeführten Experimente sollten den in der Literatur postulierten Hinweisen nachgehen und klären, ob

- mTORC2 auch eine in-vivo-relevante regulatorische Bedeutung bei der Natrium- und Kaliumregulation im distalen Tubulus einnimmt.
- mTORC2 die für die Phosphorylierung der SGK1 zuständige Kinase darstellt und dadurch die SGK1-Signaltransduktion und den ENaC reguliert.
- mTORC2 eine relevante regulatorische Bedeutung für den ROMK innehat.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Die Tierhaltung**

Die in den Experimenten verwendeten Mäuse entstammten allesamt der C57BL/6-Inzuchtmauslinie. Die Haltung entsprach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurde von örtlichen Behörden genehmigt. Die Tiere wurden im Biomed-Zentrum unseres Kooperationspartners aus der Universität Freiburg (Dr. Florian Grahammer) artgerecht und keimarm (spezifiziert pathogenfrei= SPF) gehalten, hatten stets freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser sowie einen zwölfstündigen Tag-/Nachtrhythmus. Die Identifikation der Mäuse erfolgte anhand einer nummerierten Ohrlochmarkierung.

### **2.2. Das Mausmodell**

#### **2.2.1. Das Cre/loxP-System**

Um die Funktion des mTOR2-Komplexes im distalen Tubulus der Maus erforschen zu können, war die Generierung von konditionalen mTOR2-defizienten Mäusen notwendig, bei der das Cre/loxP-System tubulussystemspezifisch zum Einsatz kam. Bei dem Enzym Cre handelt es sich um die DNA-Rekombinase des Bakteriophagen P1, welche in der Lage ist, bestimmte DNA-Abschnitte als kovalent geschlossene Ringe zu exzidieren. Dabei müssen die auszuschneidenden Bereiche jeweils von einem 34 bp langen, als loxP-Sequenz bezeichneten Abschnitt flankiert sein, die von Cre spezifisch erkannt werden. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass bei dem oben genannten Prozess außer den loxP-Sequenzen keine zusätzlichen Erkennungssequenzen auf der DNA sowie Energieträger wie beispielsweise ATP benötigt werden.

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



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

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

### **2.2.2. Die KspCre-Maus**

Die Arbeitsgruppe von Prof. Peter Igarashi (University of Texas Southwestern, Dallas, TX, USA) entwickelte diese Mauslinie (B6.Cg-Tg (Cdh16-cre) 91lgr/J), um ein tubulusspezifisches konditionales Expressionsmuster der Cre-Rekombinase zu erhalten (Shao, Somlo et al. 2002). Dabei bediente sie sich des Ksp-Cadherin Promoters. Ksp-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül und gehört zur Familie der Cadherine. Es wird in den Epithelzellen des sich entwickelnden Tubulussystems der Niere und des Genitouretraltraktes exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein 1341 bp langes Fragment, das die 5' flankierende Region des Ksp-Cadherin Gens und dessen Promoter enthält, ausreichend ist, um das Expressionsmuster zu erzielen, das das Wildtyp-Gen aufweist. Dieser Befund führte dazu, dass die Autoren der Arbeit ein Ksp1.3/Cre-Konstrukt klonierten, das 1329 bp der 5' Region des Maus Ksp-Cadherin-Gens inklusive des Promoters sowie die für die Cre kodierenden Regionen des Cre-Gens enthält. Dieses Konstrukt wurde anschließend erfolgreich in die C57BL/6 Mäuse eingebracht, und fortan stand die Expression der Cre-Rekombinase bei diesen Tieren unter der Kontrolle des Ksp-Cadherin Promoters. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster der Cre in diesen Mäusen kaum von dem des genetisch unveränderten Ksp-Gens unterscheidet: ausgeprägt in der TAL und im Sammelrohr und nur zu einem sehr geringen Prozentsatz im proximalen Tubulus. Zudem reichte die Expression bis in den Ductus deferens (Shao, Somlo et al. 2002).

### **2.2.3. Die Rictor<sup>fl/fl</sup>- und Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Maus**

Da in dieser Arbeit die Rolle des mTOR2-Komplexes für die Salzhomöostase im distalen Tubulussystem beleuchtet werden sollte, wurden für die Experimente mTORC2-defiziente-Mäuse benötigt. Um den mTOR2-Komplex auszuschalten, wurden von den Arbeitsgruppen um Prof. Michael N. Hall und Prof. Markus Rüegg (beide Universität Basel, Schweiz) vor das Exon 4 und hinter das Exon 5 des Rictor-Gens loxP-Sequenzen inseriert (Rictor<sup>fl/fl</sup>), da Rictor eine essenzielle Funktion für die strukturelle Integrität des mTOR2-Komplexes ausübt (Wullschleger, Loewith et al. 2006). Durch Verkreuzung einer so veränderten Maus mit der transgenen KspCre-Maus entstand die Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Maus, in welcher Rictor tubuluspezifisch deletiert wurde und in einer Deletion des mTOR2-Komplexes mündete.

### **2.3. Untersuchungen im metabolischen Käfig**

Die Mäuse wurden während der Versuchsserien in sogenannten metabolischen Käfigen (Techniplast, Hohenpreisenberg, Deutschland) gehalten. Die Einzelteile dieser Stoffwechsellkäfige bestehen aus rostfreiem Edelstahl, Polycarbonat und Polymethylpenten. Zwölf solche metabolische Käfige standen zur Durchführung unserer Versuchsserien zur Verfügung. Die Besonderheit einer Haltung in solchen Käfigen ist die Möglichkeit, den von den Mäusen abgesonderten Urin und Kot in separaten Sammelbehältern auffangen zu können. Um Urinverluste bei der täglichen Sammlung zu verhindern, wurden die Auffangtrichter der metabolischen Käfige täglich mit Silikonspray eingesprüht. Auch wurden die Urinsammelbehälter täglich mit einem Paraffinölfilm belegt, um Urinverluste durch Verdunstung zu verhindern. Die Mäuse hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser.



**Abbildung 8: Metabolischer Käfig**

mit 1) Nahrungsbehälter, 2) Trinkflasche, 3) Urinsammelbehälter und 4) Kotsammelbehälter

### **2.3.1. Der Ablauf einer Versuchsserie**

Um die Nierenfunktion der Mäuse zu erfassen, wurden diese in metabolischen Käfigen gehalten. Für jede Versuchsserie wurden möglichst gleichviele Wildtyp- und Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere erhielten zu Beginn einer jeden Versuchsserie für die Dauer von zwei Tagen eine Kontrolldiät (C1000, Altromin, Lage, Deutschland) und Leitungswasser (gemessene Na<sup>+</sup>-Konzentration: 0,8 mM). Anschließend wurden die Mäuse für die Dauer von fünf Tagen einer diätetischen oder diuretischen Behandlung unterzogen. Genaueres zu den verabreichten Diäten und Diuretika steht unter 2.4. *Eingesetzte Stressmodelle*. Während jeder Versuchsserie wurde täglich das Gewicht, die Trink- und Fressmenge und die Urinmenge erhoben, Genaueres zu diesen Bestimmungen steht unter 2.5. *Erfasste Parameter bei den Experimenten im metabolischen Käfig*. Auch wurden täglich Urinsammlungen durchgeführt, hierbei wurden die Urinsammelbehälter mithilfe einer Mikroliterpipette geleert und der gewonnene Urin in abschließbare Glasröhrchen überführt. Der Urin wurde anschließend für eine Dauer von zehn Minuten bei 4°C und 3500 rpm (rounds per minute, ca. 2000 g) abzentrifugiert und danach in einem

Eppendorfreaktionsgefäß bei -20°C eingefroren. Aus den gewonnenen Urinproben wurden verschiedene Parameter erhoben, Genaueres hierzu steht unter *2.6.1. Parameterbestimmung aus den Urinproben*. Zudem wurde den Mäusen zum Ende jeder Versuchsserie venöses Blut entnommen, Genaueres hierzu steht unter *2.3.2. Narkose und venöse Blutentnahme*. Aus den gewonnenen Blutproben wurden ebenfalls diverse Parameter erhoben, Genaueres hierzu steht unter *2.6.2. Parameterbestimmung aus den Blutproben*.

### **2.3.2. Narkose und venöse Blutentnahme**

Zum Ende einer Versuchsserie wurde den Mäusen venöses Blut entnommen, was unter Narkose mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (Forane, Abbott GmbH & Co. KG, Deutschland) erfolgte. Als Anästhesieapparat diente ein Narkosekreissystem (Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) mit einem Ventilator für Isofluran und einem Präzisionsverdampfer (Vapor 2000, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland). Zur Durchführung der Narkose wurde die Maus in ein Becherglas gesetzt und über ein Schlauchsystem für etwa eine Minute mit einem Gemisch aus Sauerstoff (Flussrate: 2l/min) und Isofluran (5% Vol.) begast. Nach Eintritt der Narkose wurde der retrobulbäre Venenplexus am rechten Auge mit einer 10 µl-Einmalkapillarpipette (Minicaps, Hirschmann GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland) punktiert. Das fließende Blut wurde mit einer heparinbeschichteten Kapillare (Haematokrit Kapillaren, Hirschmann GmbH&Co KG, Eberstadt, Deutschland) aufgefangen. Anschließend wurde das Blut für zehn Minuten (3500 rpm, ca. 2500 g, bei 4°C) zentrifugiert, um die zellulären Blutbestandteile (Hämatokrit) vom klarem Serum zu trennen. Nach Zentrifugation wurde der Hamätokrit (siehe *2.6.2.1. Hämatokrit*) bestimmt. Das klare Serum wurde nun in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

### **2.4. Eingesetzte Stressmodelle**

Um die Nierenfunktion und Kompensationsfähigkeit der Mäuse bei deletiertem mTOR2-Komplex erforschen zu können, wurden diese verschiedenen Stress-

bedingungen in Form unterschiedlicher Diäten und Diuretika ausgesetzt. Die Diäten unterschieden sich in ihren Natrium- und Kaliumgehalten. Die eingesetzten Diuretika waren Furosemid, Thiazid und Triamteren.

### **2.4.1. Diäten**

In den Versuchsserien kamen fünf unterschiedliche Diäten zum Einsatz.

#### 2.4.1.1. Kontrolldiät

Die zu Beginn einer jeden Versuchsserie verabreichte Kontrolldiät (C1000, Altromin, Lage, Deutschland) hat einen gemessenen  $\text{Na}^+$ -Gehalt von 117  $\mu\text{mol/g}$  und einen  $\text{K}^+$ -Gehalt von 182  $\mu\text{mol/g}$ . Durch Gabe dieser Diät war die Erfassung der Nierenfunktion unter „normaler“ Elektrolytzufuhr möglich.

#### 2.4.1.2. Niedrigsalz/Normalkalium-Diät

Eine diätetische Intervention bestand in der Gabe einer Niedrigsalz/ Normalkalium-Diät (= LS/NK-Diät; C1036, Altromin, Lage, Deutschland). Der  $\text{Na}^+$ -Gehalt dieser Diät beträgt 7  $\mu\text{mol/g}$ , der  $\text{K}^+$ -Gehalt war unverändert bei 182  $\mu\text{mol/g}$ . Zusätzlich erhielten die Versuchstiere  $\text{ddH}_2\text{O}$  (destilliertes Wasser) als Trinkwasser. Durch Gabe dieser Diät wurde die Nierenfunktion unter extrem salzarmen Bedingungen erfasst.

#### 2.4.1.3. Niedrigsalz/Hochkalium-Diät

Eine weitere diätetische Intervention bestand in der Gabe einer Niedrigsalz/ Hochkalium-Diät (= LS/HK-Diät; C1058, Altromin, Lage, Deutschland). Der  $\text{Na}^+$ -Gehalt dieser Diät beträgt 7  $\mu\text{mol/g}$ , der  $\text{K}^+$ -Gehalt 1281  $\mu\text{mol/g}$  (6-fach erhöht). Durch Gabe dieser Diät wurde die Nierenfunktion unter kaliumreichen und salzarmer Bedingungen erfasst.

#### 2.4.1.4. Normalsalz/Hochkalium-Diät

Eine weitere diätetische Intervention bestand in der Gabe einer Normalsalz/ Hochkalium-Diät (= NS/HK-Diät; C1000 modifiziert, Altromin, Lage, Deutschland). Der  $\text{Na}^+$ -Gehalt dieser Diät beträgt 108  $\mu\text{mol/g}$ , der  $\text{K}^+$ -Gehalt 1281

$\mu\text{mol/g}$ . Durch Gabe dieser Diät wurde die Nierenfunktion unter kaliumreichen Bedingungen erfasst.

#### 2.4.1.5. Hochsalz/Hochkalium-Diät

Eine weitere diätetische Intervention bestand in der Gabe einer Hochsalz/Hochkalium-Diät (= HS/HK-Diät, C1058 + Trinkwasser mit 0,45%-igem NaCl-Gehalt, Altromin, Lage, Deutschland). Durch Gabe dieser Diät wurde die Nierenfunktion unter kalium- und salzreichen Bedingungen erfasst.

### 2.4.2. Diuretika

In den Versuchsserien erfolgte die Gabe von drei verschiedenen Diuretika (Furosemid, Thiazid, Triamteren) im Trinkwasser.

#### 2.4.2.1. Furosemid

Die hergestellte Furosemidlösung hatte einen Furosemidgehalt von 125 mg/l, dies wurde durch Verdünnung von einer Lasixampulle (250 mg) in zwei Liter Leitungswasser erreicht. Durch die Gabe von Furosemid wurde die Nierenfunktion bei Blockade des NKCC2 in der Henle-Schleife erfasst.

#### 2.4.2.2. Thiazid

Die hergestellte Thiazidlösung hatte einen Thiazidgehalt von 400 mg/l, dies wurde durch Zusatz des Diuretikums (Sigma, Taufkirchen) zu Leitungswasser erreicht. Durch die Gabe von Thiazid wurde die Nierenfunktion bei Blockade des NCC im frühdistalen Tubulus erfasst.

#### 2.4.2.3. Triamteren

Die hergestellte Triamterenlösung hatte einen Triamterengehalt von 200 mg/l, dies wurde durch Zusatz des Diuretikums (Sigma, Taufkirchen) zu Leitungswasser erreicht. Zur Herstellung musste ein pH-Wert von etwa 3 generiert werden, um die Löslichkeit des Triamteren im Trinkwasser als Hydrochlorid zu ermöglichen. Dies geschah durch Zugabe einer 1 M HCl-Lösung bei permanenter pH-Wertbestimmung mittels pH-Meter. Durch die Gabe von Triamteren wurde die Nierenfunktion bei Blockade des ENaC im spätdestalen Tubulus erfasst.

## **2.5. Erfasste Parameter bei den Experimenten im metabolischen Käfig**

Während der Haltung in den metabolischen Käfigen wurden täglich das Gewicht, die Trink- und Fressmenge sowie die Urinmenge bestimmt. Weiterhin wurden aus täglich gewonnenen Urinproben und aus der Blutprobe am Ende einer jeden Serie verschiedene Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion bestimmt.

### **2.5.1. Bestimmung des Gewichts**

Um die Maus zu immobilisieren und damit eine genaue Gewichtsbestimmung zu gewährleisten, wurde diese in eine nach vornehin verschlossene durchsichtige Röhre gesetzt. Nach vorheriger Messung des Leergewichtes der Röhre erfolgte eine erneute Gewichtsmessung nach Einsetzen der Maus. Um den Gewichtsverlauf während einer Versuchsserie zu beurteilen, wurde die Gewichtsmessung täglich zur selben Uhrzeit durchgeführt.

### **2.5.2. Bestimmung der Trink- und Fressmenge**

Nach Auffüllen der Trinkflasche und dem Einspannen von zwei Futterpellets der jeweiligen Diät in den Futterbehälter wurden beide gewogen. Nach 24 h wurden diese erneut gewogen und aus der Differenz ergaben sich die Trink- und Fressmenge. Wasserreste im Überlaufbehälter wurden genauso wie Futterreste im Käfig oder Kotsammelbehälter berücksichtigt.

### **2.5.3. Bestimmung der Urinmenge**

Zur Bestimmung der täglichen Urinmenge wurde der in 24 h ausgeschiedene Urin aus dem Urinsammelbehälter in ein abschließbares Glasröhrchen überführt. Dies geschah mithilfe einer Mikroliterpipette. Nach vorheriger Messung des Leergewichts des Glasröhrchens und erneuter Messung nach Überführung des Urins wurde aus der errechneten Differenz die 24 h-Urinmenge bestimmt. Auch Urinmengen, die sich im metabolischen Käfig aber nicht im Urinsammelbehälter befanden, wurden bei der Messung berücksichtigt.

## 2.6. Erfasste Laborparameter

### 2.6.1. Parameterbestimmungen aus den Urinproben

#### 2.6.1.1. Natrium- und Kaliumkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  im Urin erfolgte mithilfe eines Flammenphotometers (EFUX 5057, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).



Abbildung 9: Flammenphotometer, EFUX 5057

Damit die bestimmte Elektrolytkonzentration im adäquat messbaren Bereich des Flammenphotometers lag, war es unter Umständen notwendig, die gewonnenen Urinproben zu verdünnen. Je nach Harnkonzentrierung durch die Mäuse, die von der jeweiligen Intervention abhing, war eine zehnfache bis 30fache Verdünnung der Probe notwendig.

Vor der Inbetriebnahme des Flammenphotometers war es notwendig, zu überprüfen, ob der Behälter mit der „Standby-Lösung“ ausreichend gefüllt und das darin befindliche Saug- und Schlauchsystem durchgängig war. Anschließend konnte das Flammenphotometer eingeschaltet und nach Ertönen eines Zündungsklicks die Acetylgasflasche aufgedreht werden. Bevor nun die Urinpro-



ben gemessen wurden, wurde zur Funktionsüberprüfung und Kalibrierung des Flammenphotometers ein Standardurin gemessen. Wenn nun die gemessenen Natrium- und Kaliumwerte dem tatsächlichen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gehalt des Standardurins entsprachen (Natrium: 143,5 mM, Kalium: 100 mM) und das Gerät damit kalibriert war, konnte mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Die Urinproben wurden nun der Reihe nach bearbeitet und die ermittelten Werte ausgedruckt. Nach rechnerischer Berücksichtigung der 24 h-Urinmenge und des Verdünnungsfaktors konnte die tatsächliche  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentration berechnet werden.

### 2.6.1.2. Kreatininkonzentration

Die Kreatininkonzentration im Urin wurde anhand der Jaffé-Methode ermittelt. Diese Methode beruht darauf, dass Kreatinin in alkalischem Milieu von Pikrinsäure gebunden wird und einen dunkelgelben Komplex bildet. Mit einem Spektralphotometer (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) können nun nach Kalibrierung die Extinktionswerte der Probe ermittelt und anhand derer die Kreatininkonzentration bestimmt werden. Zur Erstellung dieser Probe war es zunächst notwendig, eine Arbeitslösung bestehend aus 2 Reagenzien zu erstellen. Reagenz 1 bestand aus 300 mM NaOH und 25 mM Di-Na-Phosphat, Reagenz 2 aus 8,7 mM Pikrinsäure. Diese beiden Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 in ein abschließbares Gefäß gegeben und gevortext. Um die Konzentration der Nichtkreatininchromogene im Urin zu verringern und damit eine falschhohe Messung zu verhindern, war es notwendig die gewonnene Urinprobe zehnfach zu verdünnen. Hierzu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Urinprobe und 90  $\mu\text{l}$  Ampuwa in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und gevortext. Anschließend wurden 15  $\mu\text{l}$  der zehnfach verdünnten Urinprobe mithilfe einer Mikroliterpipette in eine Küvette (UV-Küvette mikro 8,5 mm, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert. Genauso wurden 15  $\mu\text{l}$  einer Standardkreatininprobe (Kreatininkonzentration: 2 mg/dl) und einer Blankprobe (15  $\mu\text{l}$  Ampuwa) in solche Küvetten pipettiert. Nun wurden 300  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung in die befüllte Küvette hineinpipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Küvette in das Spektralphotometer (eingestellte Wellenlänge: 492 nm) ge-

stellt und der erste Extinktionswert bestimmt. Zuvor wurde das Spektralphotometer gegen Luft genullt. Nach exakt acht Minuten wurde ein zweiter Extinktionswert derselben Probe bestimmt. Dieser Prozess wurde nun bei allen verdünnten Urinproben, der Standardkreatininprobe und der Blankprobe angewandt. Nach Abzug des ersten Extinktionswerts vom zweiten Extinktionswert erhielt man den Differenzwert (= Delta). Nach Ermittlung jener Differenzwerte für sämtliche Proben konnte anhand folgender Formel die tatsächliche Urinkreatininkonzentration bestimmt werden:

$$C_{Krea}[mg/dl] = \frac{(\Delta_{Urinprobe} - \Delta_{Blankprobe})}{(\Delta_{Std.-Krea-Probe} - \Delta_{Blankprobe})} * Standardkonz. * VF$$

Zur weiteren Wertoptimierung wurde die 24 h-Urinmenge rechnerisch berücksichtigt.

## 2.6.2. Parameterbestimmungen aus den Blutproben

### 2.6.2.1. Hämatokrit

Um den Hämatokrit aus der gewonnenen Blutprobe bestimmen zu können, wurde das in der Kapillare befindliche Blut bei 3500 rpm (ca. 2500 g) für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte anhand folgender Formel der Hämatokrit bestimmt werden:

$$Hk = \left( \frac{Säule_{zelluläre\ Bestandteile} [mm]}{Säule_{gesamt} [mm]} \right) * 100$$

### 2.6.2.2. Natrium- und Kaliumkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> im Serum erfolgte mithilfe eines Flammenphotometers. Die Handhabung dessen ist unter 2.6.1.1. *Natrium- und Kaliumkonzentration* beschrieben. Zur Kalibrierung wurde eine Standardserumprobe verwendet. Die weitere Messung erfolgte entsprechend der

Elektrolytmessung aus den Urinproben (siehe 2.6.1.1. *Natrium- und Kaliumkonzentration*).

### 2.6.2.3. Harnstoff

Die Serumharnstoffmessung erfolgte mithilfe der Anwendung eines enzymatischen Verfahrens (LT-UR0010, Lehmann, Berlin, Deutschland). Das Prinzip dieses enzymatischen Verfahrens beruht auf der Spaltung des Harnstoffs zu Ammoniak und Bikarbonat durch das Enzym Urease. Das hierbei entstehende Ammoniak reagiert mit NADH und Ketoglutarat (katalysiert durch das Enzym GLDH) zu NAD<sup>+</sup> und Glutamat. Geht man davon aus, dass der Verbrauch von NADH der Harnstoffkonzentration in der Serumprobe entspricht, kann ein proportionaler Absorptionsabfall im Spektralphotometer (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) beobachtet und damit die Harnstoffkonzentration bestimmt werden. Zur Erstellung einer Arbeitslösung werden zum einen Enzyme (lyophilisierte Urease und GLDH) und zum anderen eine Pufferlösung (pH 7.8, 100 mM TRIS-Puffer, 6 mM Ketoglutarat, 0.2 mM NADH, 2 mM ADP, 4 mM EDTA, weitere Stabilisatoren) benötigt. Weiterhin müssen 3 µl der unverdünnten Serumprobe in Küvetten (UV-Küvette mikro 8,5 mm, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert werden. Genauso wurden 3 µl einer Standardharnstoffprobe und einer Blankprobe (3 µl Ampuwa) in solche Küvetten pipettiert. Nun wurden 300 µl der erstellten Arbeitslösung in die mit Serum befüllten Küvette hineinpipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Küvette in das Spektralphotometer (eingestellte Wellenlänge: 340 nm) gestellt und der erste Extinktionswert bestimmt. Zuvor wurde das Spektralphotometer gegen Luft genullt. Nach exakt acht Minuten Reaktionszeit bei Raumluft wurde ein zweiter Extinktionswert derselben Probe bestimmt. Dieser Prozess wurde nun bei allen Serumproben, der Standardharnstoffprobe und der Blankprobe angewandt. Nach Abzug des zweiten Extinktionswerts vom ersten Extinktionswert erhielt man den Differenzwert (= Delta). Anhand folgender Formel konnte die tatsächliche Serumharnstoffkonzentration bestimmt werden:

$$C_{\text{Harnstoff}} [\text{mg/dl}] = \frac{(\Delta_{\text{Serumprobe}} - \Delta_{\text{Blankprobe}})}{(\Delta_{\text{Std.-Harnstoffprobe}} - \Delta_{\text{Blankprobe}})} * \text{Standardkonz.}$$

#### 2.6.2.4. Aldosteron

Die Serumaldosteronkonzentration wurde mithilfe eines Aldosteron-RIA (Demeditec, Kiel, Deutschland) bestimmt. Das Prinzip dieser Bestimmungsmethode beruht auf einem „Konkurrenzradioimmunoassay“. Es wurden 10 µl der Serumproben und Kalibrationslösungen jeweils in ein mit spezifischen Antikörpern beschichtetes Polypropylenröhrchen pipettiert. Die Standardkurve wurde unter Verwendung einer Aldosteronstammlösung bis 100 000 pg/ml erweitert. Die Röhrchen wurden nun mit <sup>125</sup>Jodmarkiertem Aldosteron für 3 Stunden inkubiert, welches mit dem Aldosteron aus der entsprechenden Probe um die Bindung an oben genannte spezifische Antikörper konkurriert. Nach der Inkubationszeit von drei Stunden wurde das freie nicht an Antikörper gebundene Aldosteron dekantiert und in einem RIA-Counter (PerkinEllmer) gemessen. Die Aldosteronkonzentration konnte nun an einer Standardkurve abgelesen werden.

## 2.7. Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen arteriellen Blutdrucks erfolgte nichtinvasiv gemäß der Tail-Cuff-Methode (IITC, Modell 179, Woodland Hills, Kalifornien, USA). Hierbei wurde das Prinzip einer Schwanzsphygmanometrie angewandt, wobei das jeweilige Versuchstier in einen speziellen Kunststoffunnel gesetzt und für 15 Minuten in eine Wärmekammer platziert wurde (Temperatur: 28-

30°C), um eine für das Gerät detektierbare Schwanzperfusion zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Manschette über den Schwanz bis zu dessen Ansatz gestülpt, die eine Lichtquelle sowie einen Detektor enthielt. Mithilfe einer Datenerfassungssoftware (PowerLab 400 und Chart 4, AdInstruments, Colorado Springs, Colorado, USA) wurden Pulsoszillationen erfasst. Nach Aufpumpen der Manschette auf suprasystolische Werte ließen sich bei abfallendem Manschettendruck Pulsoszillationen registrieren, dessen Anfangspunkt den systolischen Blutdruck entsprach. Alle Messungen wurden von einer Person (Azaz Ahmed) in stets selbem Zeitfenster (14.00- 16.00 Uhr) durchgeführt.

### **2.8. Statistische Datenanalyse**

Die in den Diagrammen dargestellten Daten sind als arithmetische Mittelwerte mit den zugehörigen Fehlerbalken als Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Vergleiche der Werte erfolgten anhand der GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) mit dem unverbundenen Zweistichproben Student's t-Test oder einer Varianzanalyse (ANOVA) und einem post-Test nach Dunnett. Dabei wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Homöostase von Wildtyp- und Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tiere unter diätetischen Interventionen

Im Folgenden werden jene Daten dargestellt, welche bei fünftägiger Gabe verschiedener Diäten erhoben wurden. Das Ziel dieser Behandlungen war es, die distal-tubulären Kompensationsfähigkeiten unter verschiedenen Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Angeboten zu vergleichen und so die Rolle des mTOR2-Komplexes bezüglich der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Homöostase zu beleuchten.

Dabei kamen folgende Diäten zum Einsatz:

Kontrolldiät

Niedrigsalz/Normalkalium-Diät (LS/NK)

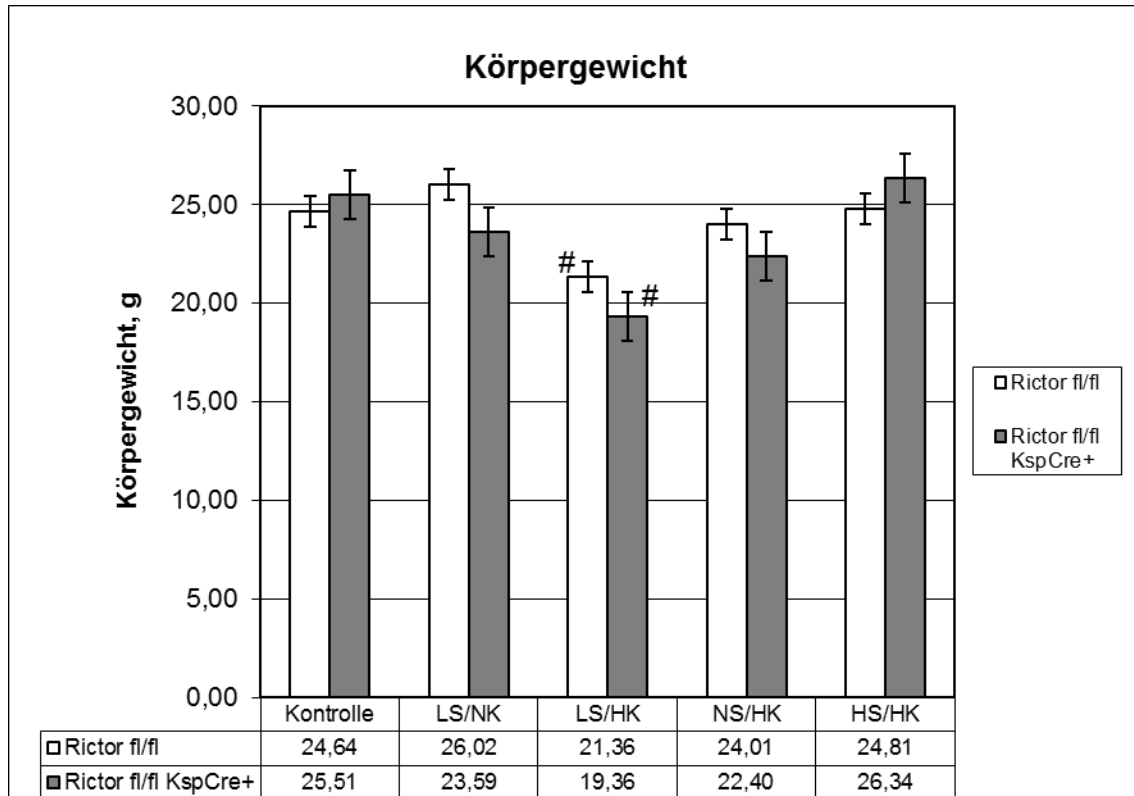
Niedrigsalz/Hochkalium-Diät (LS/HK)

Normalsalz/Hochkalium-Diät (NS/HK)

Hochsalz/Hochkalium-Diät (HS/HK)

### 3.1.1. Körpergewicht und Körpergewichtsänderung

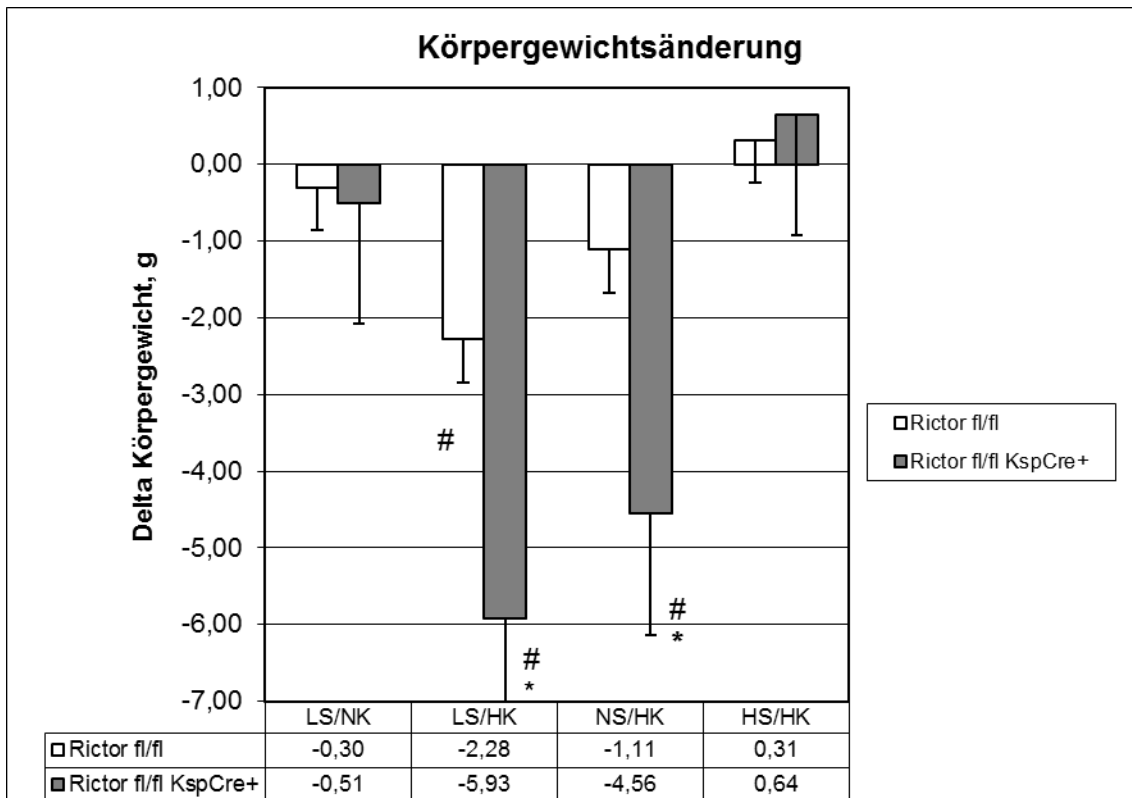
Das Körpergewicht und dessen Verlauf wurde als Indikator für den Volumenstatus der Mäuse herangezogen.



**Abbildung 10: Körpergewicht unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung des Körpergewichts am 5. Behandlungstag nach Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in g mit SEM. *n* bei Kontrolle: 30 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 12 bei beiden Genotypen; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät.

Das Körpergewicht beider Genotypen unter LS/NK-, NS/HK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant vom Körpergewicht unter Kontrolldiät. Unter LS/HK-Diät war jedoch bei beiden Genotypen ein signifikant (#) erniedrigtes Gewicht zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war unter keiner Diät ein signifikanter Unterschied festzustellen.



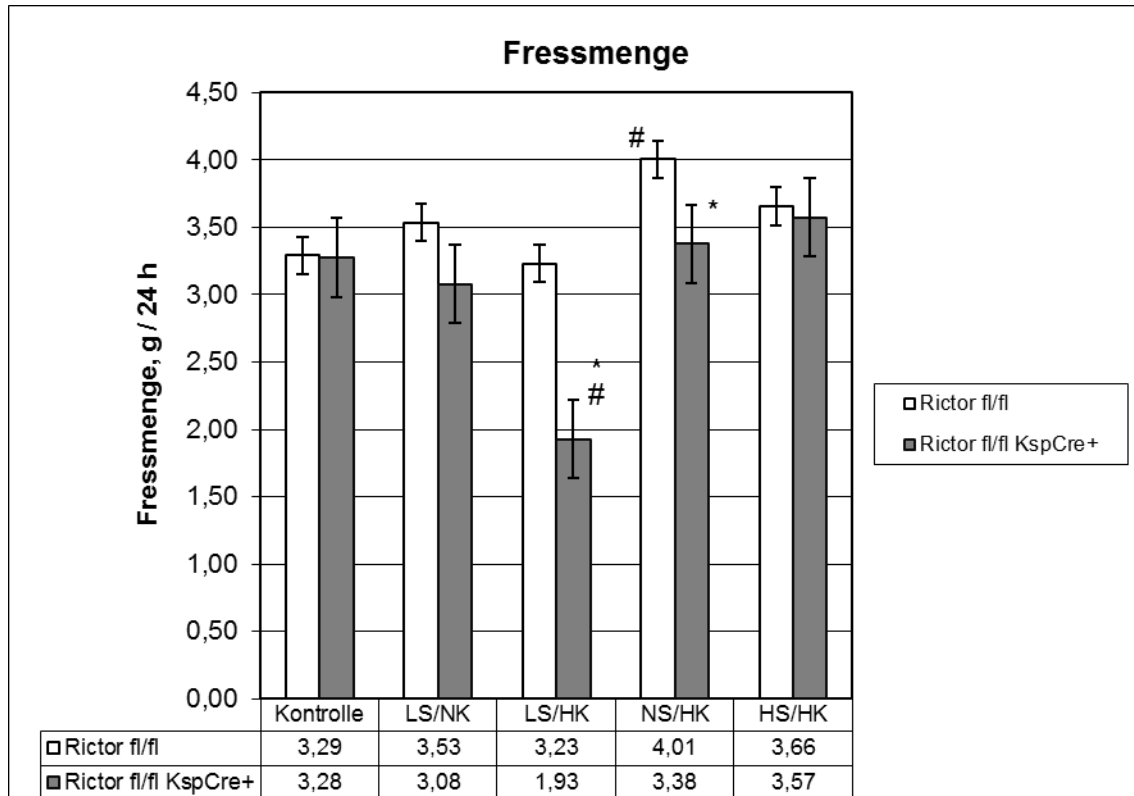
**Abbildung 11: Körpergewichtsänderung unter diätetischen Interventionen**  
 Diagramm zur Darstellung des Körpergewichtsänderung in Bezug auf das Ausgangsgewicht nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in g mit SEM. *n* bei LS/NK: 6 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/HK: 12 bei beiden Genotypen; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* verschieden von null, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Körpergewichtsänderung beider Genotypen unter LS/NK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant vom Null. Unter LS/HK-Diät war bei beiden Genotypen ein signifikanter (#) Gewichtsverlust zu beobachten. Unter NS/HK-Diät war jedoch nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren ein signifikanter (#) Gewichtsverlust festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war unter LS/HK- und NS/HK-Diät bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren ein signifikant (\*) höherer Gewichtsverlust zu erkennen.



### 3.1.2. Fressmenge

Die Fressmenge der Versuchstiere wurde unter anderem als Indikator für das Wohlbefinden der Mäuse herangezogen.



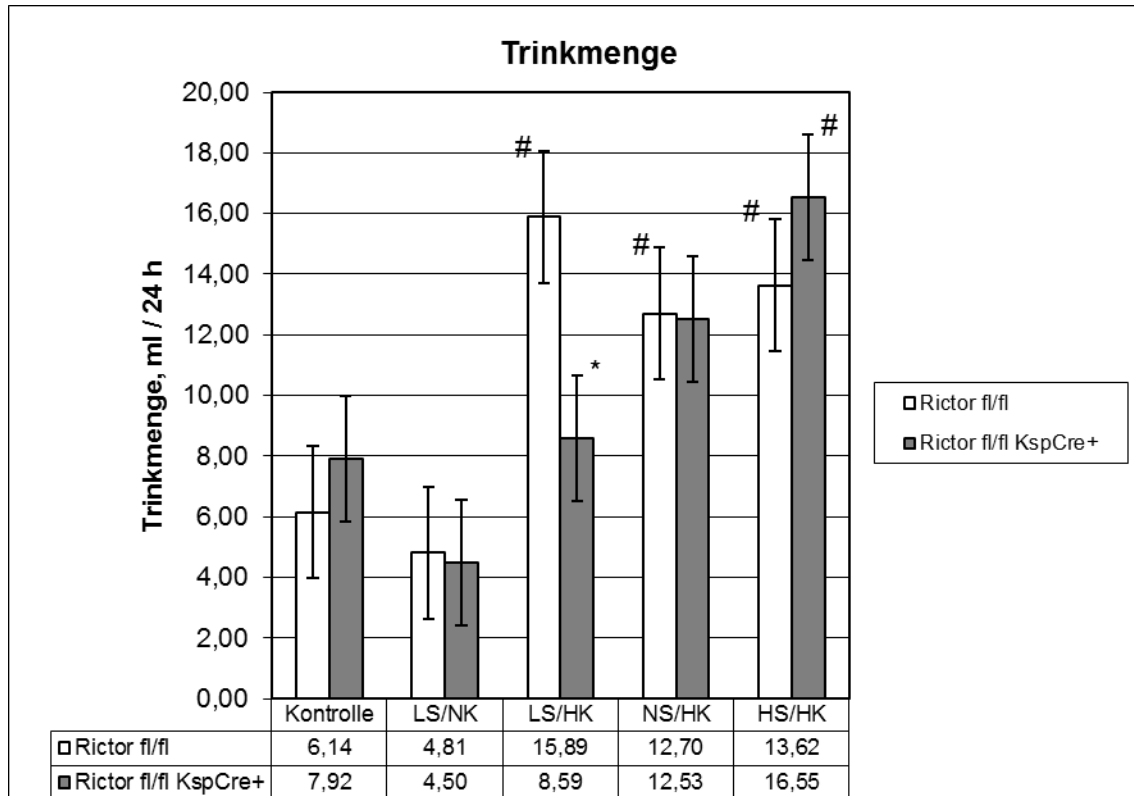
**Abbildung 12: Fressmenge unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Fressmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *g/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 30 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 12 bei beiden Genotypen; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Fressmenge beider Genotypen unter LS/NK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant von der Fressmenge unter Kontrolldiät. Unter LS/HK-Diät war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Fressmenge zu beobachten. Jedoch war unter NS/HK-Diät nur bei den Wildtyp-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Fressmenge festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war einzig unter LS/HK- und NS/HK-Diät bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine signifikant (\*) erniedrigte Fressmenge zu detektieren.

### 3.1.3. Trinkmenge

Die Trinkmenge der Versuchstiere wurde unter anderem als Indikator für das Wohlbefinden der Mäuse herangezogen.



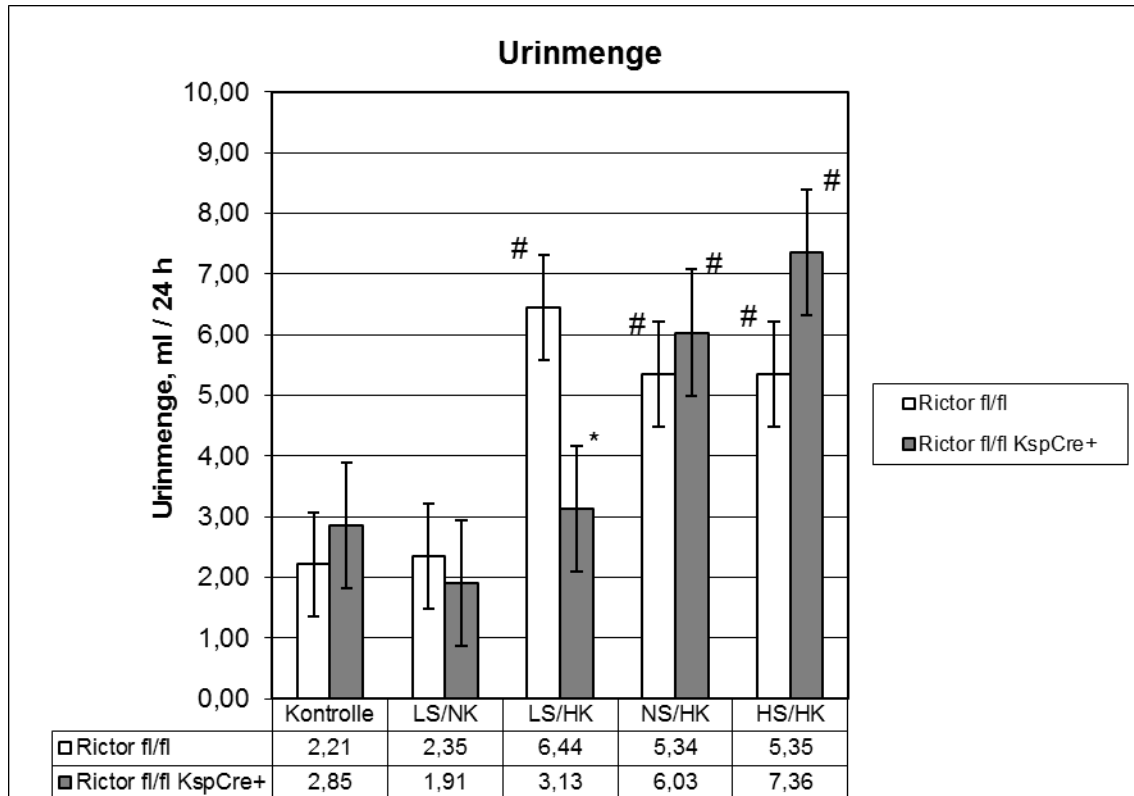
**Abbildung 13: Trinkmenge unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Trinkmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *ml/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 29 bei den Wildtyp-Tieren und 30 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 12 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Trinkmenge beider Genotypen unter LS/NK-Diät unterschied sich nicht signifikant von der Trinkmenge unter Kontrolldiät. Unter LS/HK- und NS/HK-Diät war nur die Trinkmenge der Wildtyp-Tiere verglichen mit der Kontrolldiät signifikant (#) erhöht. Unter HS/HK-Diät konnte bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Trinkmenge beobachtet werden. Im Vergleich beider Genotypen miteinander konnte einzig unter LS/HK-Diät bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine signifikant (\*) verringerte Trinkmenge detektiert werden.

### 3.1.4. Urinmenge

Durch die Erhebung der täglichen Urinmenge war es möglich, die Diurese der Versuchstiere vergleichen.



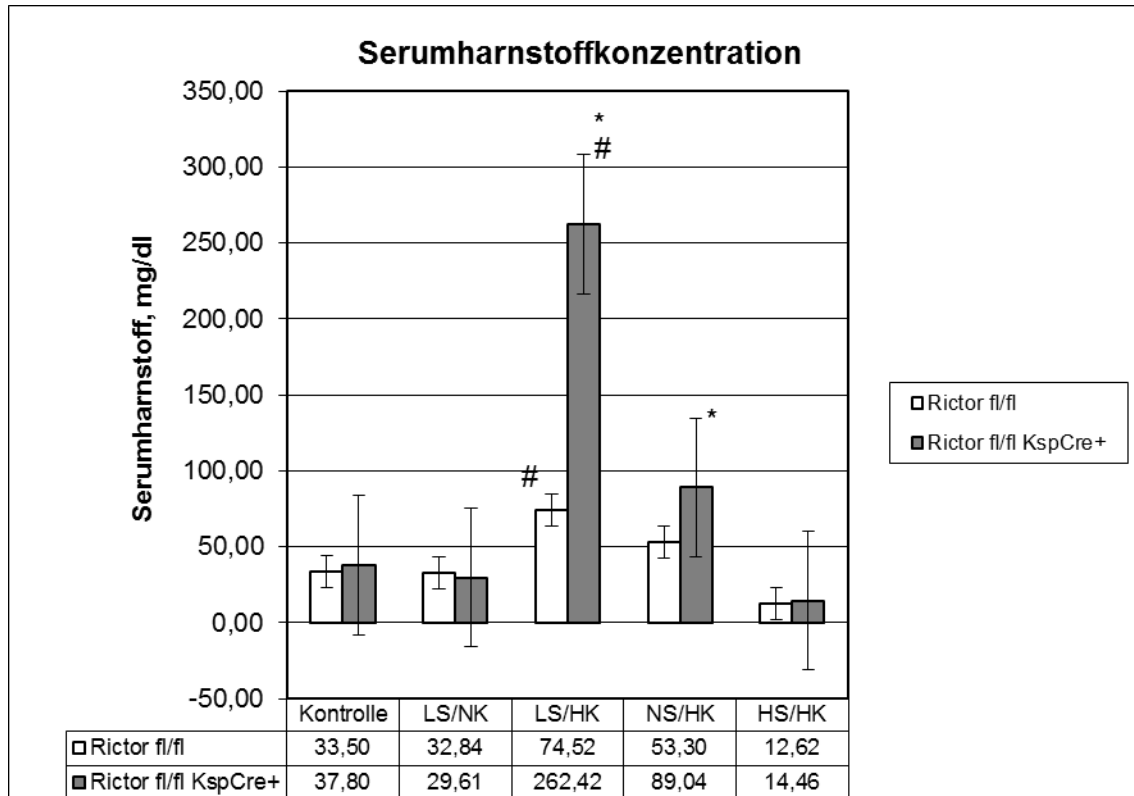
**Abbildung 14: Urinmenge unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Urinmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *ml/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 29 bei den Wildtyp-Tieren und 30 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 12 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Urinmenge beider Genotypen unter LS/NK-Diät unterschied sich nicht signifikant von jener unter Kontrolldiät. Unter NS/HK- und HS/HK-Diät war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Urinmenge zu beobachten. Unter LS/HK-Diät war jedoch nur bei den Wildtyp-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) gesteigerte Urinmenge zu erkennen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war ausschließlich unter LS/HK-Diät bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine signifikant (\*) verringerte Urinmenge festzustellen.

### 3.1.5. Serumharnstoff

Die Serumharnstoffkonzentration wurde als Surrogat der renalen Exkretionsleistung bzw. glomerulären Filtrationsrate herangezogen.



**Abbildung 15: Serumharnstoff unter diätetischen Interventionen**

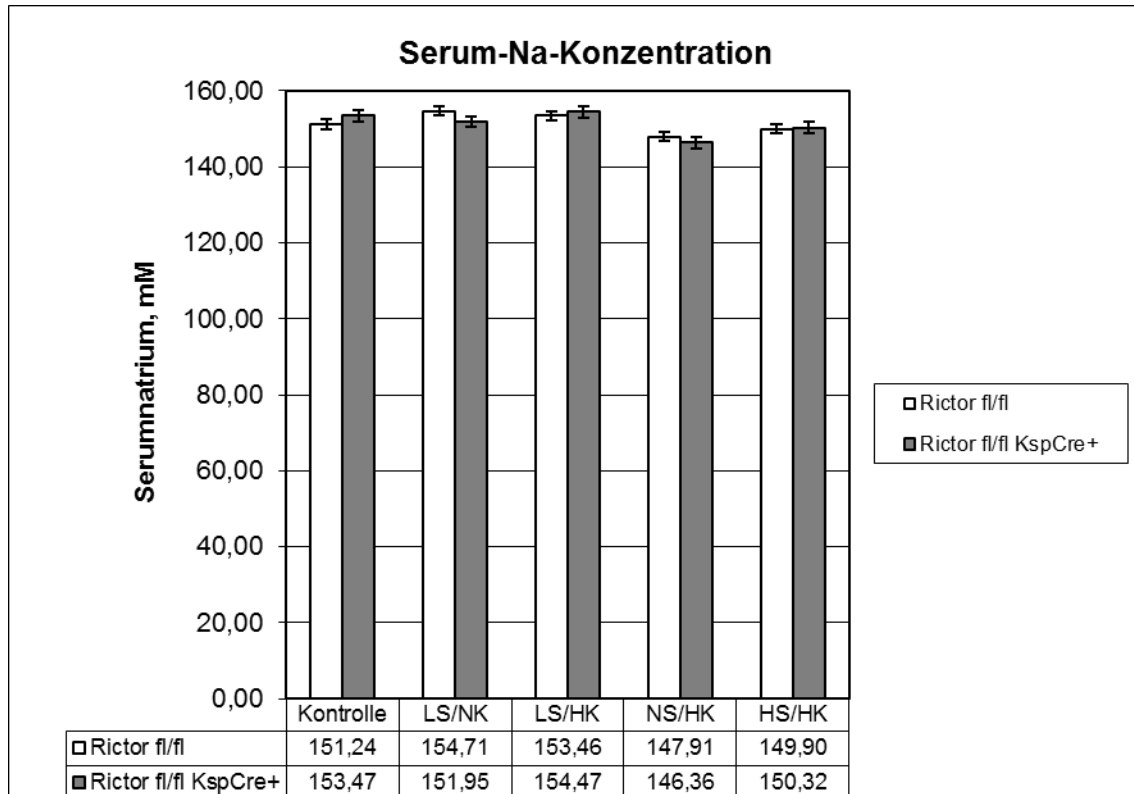
Diagramm zur Darstellung der Serumharnstoffwerte nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *mg/dl* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 8 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 7 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumharnstoffkonzentration beider Genotypen unter LS/NK-, NS/HK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Unter LS/HK-Diät war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät ein signifikanter (#) Anstieg der Serumharnstoffkonzentration zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war ausschließlich unter LS/HK- und NS/HK-Diät bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine signifikant (\*) erhöhte Serumharnstoffkonzentration festzustellen. Im Falle der Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-

Tiere unter LS/HK-Diät deutete diese massive Erhöhung des Serumharnstoffs auf ein akutes Nierenversagen hin.

### 3.1.6. Serumnatrium- und Serumkaliumkonzentration

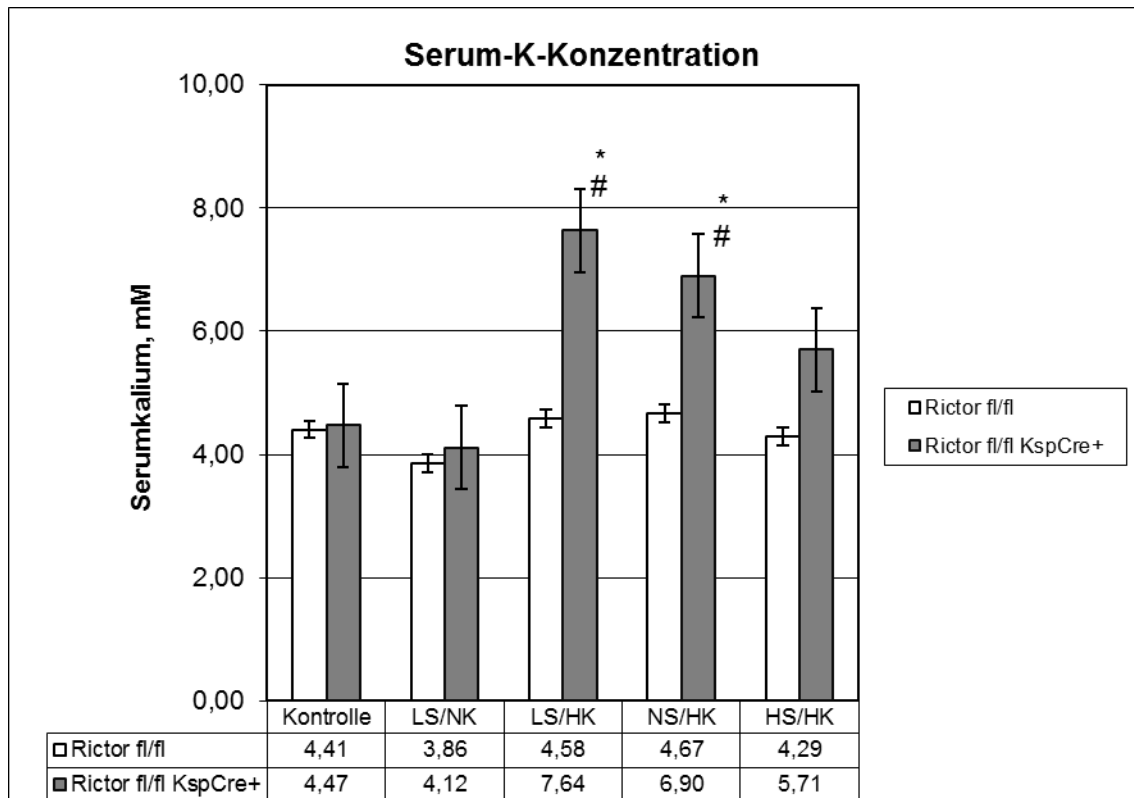
Die Serumelektrolytkonzentrationen wurden zur Beurteilung der Rolle des mTOR2-Komplexes an der Salzhomöostase herangezogen.



**Abbildung 16: Serumnatrium unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumnatriumwerte nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *mM* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 12 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/HK: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei den Wildtyp-Tieren und 4 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen.

Die Serumnatriumkonzentration beider Genotypen unter jeglichen Diäten unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Ebenso war im Vergleich beider Genotypen miteinander kein signifikanter Unterschied festzustellen.



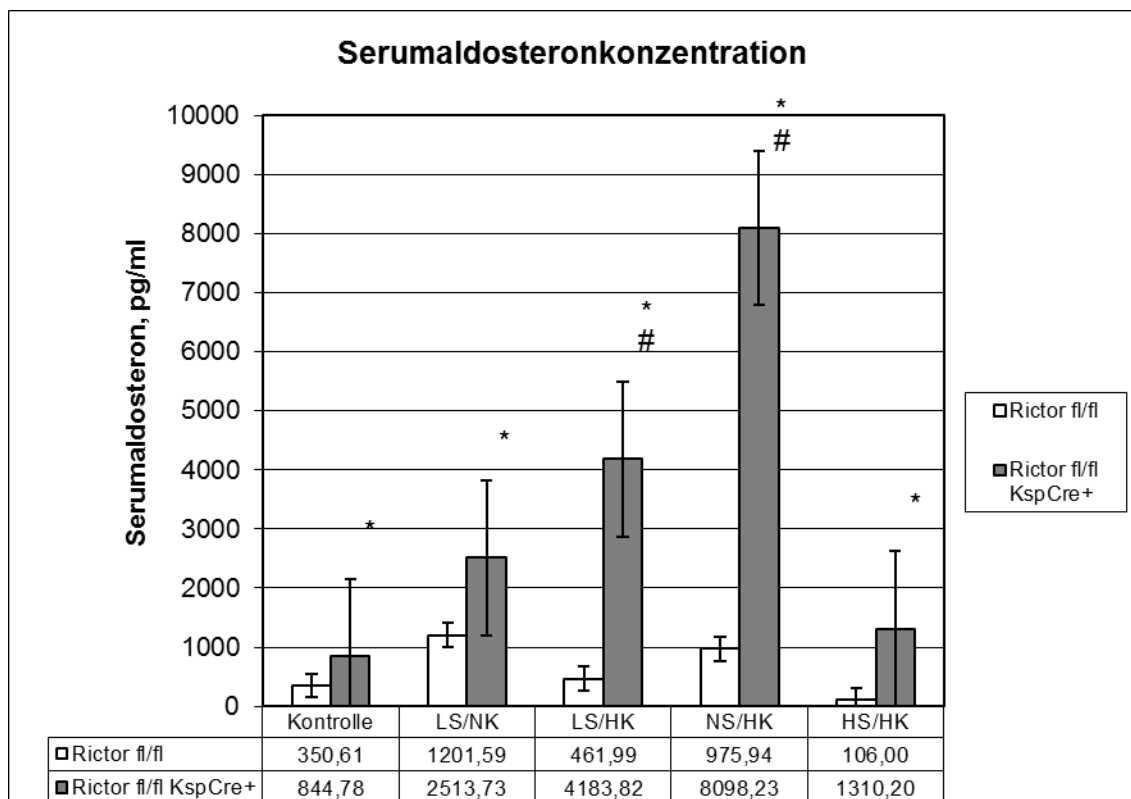
**Abbildung 17: Serumkalium unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumkaliumwerte nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in mM mit SEM. *n* bei Kontrolle: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 12 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/HK: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HS/HK: 6 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumkaliumkonzentration beider Genotypen unter LS/NK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Unter LS/HK- und NS/HK-Diät war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät ein signifikant (#) erhöhter Wert im Sinne einer deutlichen Hyperkaliämie zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war ausschließlich unter LS/HK und NS/HK-Diät eine signifikante (\*) Hyperkaliämie festzustellen. Dieser Effekt war unter LS/HK-Diät am stärksten ausgeprägt und nahm unter Diäten mit steigendem Natriumgehalt graduell ab.

### 3.1.7. Serumaldosteron

Die Serumaldosteronkonzentration spielt eine wichtige Rolle zur Beurteilung der Natrium- und Kaliumhomöostase des gesamten Körpers.



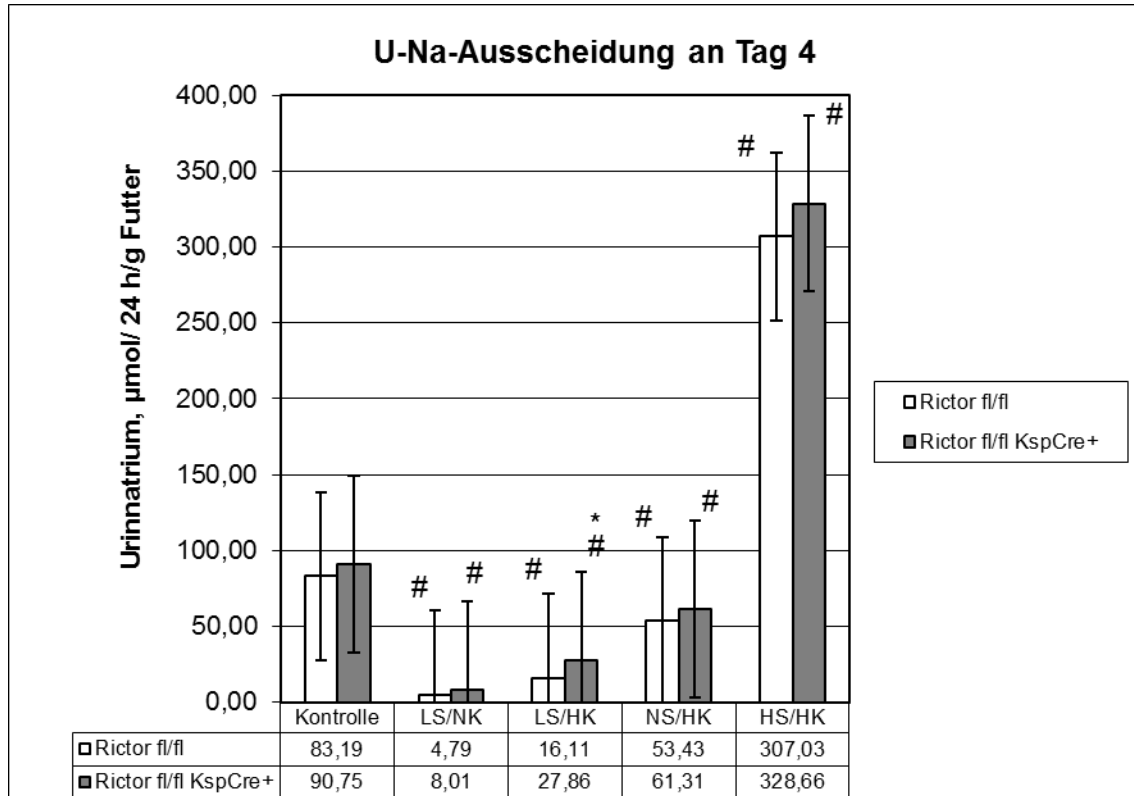
**Abbildung 18: Serumaldosteron unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumaldosteronwerte nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *pg/ml* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 20 bei den Wildtyp-Tieren und 16 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/HK: 19 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 18 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HS/HK: 5 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumaldosteronkonzentration beider Genotypen unter LS/NK- und HS/HK-Diät unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Unter LS/HK- und NS/HK-Diät war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Konzentration zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren unter allen Diäten eine signifikant (\*) erhöhte Konzentration im Sinne eines Hyperaldosteronismus festzustellen.

### 3.1.8. Urinnatrium- und Urinkaliumausscheidung

Die Urin-Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>-Ausscheidung wurden zur Beurteilung der genauen Rolle des mTOR2- Komplexes bezüglich der Salzhomöostase im distalen Tubulus herangezogen.

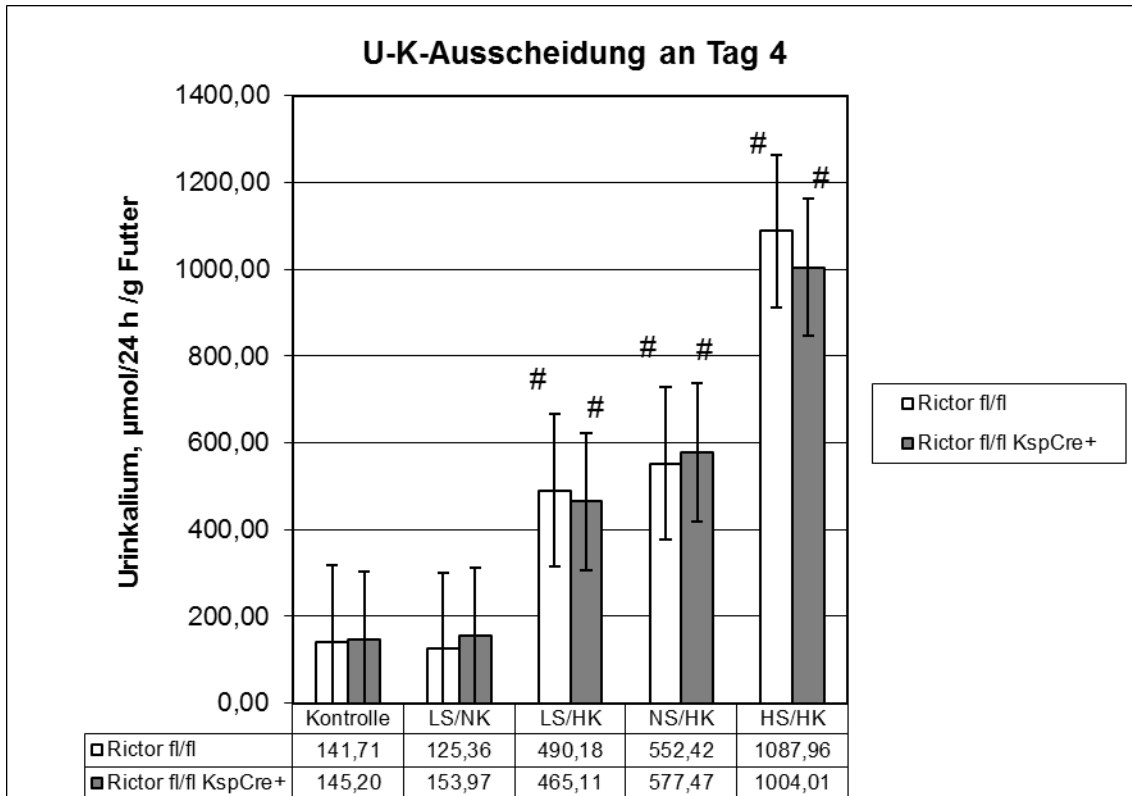


**Abbildung 19: Urinnatrium unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Urinnatriumwerte nach dem vierten Behandlungstag und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24\text{ h/g Futter}$  mit SEM. *n* bei Kontrolle: 29 bei den Wildtyp-Tieren und 30 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 4 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Natriumausscheidung beider Genotypen unter LS/NK-, LS/HK- und NS/HK-Diät war signifikant (#) niedriger als unter Kontrolldiät. Unter HS/HK-Diät war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Natriumausscheidung zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren einzig unter LS/HK-Diät eine signifikant (\*) erhöhte Natriumausscheidung festzustellen.





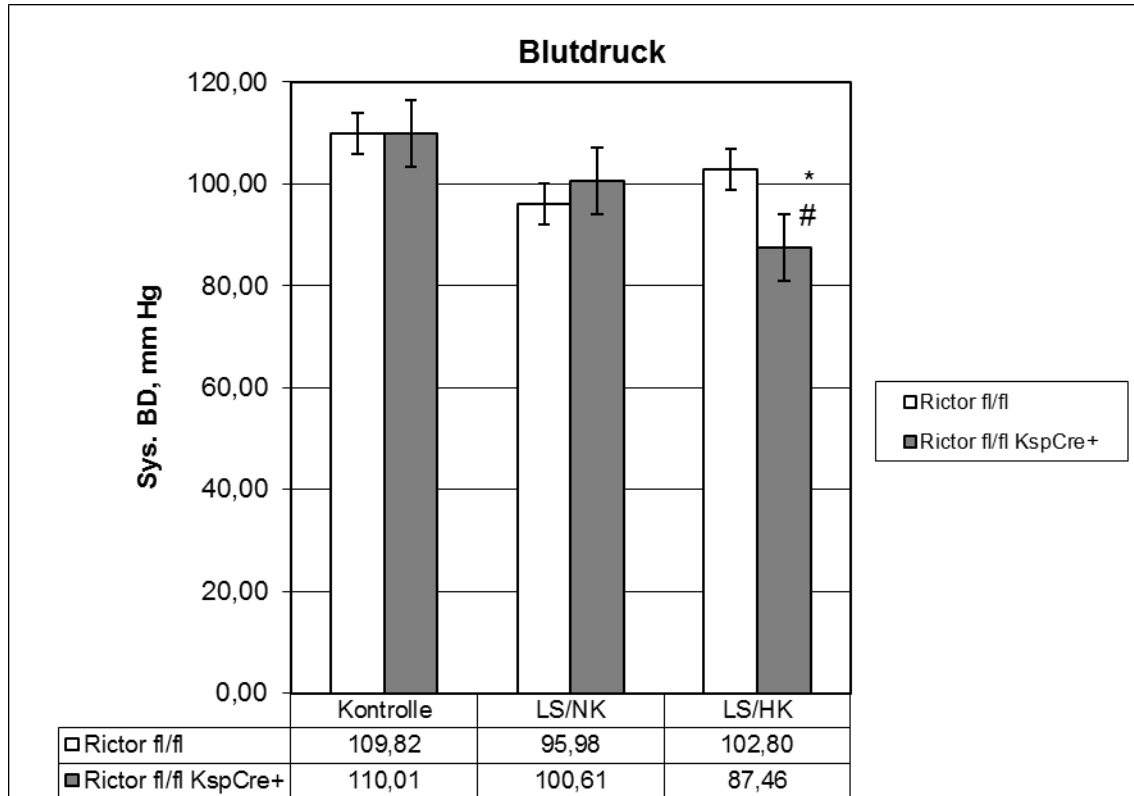
**Abbildung 20: Urinkalium unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Urinkaliumwerte nach dem vierten Behandlungstag und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24\text{ h/g Futter}$  mit SEM. *n* bei Kontrolle: 29 bei den Wildtyp-Tieren und 30 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 9 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei NS/HK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei HS/HK: 4 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät.

Die Kaliumausscheidung beider Genotypen unter LS/NK-Diät war nicht signifikant von der Ausscheidung unter Kontrolldiät zu unterscheiden. Unter LS/HK-, NS/HK- und HS/HK-Diät war jedoch bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Kaliumausscheidung zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander waren unter keiner Diät signifikante Unterschiede festzustellen.

### 3.1.9. Blutdruck

Anhand der Blutdruckmessungen zum Ende des Versuchszeitraums war es möglich die arteriellen systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere zu vergleichen.



**Abbildung 21: Systolischer Blutdruck unter diätetischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung des systolischen Blutdrucks nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diäten. Angegeben sind Mittelwerte in *mmHg* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 7 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei LS/NK: 6 bei beiden Genotypen; *n* bei LS/HK: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Der systolische Blutdruck beider Genotypen unter LS/NK-Diät unterschied sich nicht signifikant von dem Blutdruck unter Kontrolldiät. Unter LS/HK-Diät waren nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät signifikant (#) erniedrigte Blutdruckwerte zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander waren bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren ebenfalls unter LS/HK-Diät signifikant (\*) erniedrigte Blutdruckwerte festzustellen.

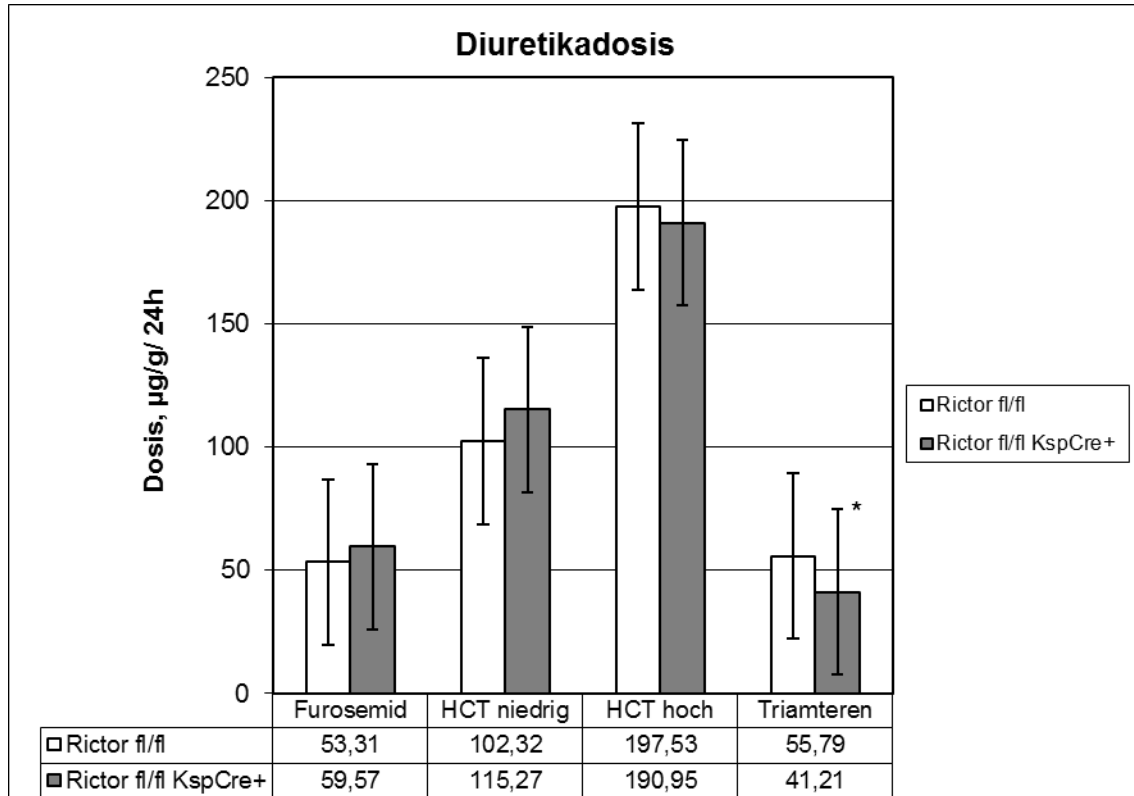
### **3.2. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Homöostase der Wildtyp- und Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tiere unter diuretischen Interventionen**

Im Folgenden werden jene Daten dargestellt, welche bei fünftägiger Gabe verschiedener Diuretika erhoben wurden. Das Ziel dieser Behandlungen war es, die distal-tubulären Kompensationsfähigkeiten unter der Gabe verschiedener Diuretika zu vergleichen und so die Rolle des mTOR2-Komplexes bezüglich der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Homöostase zu beleuchten. Folgende Behandlungen wurden angewandt: kein Diuretikum (Kontrolle), Furosemid (125 mg/l), HCT (400 mg/l), Triamteren (200 mg/l).

Die Diuretika wurden oral in der einzig verfügbaren Trinkflasche angeboten. Das bedeutete, dass die erhöhte Trinkmenge unter erhöhter Diurese mit einer weiteren Dosissteigerung einherging und die Diuretikaexposition dadurch weiter anstieg. Dieses Ungleichgewicht konnte erst dann unterbrochen werden, wenn der Tubulusapparat maximal gegenregulierte und die Wirkung der Diuretika abschwächte (Diuretikatoleranz).

### 3.2.1. Diuretikadosis

Anhand der Ermittlung der von jeder Maus oral aufgenommenen Trinkmenge war es möglich, die aufgenommene Dosis bei den Experimenten zu erfassen. Bei der Thiazidaufnahme konnte so zwischen niedriger und hoher Dosis unterschieden werden (<150 µg/g/24 h: niedrigdosiert; >150 µg/g/24 h: hochdosiert).

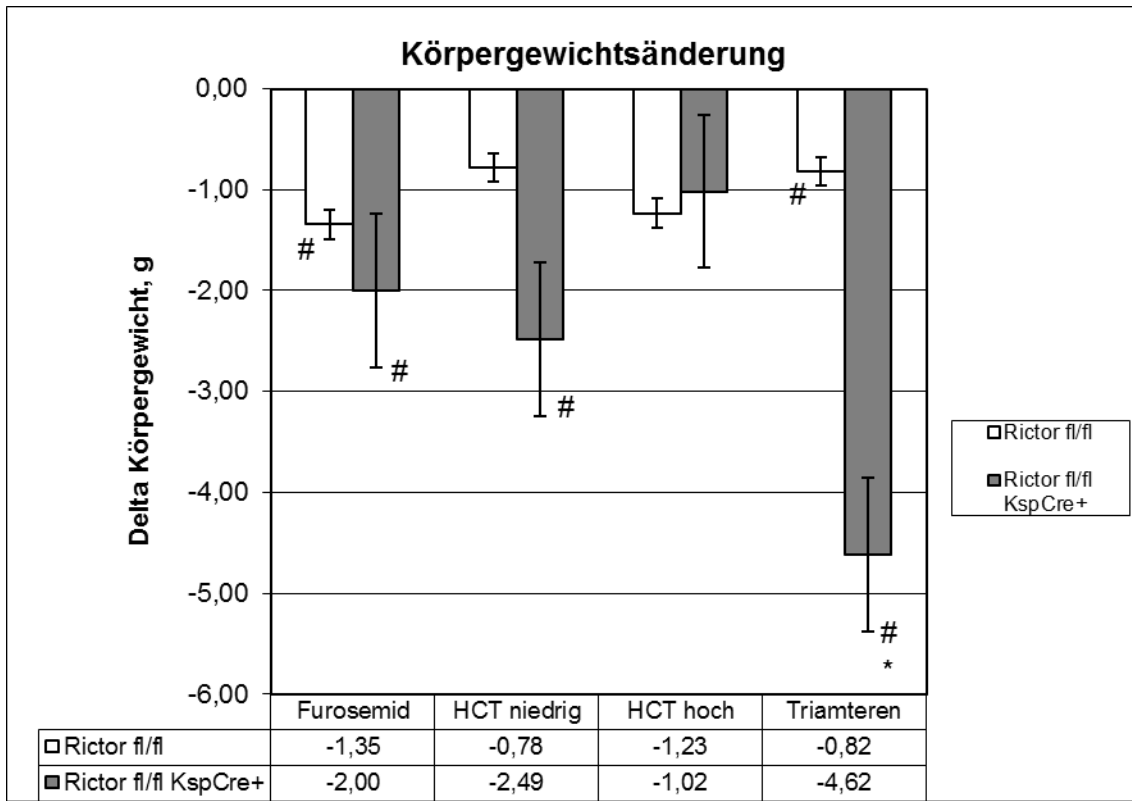


**Abbildung 22: Diuretikadosis**

Diagramm zur Darstellung der Diuretikadosis nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in µg/g/24 h mit SEM. *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 4 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Im Vergleich beider Genotypen bestand bei der aufgenommenen Dosis unter Furosemid, HCT niedrig und HCT hoch kein signifikanter Unterschied. Einzig unter Triamteren war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine signifikant (\*) niedrigere Aufnahme zu verzeichnen.

### 3.2.2. Körpergewichtsänderung

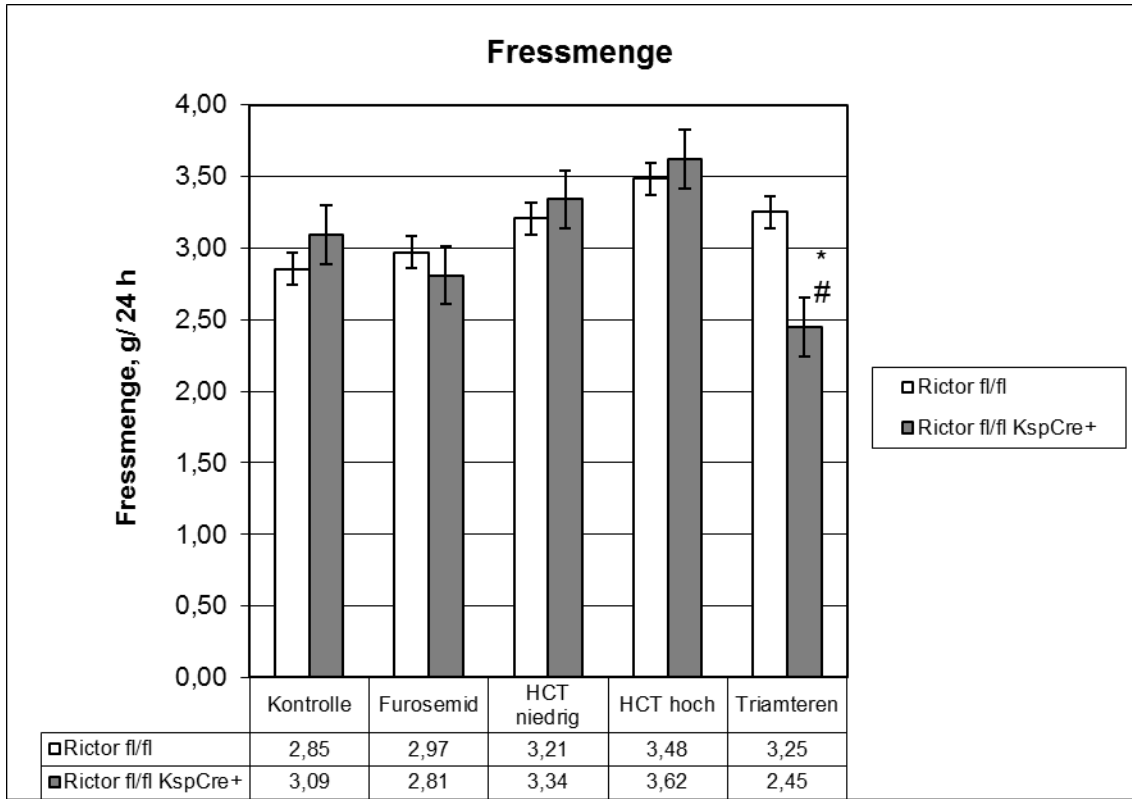


**Abbildung 23: Körpergewichtsänderung unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Körpergewichtsänderung nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in g mit SEM. *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* verschieden von null, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Der Körpergewichtsänderung beider Genotypen unter HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von Null. Unter Furosemid und Triamteren war bei beiden Genotypen ein signifikanter (#) Gewichtsverlust zu beobachten. Unter HCT niedrig war jedoch nur bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren ein signifikanter (#) Gewichtsabfall festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren einzig unter Triamteren ein signifikant (\*) höherer Gewichtsverlust zu verzeichnen.

3.2.3. Fressmenge

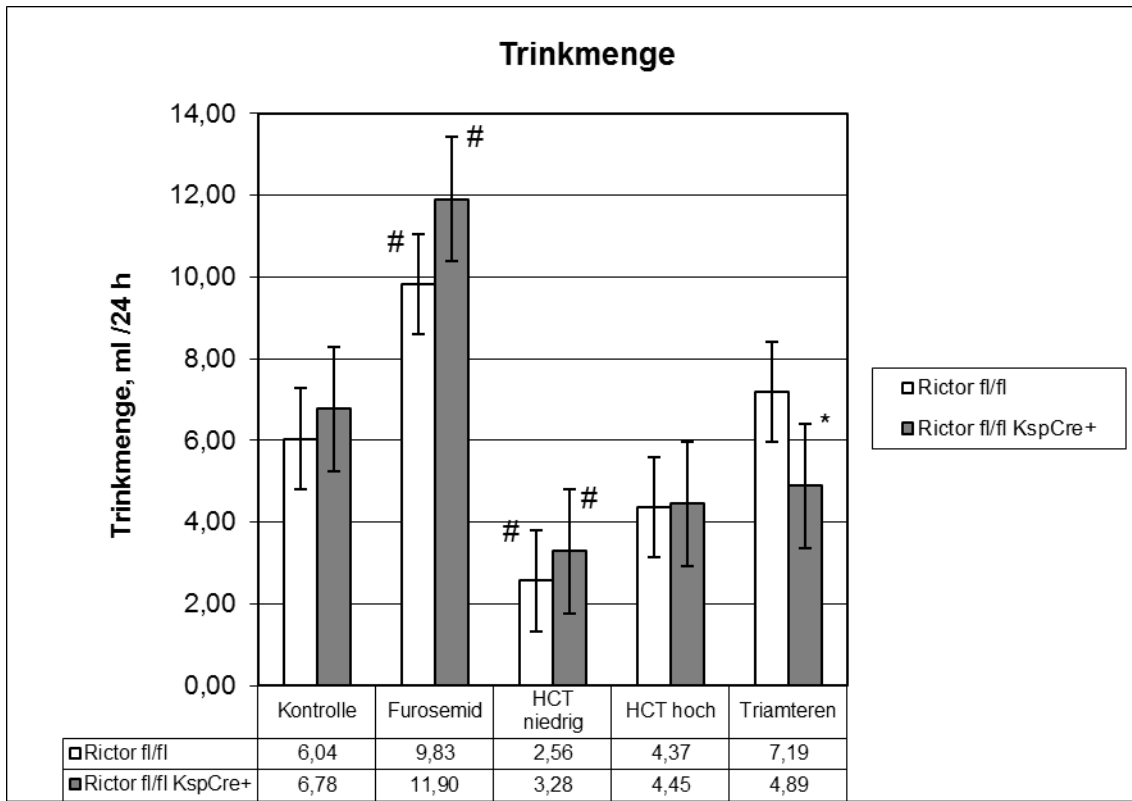


**Abbildung 24: Fressmenge unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Fressmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *g/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 49 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Fressmenge beider Genotypen unter Furosemid, HCT niedrig und HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von der Fressmenge unter Kontrolldiät. Unter Triamteren war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Fressmenge zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren ebenfalls nur unter Triamteren eine signifikant (\*) niedrigere Fressmenge festzustellen.

3.2.4. Trinkmenge

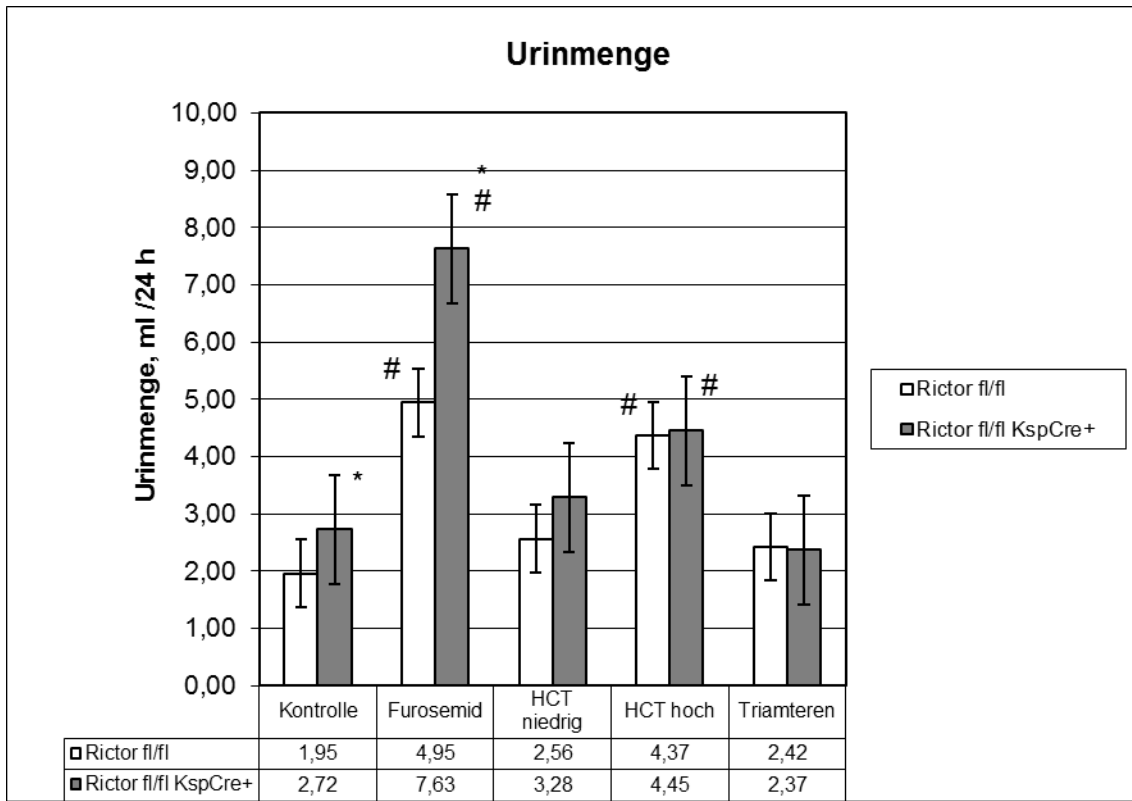


**Abbildung 25: Trinkmenge unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Trinkmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *ml/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 49 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Trinkmenge beider Genotypen unter HCT hoch und Triamteren unterschied sich nicht signifikant von jener unter Kontrolldiät. Unter Furosemid war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikante (#) Steigerung der Trinkmenge zu beobachten. Unter HCT niedrig war hingegen bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Trinkmenge festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren einzig unter Triamteren eine signifikante (\*) Abnahme der Trinkmenge zu verzeichnen.

3.2.5. Urinmenge



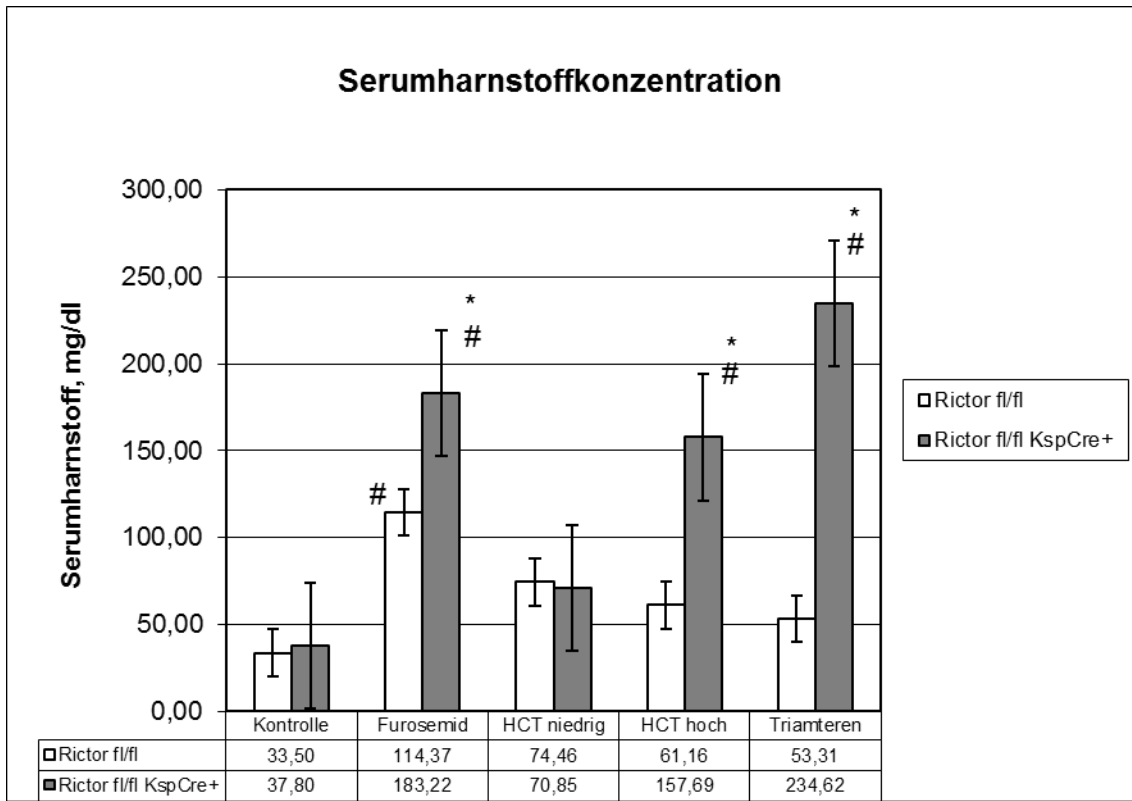
**Abbildung 26: Urinmenge unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Urinmenge nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *ml/24 h* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 49 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Urinmenge beider Genotypen unter HCT niedrig und Triamteren unterschied sich nicht signifikant von der Urinmenge unter Kontrolldiät. Unter Furosemid und HCT hoch war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikante (#) Zunahme der Urinmenge zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren unter Kontrolldiät und Furosemid ein signifikant (\*) gesteigertes Urinvolumen festzustellen.



3.2.6. Serumharnstoff



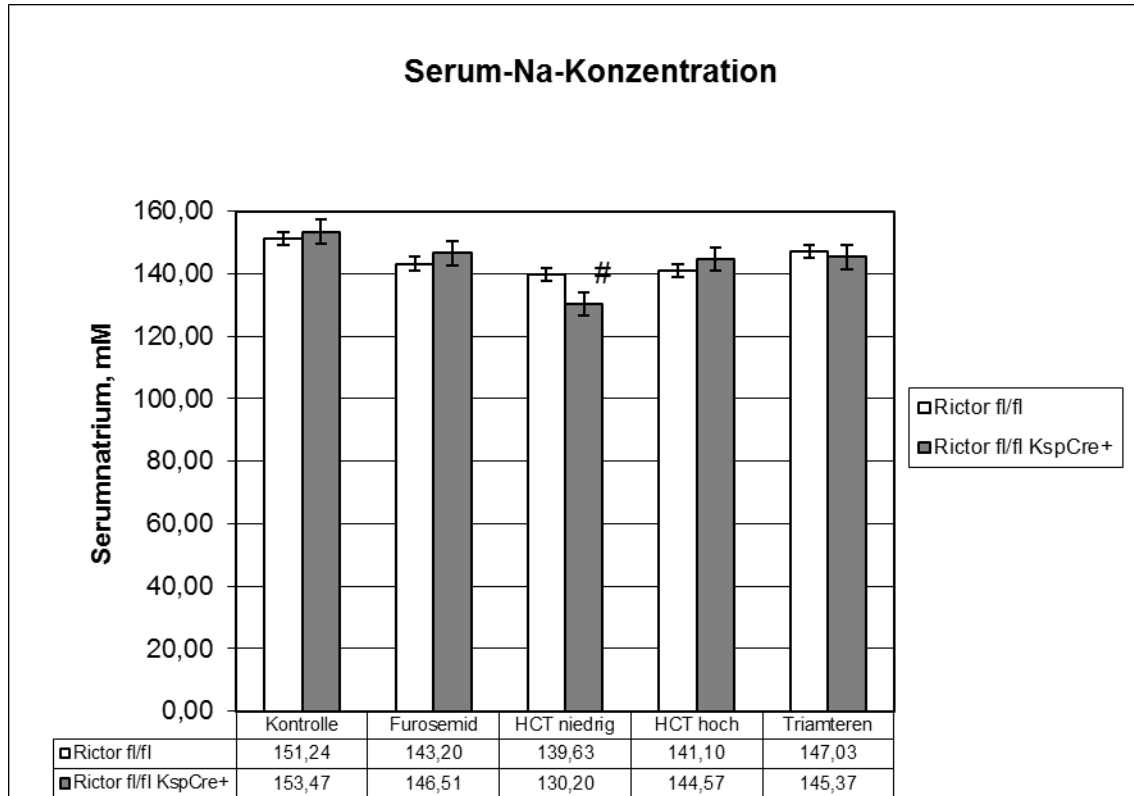
**Abbildung 27: Serumharnstoff unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Serumharnstoffkonzentration nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *mg/dl* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 8 bei den Wildtyp-Tieren und 5 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 9 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei den Wildtyp-Tieren und 13 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumharnstoffkonzentration beider Genotypen unter HCT niedrig unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Unter Furosemid war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erhöhte Serumharnstoffkonzentration zu beobachten. Unter HCT hoch und Triamteren war jedoch nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät ein signifikanter (#) Anstieg der Serumharnstoffkonzentration festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren unter Furosemid, HCT hoch und Triamteren ein massi-

ver (\*) Anstieg der Serum-Harnstoffkonzentration im Sinne eines akuten (prärenalen) Nierenversagens zu verzeichnen.

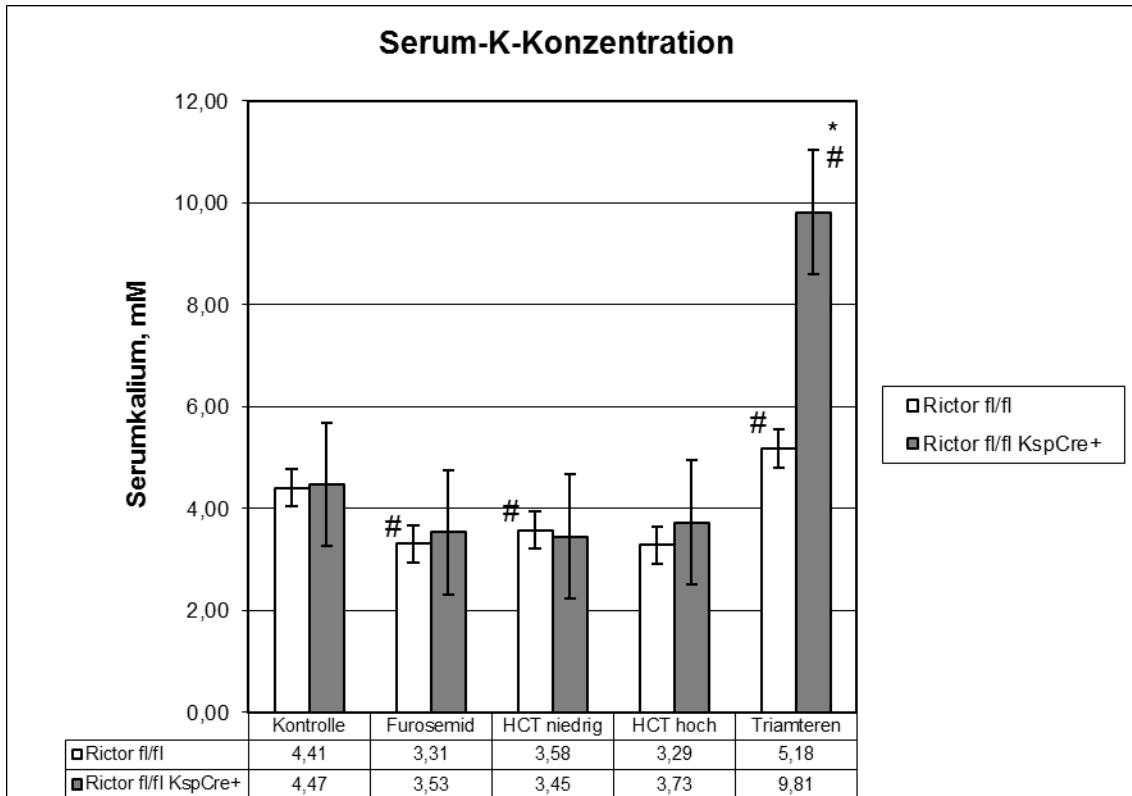
### 3.2.7. Serumnatrium- und Serumkaliumkonzentration



**Abbildung 28: Serumnatrium unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumnatriumkonzentration nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *mM* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 9 bei den Wildtyp-Tieren und 7 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 3 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tiere; *n* bei Triamteren: 19 bei den Wildtyp-Tieren und 16 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät.

Die Serumnatriumkonzentration beider Genotypen unter Furosemid, HCT hoch und Triamteren unterschied sich nicht signifikant von jener unter Kontrolldiät. Unter HCT niedrig war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Serum-Natriumkonzentration zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war unter keinem Diuretikum ein signifikanter Unterschied festzustellen.

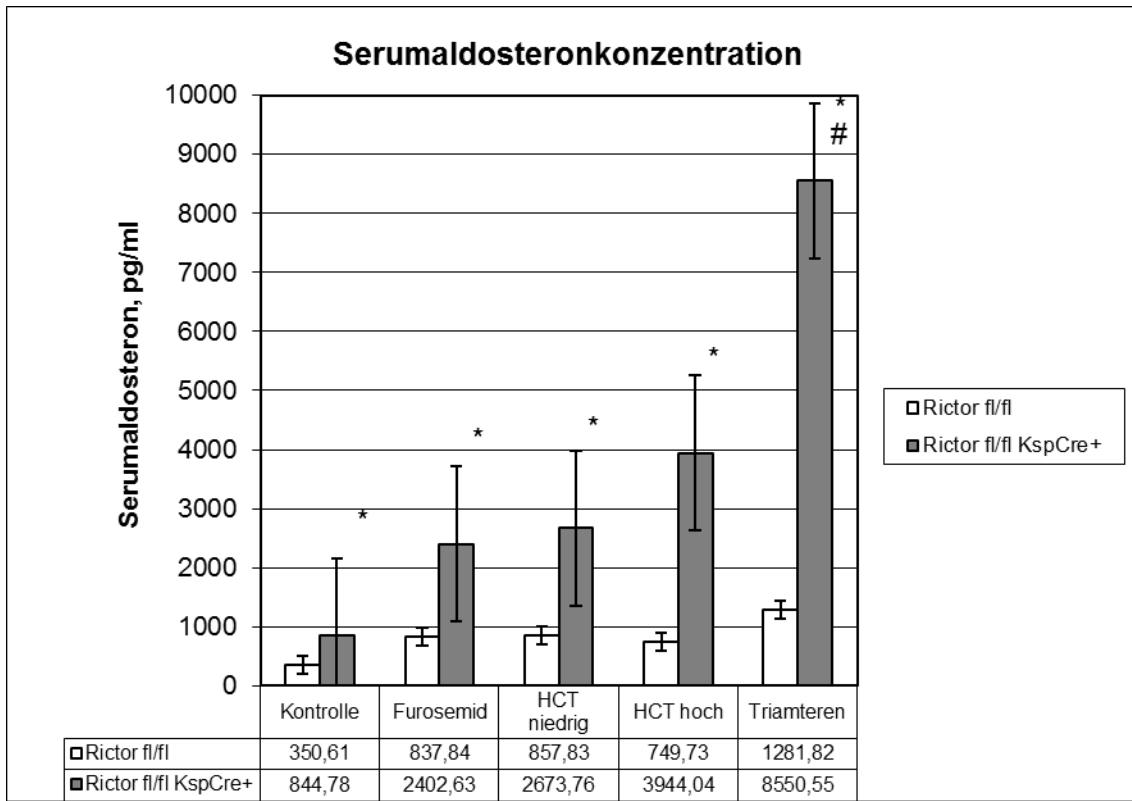


**Abbildung 29: Serumkalium unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumkaliumkonzentration nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *mM* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 14 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 9 bei den Wildtyp-Tieren und 7 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 3 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 19 bei den Wildtyp-Tieren und 16 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumkaliumkonzentration beider Genotypen unter HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät. Unter Furosemid und HCT niedrig war nur bei den Wildtyp-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Serumkaliumkonzentration zu beobachten. Unter Triamteren war bei beiden Genotypen verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikante (#) Hyperkaliämie festzustellen. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren einzig unter Triamteren eine massive (\*) Hyperkaliämie zu verzeichnen.

3.2.8. Serumaldosteron



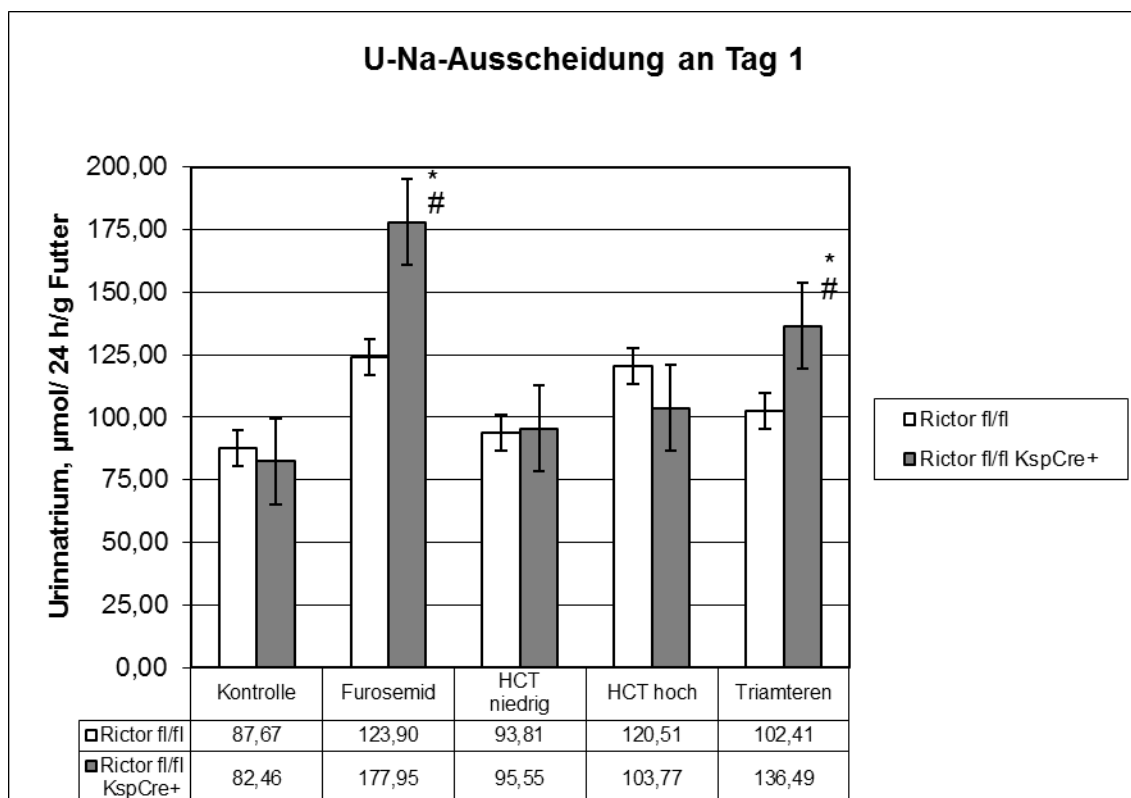
**Abbildung 30: Serumaldosteron unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Serumaldosteronkonzentration nach fünf Behandlungstagen und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in *pg/ml* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 15 bei den Wildtyp-Tieren und 12 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 6 bei den Wildtyp-Tieren und 4 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 3 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 8 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Die Serumaldosteronkonzentration beider Genotypen unter Furosemid, HCT niedrig und HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von der Konzentration unter Kontrolldiät, obwohl ein deutlicher Trend zu erhöhten Werten bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren zu sehen war (großer SEM). Unter Triamteren war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät ein signifikanter (#) Anstieg der Serum-Aldosteronkonzentration zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren unter Kontrolldiät und allen Diuretika eine signifikant (\*) erhöhte Serum-Aldosteronkonzentration im Sinne eines Hyperaldosteronismus zu verzeichnen.

### 3.2.9. Urinnatrium- und Urinkaliumausscheidung

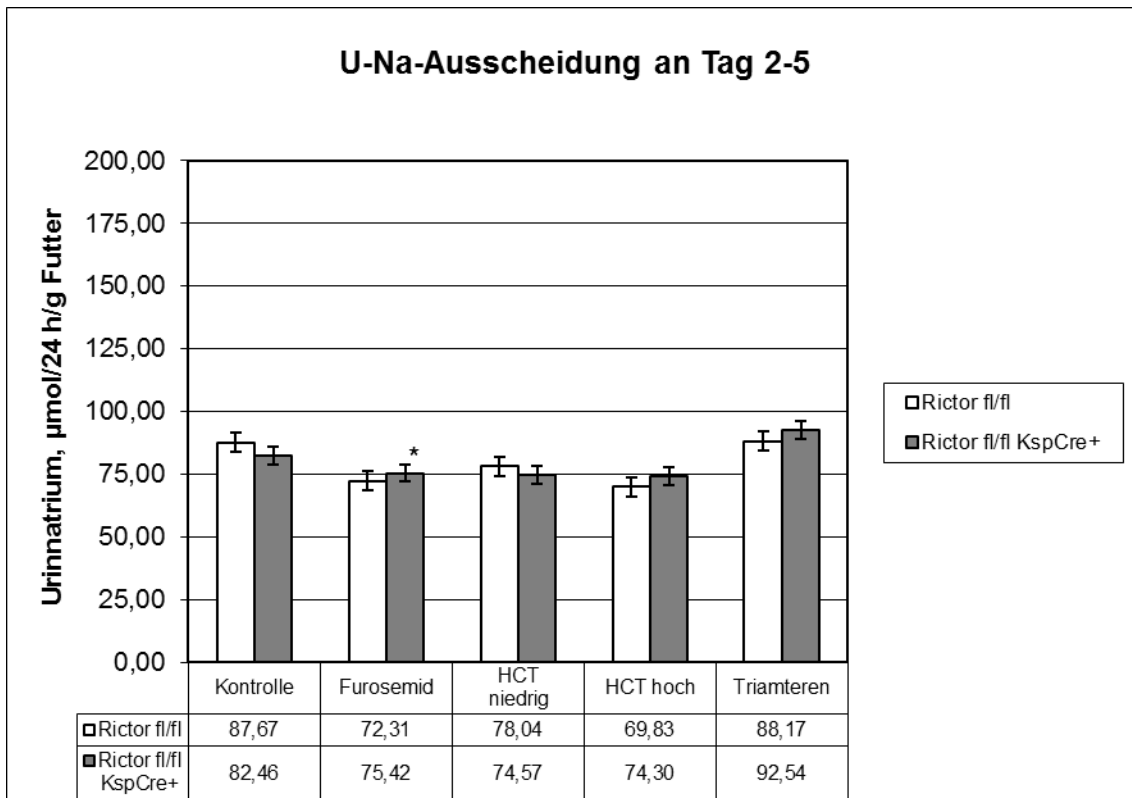
Nachfolgend sind die Urinelektrolytausscheidungen nach dem ersten und die durchschnittliche Ausscheidung vom zweiten bis fünften Tag aufgrund einsetzender Diuretikatoleranz ausgewertet.



**Abbildung 31: Urinnatrium an Tag 1 unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Urinnatriumwerte nach dem ersten Behandlungstag und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24\text{ h/g Futter}$  mit SEM. *n* bei Kontrolle: 47 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 15 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei beiden Genotypen. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

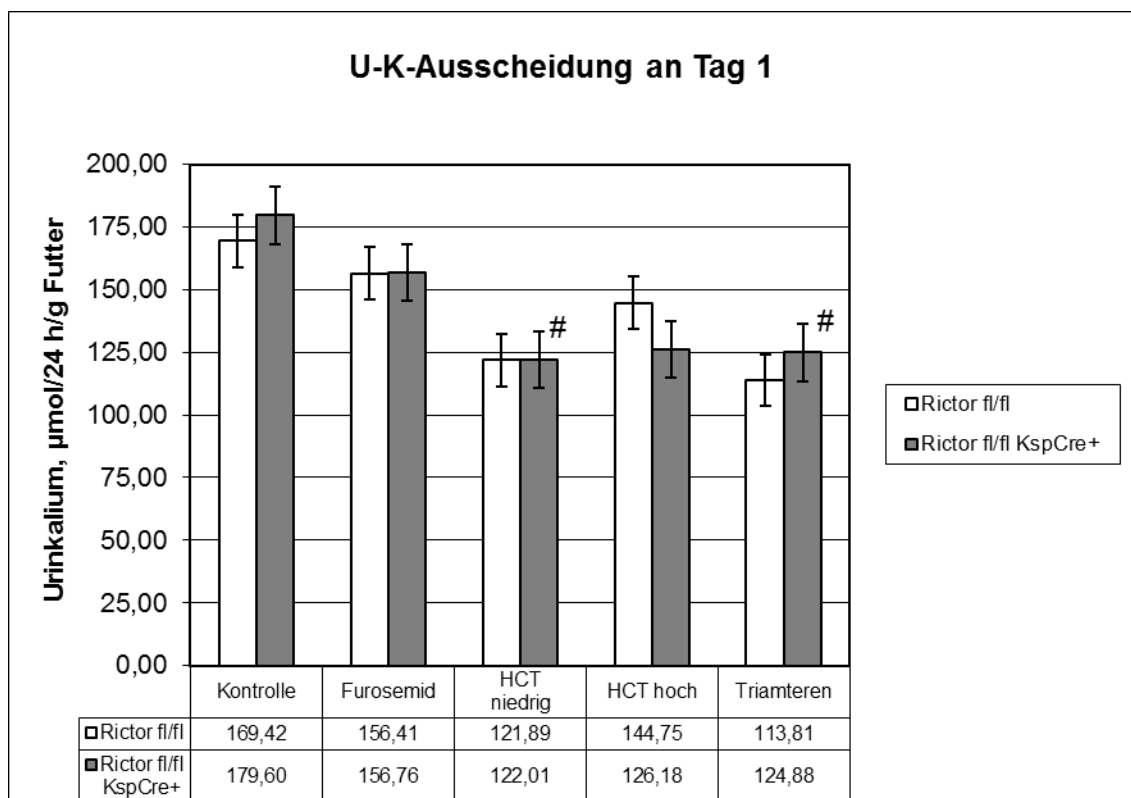
Die Natriumausscheidung beider Genotypen unter HCT niedrig und HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von der Ausscheidung unter Kontrolldiät. Unter Furosemid und Triamteren war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät ein signifikanter (#) Anstieg der Natriumausscheidung zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren ebenfalls unter Furosemid und Triamteren eine signifikant (\*) gesteigerte Natriurese festzustellen.



**Abbildung 32: Urinnatrium an Tag 2-5 unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Urinnatriumwerte von den Behandlungstagen zwei bis fünf und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24 \text{ h/g}$  Futter mit SEM. *n* bei Kontrolle: 47 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 15 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 15 bei den Wildtyp-Tieren und 14 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

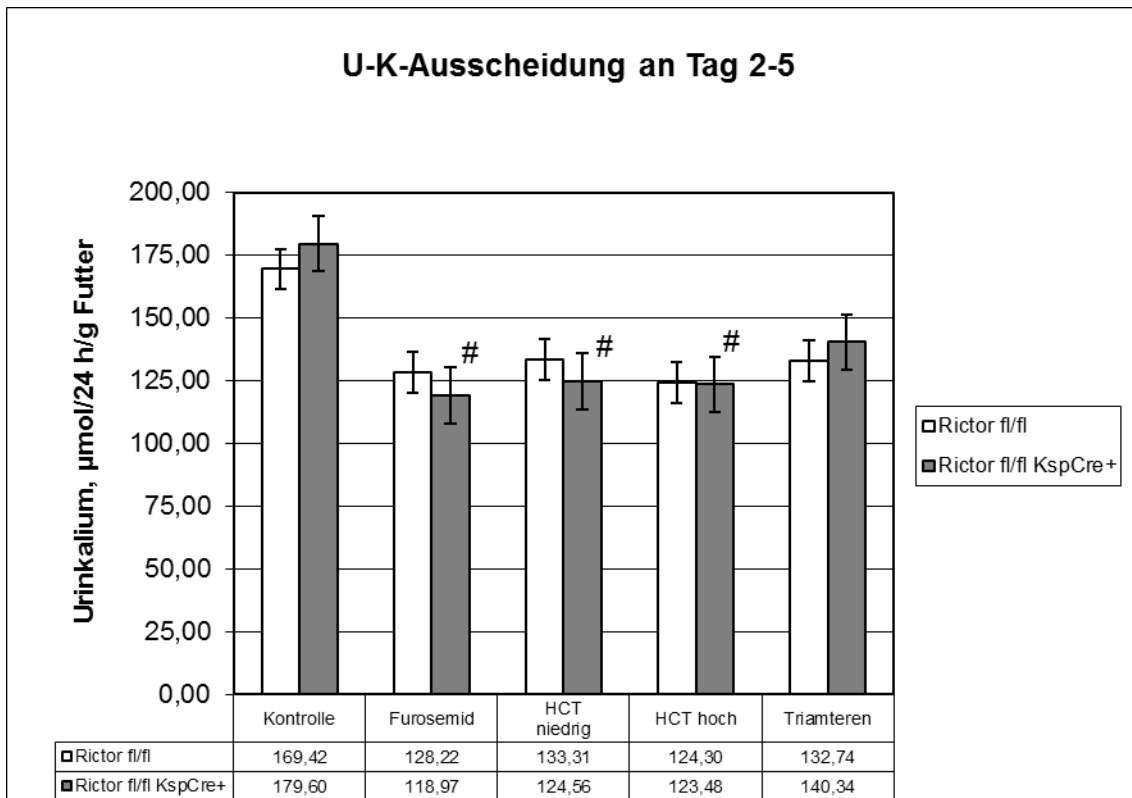
Die Natriumausscheidung beider Genotypen unter allen Diuretika unterschied sich nicht signifikant von der Ausscheidung unter Kontrolldiät. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren einzig unter Furosemid eine signifikant (\*) erhöhte Ausscheidung zu detektieren.



**Abbildung 33: Urinkalium an Tag 1 unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der Urinkaliumwerte nach dem ersten Behandlungstag und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24\text{ h/g Futter}$  mit SEM. *n* bei Kontrolle: 48 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 15 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 13 bei den Wildtyp-Tieren und 15 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät.

Die Kaliumausscheidung beider Genotypen unter Furosemid und HCT hoch unterschied sich nicht signifikant von der Ausscheidung unter Kontrolldiät. Unter HCT niedrig und Triamteren war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) erniedrigte Kaliumausscheidung zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war unter keiner Intervention ein signifikanter Unterschied festzustellen.



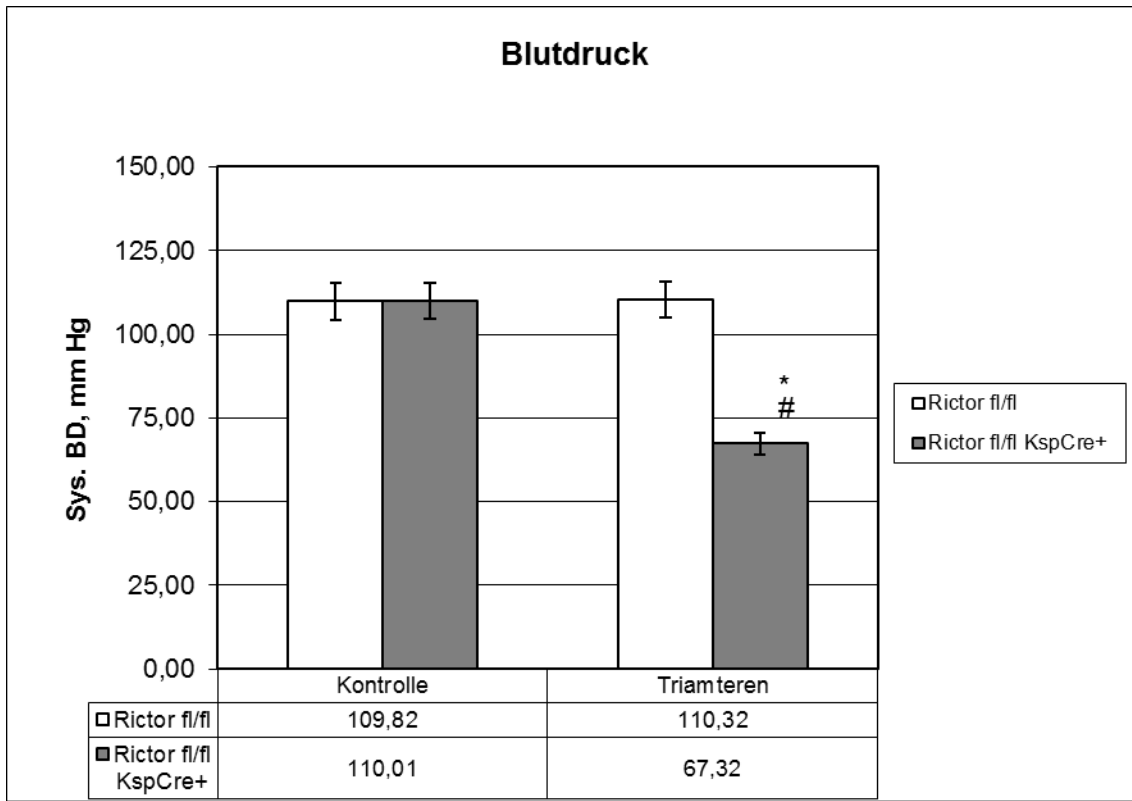
**Abbildung 34: Urinkalium an Tag 2-5 unter diuretischen Interventionen**

Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Urinkaliumwerte von den Behandlungstagen zwei bis fünf und Gabe verschiedener Diuretika. Angegeben sind Mittelwerte in  $\mu\text{mol}/24\text{ h/g Futter}$  mit SEM. *n* bei Kontrolle: 48 bei den Wildtyp-Tieren und 51 bei den Knockout-Tieren; *n* bei Furosemid: 16 bei den Wildtyp-Tieren und 15 bei den Knockout-Tieren; *n* bei HCT niedrig: 11 bei den Wildtyp-Tieren und 10 bei den Knockout-Tieren; *n* bei HCT hoch: 5 bei den Wildtyp-Tieren und 8 bei den Knockout-Tieren; *n* bei Triamteren: 13 bei den Wildtyp-Tieren und 14 bei den Knockout-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät.

Die Kaliumausscheidung beider Genotypen unter Triamteren unterschied sich nicht signifikant von der Ausscheidung unter Kontrolldiät. Unter Furosemid, HCT niedrig und HCT hoch war nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät eine signifikant (#) herabgesetzte Kaliumausscheidung zu beobachten. Im Vergleich beider Genotypen miteinander war unter keiner Intervention ein signifikanter Unterschied zu erkennen.



3.2.10. Blutdruck



**Abbildung 35: Systolischer Blutdruck unter diuretischer Intervention**

Diagramm zur Darstellung der systolischen Blutdruckwerte nach fünf Behandlungstagen. Angegeben sind Mittelwerte in *mmHg* mit SEM. *n* bei Kontrolle: 7 bei den Wildtyp-Tieren und 6 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren; *n* bei Triamteren: 8 bei den Wildtyp-Tieren und 7 bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren. #: *signifikant* in Bezug auf die Kontrolldiät, \*: *signifikant* in Bezug auf die Wildtyp-Tiere.

Der systolische Blutdruck war unter Triamterenbehandlung nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren verglichen mit der Kontrolldiät und Wildtyp-Tieren, signifikant (#, \*) erniedrigt.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Arbeit weisen eine essenzielle Bedeutung des mTORC2 für die aldosteron-regulierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Ausscheidung im distalen Nephron nach. mTORC2-Knockout-Mäuse (Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäuse) entwickelten unter LS/HK-Diät ebenso wie unter pharmakologischer ENaC-Blockade (Triamteren) einen aldosteronresistenten Status, welcher zu einem extrazellulären Volumenverlust, einer Hyperkaliämie und in manchen Fällen bis zum Tode führte. Diese Aldosteronresistenz ist auf die ausbleibende Phosphorylierung der SGK1 (an <sup>422</sup>Ser) und Akt (an <sup>493</sup>Ser) an den hydrophoben motif-Stellen ihres C-Terminus zurückzuführen, um die Signaltransduktion nach Aldosteronstimulation zu gewährleisten. Diese nicht stattgefunden Phosphorylierung wurde von unserer Kooperationsarbeitsgruppe (Dr. Florian Grahammer, Universität Freiburg) mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde nur bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäusen sowohl unter Triamteren- als auch LS/HK-Diät gemacht. Die Phosphorylierung dient offenbar der Aufrechterhaltung zweier Mechanismen: 1) die beschleunigte Bindung von Kinasen (wie PDK1), welche durch erneute Phosphorylierung die SGK1 bzw. Akt aktivieren und 2) der Steigerung der Kinasenaktivität, welche im Falle der Akt zu einer bis zu zehnfachen Aktivitätssteigerung führt (Alessi, Andjelkovic et al. 1996, Garcia-Martinez and Alessi 2008, Yan, Mieulet et al. 2008).

Daten aus Zellkultur-Experimenten wiesen auf eine Beteiligung des mTORC2 bei der Elektrolytregulation des aldosteronsensitiven distalen Nephrons hin (Lu, Wang et al. 2010, Lu, Wang et al. 2011). Die exakte in-vivo-Relevanz dieser Befunde war bislang unerforscht. Aus diesem Grund wurde mit tubulusspezifischen Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäusen (mTORC2-Knockout) gearbeitet, in welchen Rictor, das zentrale Gerüstprotein von mTORC2, deletiert war. Obwohl die Verwendung eines Ksp-Promoters zu einer Cre-gesteuerten Exzision in der TAL, im distalen Konvolut, in den Verbindungsstücken und in sämtlichen Sammelrohren führte, konnten trotz der vermeintlich wichtigen Rolle des

mTORC2 für die Zellhomöostase (Shao, Somlo et al. 2002, Guertin, Stevens et al. 2006, Yan, Mieulet et al. 2008) unter Normalbedingungen keine phänotypischen Auffälligkeiten festgestellt werden. Eine Erklärung für den unauffälligen Befund könnte eine verspätete oder inkomplette Aktivität des Promoters im betreffenden Zielgewebe sein. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die betroffenen Tubulusabschnitte der Mäuse unter Anwendung aufwendiger Methodik (Kooperationsarbeitsgruppe, Dr. Florian Grahammer, Universität Freiburg) analysiert wurden und in der TAL und in den Sammelrohren eine 100%-ige Rekombinationsrate zeigten sowie eine 40-50%-ige Rekombinationsrate im distalen Konvolut und in den Verbindungsstücken. Zudem ist in der Literatur die bereits während der Nephrogenese vorhandene frühe Aktivität des Promoters beschrieben, was unterstützend gegen einen verspäteten oder gar postnatalen Beginn der Rekombination spricht (Shao, Somlo et al. 2002).

Der einzige unter Normalbedingungen signifikante Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren war eine bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren erhöhte Serumaldosteronkonzentration. Diese Tatsache weist trotz nicht-signifikanter Unterschiede bei den Serum- und Urinelektrolytwerten (Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>) auf eine milde Aldosteronresistenz unter Ruhebedingungen hin, die jedoch unter Kontrollbedingungen und für den distal-tubulären ENaC/ROMK-Transport nicht essenziell ist.

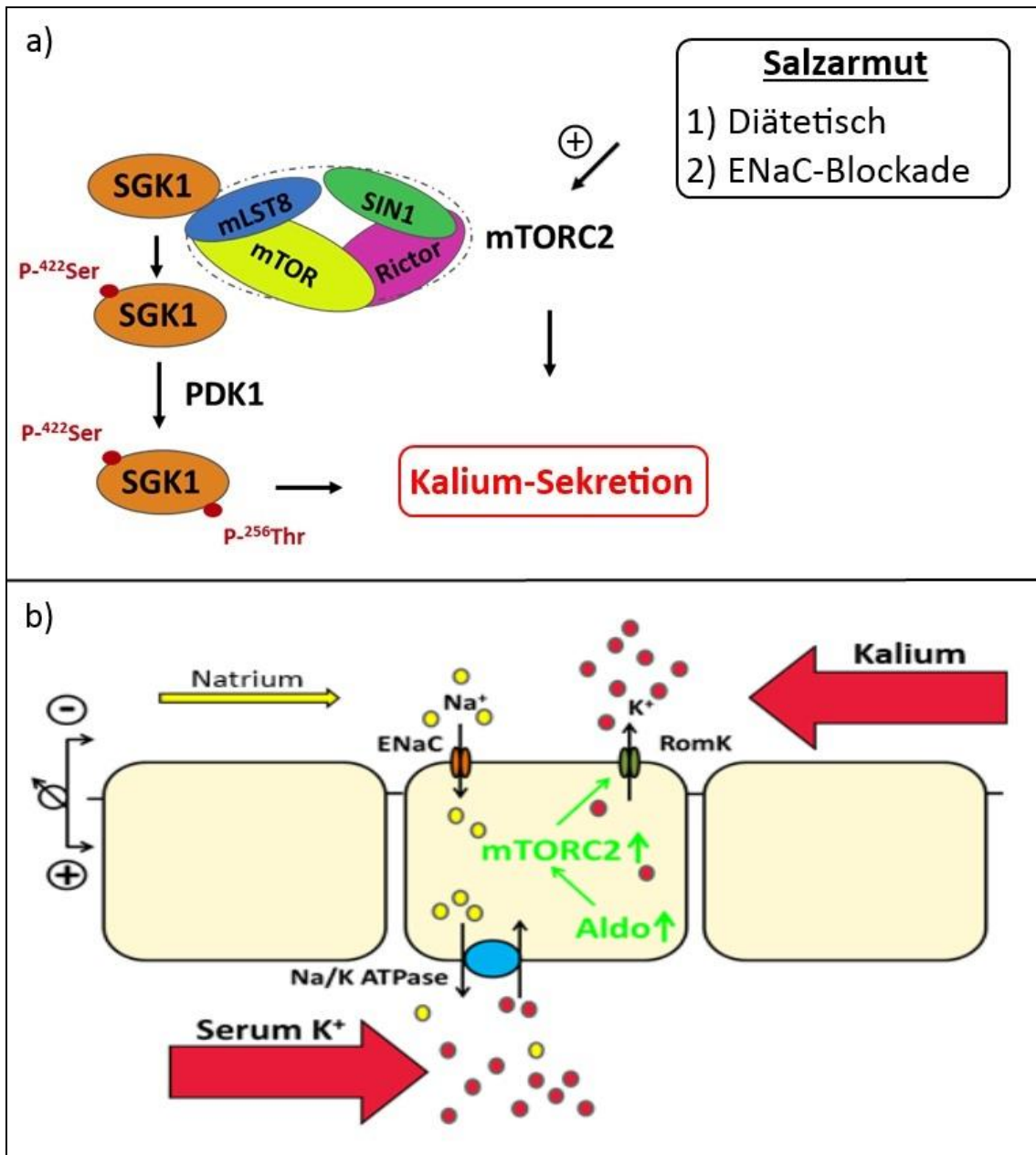
Die Ausschüttung von Aldosteron wird zum einen bei Volumenmangel mit dem Ziel einer gesteigerten Na<sup>+</sup>-Absorption und zum anderen bei Hyperkaliämie mit dem Ziel einer gesteigerten K<sup>+</sup>-Sekretion stimuliert (Arroyo, Ronzaud et al. 2011). Die Gabe einer Niedrigsalz/Normalkalium-Diät (LS/NK-Diät) ist der üblicherweise eingesetzte physiologische Test, um eine Einschränkung bei der aldosteron-abhängigen Na<sup>+</sup>-Absorption zu detektieren (Wulff, Vallon et al. 2002, Fejes-Toth, Frindt et al. 2008). Überraschenderweise und im Gegensatz zu Mäusen mit einer Deletion anderer aldosteronsensitiver Serin-/Threoninkinasen wie der SGK1 konnte bei den Rictor<sup>fl/fl\*</sup>KspCre-Tieren weder eine erhöhte Urin-Na<sup>+</sup>-Ausscheidung, noch ein eingeschränktes Wohlbefinden (Gewichtsverlust, Appetitmangel, Veränderung des Urinvolumens) festgestellt werden (Wulff,

Vallon et al. 2002, Fejes-Toth, Frindt et al. 2008, Faresse, Lagnaz et al. 2012). Dies weist möglicherweise auf drei verschiedene Szenarien hin: 1) der Verlust von mTORC2 schränkt die  $\text{Na}^+$ -Absorptionskapazität des aldosteronsensitiven distalen Nephrons nicht ein, 2) stromaufwärts gelegene Tubulusabschnitte sind in der Lage das distal-tubuläre Defizit zu kompensieren, oder 3) mTORC2 ist für die distal-tubuläre  $\text{K}^+$ -Sekretion von größerer Bedeutung als für die distal-tubuläre  $\text{Na}^+$ -Absorption (Castaneda-Bueno, Arroyo et al. 2012, Weinstein 2012). Wir richteten unser Augenmerk vor allem auf die zuletzt genannte Hypothese und behandelten die Tiere mit einer LS/HK-Diät.

Und tatsächlich konnte die vitale Bedeutung des mTORC2 für die  $\text{K}^+$ -Sekretion im aldosteronsensitiven distalen Nephron bei gleichzeitig niedriger  $\text{Na}^+$ -Zufuhr aufgezeigt werden. Während die Wildtyp-Mäuse die LS/HK-Diät gut tolerierten, entwickelten die  $\text{Rictor}^{\text{fl/fl}} \cdot \text{KspCre}$ -Mäuse innerhalb kurzer Zeit einen rapiden Gewichtsverlust, einen signifikanten  $\text{Na}^+$ -Verlust über den Urin, eine Hyperkaliämie sowie ein akutes prärenales Nierenversagen. Dieser beobachtete Phänotyp unterscheidet sich wesentlich von den bisherigen Knockout-Modellen des aldosteronsensitiven distalen Nephrons. Bei konstitutiven MR-Knockout-Mäusen steht der  $\text{Na}^+$ -Verlust über den Urin im Vordergrund, wobei die Hyperkaliämie und der Hyperaldosteronismus von geringer Bedeutung und kompensierbar zu sein scheinen (Berger, Bleich et al. 1998). Das konstitutive Ausschalten von  $\beta$ -ENaC führt zum perinatalen Versterben der Tiere bedingt durch den  $\text{Na}^+$ -Verlust und die Hyperkaliämie, was ein pseudohypoaldosteronismusähnliches Bild, ähnlich dem der MR-Knockout-Mäuse darstellt (McDonald, Yang et al. 1999). Das sammelrohrspezifische Ausschalten von  $\alpha$ -ENaC hingegen zeigt keine Anzeichen einer Beeinträchtigung bei der Regulation des  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Haushalts (Rubera, Loffing et al. 2003). Im Gesamtbild ähnelt der Rictor-Phänotyp ein Stück weit dem Phänotyp der konstitutiven und konditionalen SGK1-Knockout-Mäuse, obwohl diese bereits unter Niedrigsalz-Bedingungen (LS/NK-Diät) einen renalen  $\text{Na}^+$ -Verlust-Phänotyp zeigen (Wulff, Vallon et al. 2002, Fejes-Toth, Frindt et al. 2008, Faresse, Lagnaz et al. 2012). Unter NS/HK-Diät entwickelt die SGK1-Knockout-Maus

erhöhte Aldosteronwerte und eine signifikante Hyperkaliämie (Huang, Wulff et al. 2004) und unter Triamterengabe einen potentiell letalen Salzverlust-Phänotyp (Artunc et al., 2009). In der Zusammenschau der Befunde scheint der mTORC2 für die  $K^+$ -Sekretion bei gleichzeitig niedriger  $Na^+$ -Zufuhr im aldosteronsensitiven distalen Nephron von wesentlicher Bedeutung zu sein, jedoch weniger relevant für die  $Na^+$ -Absorption unter selbigen Bedingungen (Lu, Wang et al. 2010, Lu, Wang et al. 2011). Darüberhinaus wird diese These von jenen Effekten gestützt, welche bei Steigerung des  $Na^+$ -Gehalts der Diät zu beobachten sind. Zwar war unter NS/HK-Diät weiterhin eine Hyperkaliämie bei den  $Rictor^{fl/fl} \cdot KspCre$ -Tieren zu beobachten, jedoch führt eine sukzessive Steigerung des  $Na^+$ -Gehalts (HS/HK-Diät) zu einer Umkehrung des hyperkaliämischen Effekts und es zeigte sich ein kontinuierlich schwindendes Defizit bei der  $K^+$ -Sekretion.

Für das Funktionieren des spätdistalen  $Na^+/K^+$ -Austausches ist eine lumen-negative transepitheliale Membranpotential-Differenz notwendig, welche nur generiert werden kann, wenn ausreichend  $K^+$  für resorbiertes  $Na^+$  sezerniert wird (Abb. 38B). Die Daten zeigen auf, dass der Signalweg zur  $K^+$ -Sekretion durch mTORC2 aktiviert wird und bei Fehlen von mTORC2 die treibende Kraft zur Generierung der notwendigen lumen-negativen transepithelialen Membranpotential-Differenz schwindet. Es bedarf weiterer Untersuchungen um festzustellen, ob mTORC2 ein direkt durch Aldosteron regulierter Komplex ist oder andere stromaufwärts gelegene Signalwege beteiligt sind, welche mTORC2 hochregulieren und damit die  $K^+$ -Sekretion stimulieren.



**Abbildung 36: Die Rolle von mTORC2 unter salzarmen Konditionen**

a) Diese Darstellung verdeutlicht die essenzielle Bedeutung des mTORC2 für die  $K^+$ -Sekretion unter salzarmen Bedingungen und seine absolute Notwendigkeit für den ersten Phosphorylierungsschritt an der SGK1 (Garcia-Martinez and Alessi 2008), b) Hier wird die wesentliche Bedeutung des mTORC2 deutlich, dessen Aktivierung für die Aufrechterhaltung einer lumen-negativen transepithelialen Potentialdifferenz notwendig ist, um eine  $K^+$ -Sekretion auch bei natriumarmen Bedingungen zu ermöglichen.

Die Erkenntnisse aus den diätetischen Interventionen zeigten, dass mTORC2 für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Homöostase von wesentlicher Bedeutung ist. Daher sollten die beiden Genotypen bei Gabe ENaC-inhibierender Diuretika, wie z.B. Triamteren oder Amilorid, ebenfalls ein unterschiedliches Ansprechen bieten, die Gabe von weiter stromaufwärts wirkenden Diuretika, wie z.B. Furosemid oder Thiazid, hingegen keinen deutlichen Unterschied zwischen den Genotypen erkennen lassen. Und in der Tat waren die Erkenntnisse aus den diätetischen Interventionsexperimenten während der oralen Gabe (über das Trinkwasser) von Triamteren zu rekapitulieren. Hierbei entwickelten die  $\text{Rictor}^{\text{fl/fl}}\text{KspCre}$ -Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen einen dramatischen Gewichtsverlust, ein akutes Nierenversagen, eine Hyperkaliämie und trotz massiv erhöhter Aldosteronwerte einen erheblichen  $\text{Na}^+$ -Verlust über den Urin. Die Gabe von Furosemid und Thiazid führte bei den  $\text{Rictor}^{\text{fl/fl}}\text{KspCre}$ -Tieren zu erhöhten Serumharnstoff- und Serumaldosteronkonzentrationen, was möglicherweise auf die herabgesetzte Gegenregulationsfähigkeit bei diuretisch bedingtem Volumenverlust hindeutet. Diese Erkenntnisse erinnerten erneut an die konstitutiven SGK1-Knockout-Mäuse, welche ein ähnliches Verhalten zeigten (Artunc, Ebrahim et al. 2009). Während diese Experimente zum einen die Erkenntnisse aus den diätetischen Interventionen bekräftigen, weisen sie zum anderen auf die komplexen signalübertragenden Eigenschaften von mTORC2 unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen hin. Von den bekannten stromabwärts gelegenen Wirkorten von mTORC2 konnten wir unter Triamteren-Behandlung zwei, SGK1 und  $\text{PKC}\alpha$ , im Sammelrohr der Nieren detektieren (Garcia-Martinez and Alessi 2008, Ikenoue, Inoki et al. 2008, Lu, Wang et al. 2010). Wie erwartet war im distalen Tubulus der  $\text{Rictor}^{\text{fl/fl}}\text{KspCre}$ -Tiere die HM-Phosphorylierung dieser beiden nahezu nicht vorhanden (Kooperations-Arbeitsgruppe, Dr. Florian Grahammer, Universität Freiburg). Das offensichtliche Fehlen von stromabwärts liegenden Effekten (v. a. Kaliurese) weist auf die entscheidende Bedeutung der HM-Phosphorylierung für die Bindung und nachfolgende Phosphorylierung der Kinase durch PDK1 hin und unterstreicht die Erkenntnisse der vorliegenden in-vitro-Daten bezüglich dieser Signalkaskade (Lu, Wang et al. 2010).

In der Zusammenschau zeigt diese Arbeit, dass mTORC2 eine vitale Rolle für die Ermöglichung der K<sup>+</sup>-Sekretion unter Na<sup>+</sup>-armen Bedingungen durch die Phosphorylierung seiner stromabwärts gelegenen Substrate SGK1 und PKC $\alpha$  zu spielen scheint. Dieser Effekt spielt bei bestimmten diätetischen Konstellationen oder beim klinischen Gebrauch von ENaC-inhibierenden Diuretika eine herausragende Rolle. Ferner muss diese Wirkung bei der Entwicklung von Inhibitoren von mTORC2 zur antitumoralen Therapie berücksichtigt werden.



### 5. Zusammenfassung

Der mTOR-Signalweg spielt eine grundlegende Rolle bei der Regulation von zellulären Homöostasemechanismen. Die bisher vorliegenden Daten beziehen sich in erster Linie auf den mTORC1, während der mTORC2 und im Speziellen seine nierenspezifische in-vivo-Funktion relativ unerforscht ist. In-vitro-Experimente mit immortalisierten Nierenepithelzellen deuteten auf eine Beteiligung von mTORC2 bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals ENaC durch Phosphorylierung der SGK1 hin. Um die in-vivo-Relevanz dieser in-vitro-Befunde zu erforschen, generierten wir mTORC2-Knockout-Mäuse, bei denen dieser Komplex durch Entfernung des Rictor-Gens im distalen Tubulus der Niere ausgeschaltet wurde. Diese Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Mäuse (mTORC2-Knockout) waren lebensfähig und zeigten unter Kontrollbedingungen keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Bei Gabe einer Niedrigsalz/Normalkalium-Diät waren die Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre -Tiere wie auch die Wildtyp-Tiere, in der Lage ihre Na<sup>+</sup>-Ausscheidung über den Urin adäquat zu drosseln, während die Gabe einer NS/HK-Diät zu einer moderaten Hyperkaliämie bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre -Tieren führte. Die Behandlung mit einer Niedrigsalz/Hochkalium-Diät führte bei den mTORC2-Knockout-Mäusen zu einem fulminantem Gewichtsverlust, einer Hyperkaliämie und einem akuten Nierenversagen innerhalb von vier Tagen. Derselbe Phänotyp konnte nach kontinuierlicher Behandlung mit dem ENaC-Blocker Triamteren beobachtet werden. Immunfluoreszenzmikroskopisch konnte bei den Rictor<sup>fl/fl</sup>\*KspCre-Tieren eine nicht vorhandene Phosphorylierung der SGK1 (an Ser<sup>422</sup>), PKC $\alpha$  (an Thr<sup>657</sup>) und Akt (Ser<sup>493</sup>) nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse bestätigen die lebensnotwendige Rolle von mTORC2 bei der aldosteronvermittelten, distal-tubulären Regulation des Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Haushalts unter klinisch relevanten Bedingungen. Hierbei spielt mTORC2 eine entscheidende Rolle bei der K<sup>+</sup>-Sekretion unter salzarmen bzw. Salzverlust-Bedingungen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht des Nephrons und seiner Abschnitte .....	5
Abbildung 2: Übersicht der Transportprozesse im proximalen Tubulus .....	6
Abbildung 3: Übersicht der Transportprozesse in der TAL .....	7
Abbildung 4: SGK1-abhängige Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Regulation in der aldosteronsensitiven Hauptzelle.....	9
Abbildung 5: Regulationsmechanismen bei Hypovolämie und Hyperkaliämie .	11
Abbildung 6: mTOR als Komponente von mTORC1 und mTORC2 .....	13
Abbildung 7: mTORC2-abhängige Phosphorylierung der SGK1 .....	15
Abbildung 8: Metabolischer Käfig .....	20
Abbildung 9: Flammenphotometer, EFUX 5057 .....	25
Abbildung 10: Körpergewicht unter diätetischen Interventionen.....	32
Abbildung 11: Körpergewichtsänderung unter diätetischen Interventionen .....	33
Abbildung 12: Fressmenge unter diätetischen Interventionen.....	34
Abbildung 13: Trinkmenge unter diätetischen Interventionen.....	35
Abbildung 14: Urinmenge unter diätetischen Interventionen .....	36
Abbildung 15: Serumharnstoff unter diätetischen Interventionen .....	37
Abbildung 16: Serumnatrium unter diätetischen Interventionen .....	38
Abbildung 17: Serumkalium unter diätetischen Interventionen.....	39
Abbildung 18: Serumaldosteron unter diätetischen Interventionen .....	40
Abbildung 19: Urinnatrium unter diätetischen Interventionen .....	41
Abbildung 20: Urinkalium unter diätetischen Interventionen.....	42
Abbildung 21: Systolischer Blutdruck unter diätetischen Interventionen .....	43
Abbildung 22: Diuretikadosis .....	45
Abbildung 23: Körpergewichtsänderung unter diuretischen Interventionen.....	46
Abbildung 24: Fressmenge unter diuretischen Interventionen .....	47
Abbildung 25: Trinkmenge unter diuretischen Interventionen .....	48
Abbildung 26: Urinmenge unter diuretischen Interventionen.....	49
Abbildung 27: Serumharnstoff unter diuretischen Interventionen .....	50
Abbildung 28: Serumnatrium unter diuretischen Interventionen.....	51

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 29: Serumkalium unter diuretischen Interventionen.....	52
Abbildung 30: Serumaldosteron unter diuretischen Interventionen .....	53
Abbildung 31: Urinnatrium an Tag 1 unter diuretischen Interventionen .....	54
Abbildung 32: Urinnatrium an Tag 2-5 unter diuretischen Interventionen.....	55
Abbildung 33: Urinkalium an Tag 1 unter diuretischen Interventionen .....	56
Abbildung 34: Urinkalium an Tag 2-5 unter diuretischen Interventionen .....	57
Abbildung 35: Systolischer Blutdruck unter diuretischer Intervention .....	58
Abbildung 36: Die Rolle von mTORC2 unter salzarmen Konditionen.....	63

---

## Literaturverzeichnis

- AbdAlla, S., H. Lothar, A. M. Abdel-tawab and U. Quitterer (2001). "The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist." J Biol Chem **276**(43): 39721-39726.
- Abriel, H. and O. Staub (2005). "Ubiquitylation of ion channels." Physiology (Bethesda) **20**: 398-407.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen and B. A. Hemmings (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." EMBO J **15**(23): 6541-6551.
- Arroyo, J. P., C. Ronzaud, D. Lagnaz, O. Staub and G. Gamba (2011). "Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron." Physiology (Bethesda) **26**(2): 115-123.
- Artunc, F., A. Ebrahim, B. Siraskar, O. Nasir, R. Rexhepaj, K. Amann, B. Friedrich, T. Risler and F. Lang (2009). "Responses to diuretic treatment in gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1." Kidney Blood Press Res **32**(2): 119-127.
- Belibi, F. A. and C. L. Edelstein (2010). "Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease." Expert Opin Investig Drugs **19**(3): 315-328.
- Bentzinger, C. F., K. Romanino, D. Cloetta, S. Lin, J. B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C. F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M. N. Hall and M. A. Ruegg (2008). "Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy." Cell Metab **8**(5): 411-424.
- Berger, S., M. Bleich, W. Schmid, T. J. Cole, J. Peters, H. Watanabe, W. Kriz, R. Warth, R. Greger and G. Schutz (1998). "Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9424-9429.
- Bhalla, V., D. Daidie, H. Li, A. C. Pao, L. P. LaGrange, J. Wang, A. Vandewalle, J. D. Stockand, O. Staub and D. Pearce (2005). "Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3." Mol Endocrinol **19**(12): 3073-3084.

---

Castaneda-Bueno, M., J. P. Arroyo and G. Gamba (2012). "Independent regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> balance by the kidney." Med Princ Pract **21**(2): 101-114.

Corvol, P., A. Michaud, F. Soubrier and T. A. Williams (1995). "Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme." J Hypertens Suppl **13**(3): S3-10.

Faresse, N., D. Lagnaz, A. Debonneville, A. Ismailji, M. Maillard, G. Fejes-Toth, A. Naray-Fejes-Toth and O. Staub (2012). "Inducible kidney-specific Sgk1 knockout mice show a salt-losing phenotype." Am J Physiol Renal Physiol **302**(8): F977-985.

Fejes-Toth, G., G. Frindt, A. Naray-Fejes-Toth and L. G. Palmer (2008). "Epithelial Na<sup>+</sup> channel activation and processing in mice lacking SGK1." Am J Physiol Renal Physiol **294**(6): F1298-1305.

Fingar, D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou and J. Blenis (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." Mol Cell Biol **24**(1): 200-216.

Garcia-Martinez, J. M. and D. R. Alessi (2008). "mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)." Biochem J **416**(3): 375-385.

Greger, R. (2000). "Physiology of renal sodium transport." Am J Med Sci **319**(1): 51-62.

Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." Dev Cell **11**(6): 859-871.

Hagiwara, A., M. Cornu, N. Cybulski, P. Polak, C. Betz, F. Trapani, L. Terracciano, M. H. Heim, M. A. Ruegg and M. N. Hall (2012). "Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c." Cell Metab **15**(5): 725-738.

Hall, J. E. (2003). "Historical perspective of the renin-angiotensin system." Mol Biotechnol **24**(1): 27-39.

---

Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.

Huang, D. Y., P. Wulff, H. Volkl, J. Loffing, K. Richter, D. Kuhl, F. Lang and V. Vallon (2004). "Impaired regulation of renal K<sup>+</sup> elimination in the sgk1-knockout mouse." J Am Soc Nephrol **15**(4): 885-891.

Huang, J. and B. D. Manning (2009). "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 217-222.

Ikenoue, T., K. Inoki, Q. Yang, X. Zhou and K. L. Guan (2008). "Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling." EMBO J **27**(14): 1919-1931.

Iwai, N. and T. Inagami (1992). "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor." FEBS Lett **298**(2-3): 257-260.

Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." Nat Cell Biol **6**(11): 1122-1128.

Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-175.

Kumar, A., T. E. Harris, S. R. Keller, K. M. Choi, M. A. Magnuson and J. C. Lawrence, Jr. (2008). "Muscle-specific deletion of rictor impairs insulin-stimulated glucose transport and enhances Basal glycogen synthase activity." Mol Cell Biol **28**(1): 61-70.

Kumar, A., J. C. Lawrence, Jr., D. Y. Jung, H. J. Ko, S. R. Keller, J. K. Kim, M. A. Magnuson and T. E. Harris (2010). "Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism." Diabetes **59**(6): 1397-1406.

Lamming, D. W., L. Ye, P. Katajisto, M. D. Goncalves, M. Saitoh, D. M. Stevens, J. G. Davis, A. B. Salmon, A. Richardson, R. S. Ahima, D. A. Guertin, D. M. Sabatini and J. A. Baur (2012). "Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity." Science **335**(6076): 1638-1643.

---

Lang, F., C. Bohmer, M. Palmada, G. Seebohm, N. Strutz-Seebohm and V. Vallon (2006). "(Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms." Physiol Rev **86**(4): 1151-1178.

Li, H., J. Lin, X. Wang, G. Yao, L. Wang, H. Zheng, C. Yang, C. Jia, A. Liu and X. Bai (2012). "Targeting of mTORC2 prevents cell migration and promotes apoptosis in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **134**(3): 1057-1066.

Lieberthal, W. and J. S. Levine (2009). "The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease." J Am Soc Nephrol **20**(12): 2493-2502.

Lu, M., J. Wang, H. E. Ives and D. Pearce (2011). "mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel." J Biol Chem **286**(35): 30647-30654.

Lu, M., J. Wang, K. T. Jones, H. E. Ives, M. E. Feldman, L. J. Yao, K. M. Shokat, K. Ashrafi and D. Pearce (2010). "mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1." J Am Soc Nephrol **21**(5): 811-818.

McDonald, F. J., B. Yang, R. F. Hrstka, H. A. Drummond, D. E. Tarr, P. B. McCray, Jr., J. B. Stokes, M. J. Welsh and R. A. Williamson (1999). "Disruption of the beta subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1727-1731.

Oh, W. J. and E. Jacinto (2011). "mTOR complex 2 signaling and functions." Cell Cycle **10**(14): 2305-2316.

Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." Physiol Rev **86**(3): 747-803.

Paulsen, F. and R. Lüllmann-Rauch (2012). Taschenlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Persson, P. B., A. Skälweit and B. J. Thiele (2004). "Controlling the release and production of renin." Acta Physiol Scand **181**(4): 375-381.

Rubera, I., J. Loffing, L. G. Palmer, G. Frindt, N. Fowler-Jaeger, D. Sauter, T. Carroll, A. McMahon, E. Hummler and B. C. Rossier (2003). "Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance." J Clin Invest **112**(4): 554-565.

---

Sauer, B. (1998). "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system." Methods **14**(4): 381-392.

Schmidt, R. and F. Lang (2007). Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 30. neu bearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio.

Sehgal, S. N. (2003). "Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action." Transplant Proc **35**(3 Suppl): 7S-14S.

Seva Pessoa, B., N. van der Lubbe, K. Verdonk, A. J. Roks, E. J. Hoorn and A. H. Danser (2013). "Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition." Nat Rev Nephrol **9**(1): 26-36.

Shao, X., S. Somlo and P. Igarashi (2002). "Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract." J Am Soc Nephrol **13**(7): 1837-1846.

Weinstein, A. M. (2012). "Potassium excretion during antinatriuresis: perspective from a distal nephron model." Am J Physiol Renal Physiol **302**(6): F658-673.

Willems, L., N. Chapuis, A. Puissant, T. T. Maciel, A. S. Green, N. Jacque, C. Vignon, S. Park, S. Guichard, O. Herault, A. Fricot, O. Hermine, I. C. Moura, P. Auberger, N. Ifrah, F. Dreyfus, D. Bonnet, C. Lacombe, P. Mayeux, D. Bouscary and J. Tamburini (2012). "The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia." Leukemia **26**(6): 1195-1202.

Wulff, P., V. Vallon, D. Y. Huang, H. Volkl, F. Yu, K. Richter, M. Jansen, M. Schlunz, K. Klingel, J. Loffing, G. Kauselmann, M. R. Bosl, F. Lang and D. Kuhl (2002). "Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse." J Clin Invest **110**(9): 1263-1268.

Wullschleger, S., R. Loewith and M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Yan, L., V. Mieulet and R. F. Lamb (2008). "mTORC2 is the hydrophobic motif kinase for SGK1." Biochem J **416**(3): e19-21.

Zeng, Z., Y. X. Shi, T. Tsao, Y. Qiu, S. M. Kornblau, K. A. Baggerly, W. Liu, K. Jessen, Y. Liu, H. Kantarjian, C. Rommel, D. A. Fruman, M. Andreeff and M. Konopleva (2012). "Targeting of mTORC1/2 by the mTOR kinase inhibitor PP242 induces apoptosis in AML cells under conditions mimicking the bone marrow microenvironment." Blood **120**(13): 2679-2689.