

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. H. Ehmke

Einfluss des Kalium- und Säure-Basen-Haushaltes auf den Blutdruck

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Philine Sophie Böttcher

aus Hamburg

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
12.09.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Elke Oetjen

1	Einleitung	5
1.1	Einführung	5
1.2	Die Niere	8
1.3	Hormonelle Regulation der renalen Blutdruckeinstellung	8
1.4	Hyperkaliämie und Hypovolämie und das Aldosteron-Paradoxon	10
1.5	Die NaCl-Resorption und die Rolle der Schaltzellen	11
1.6	Pendrin - ein mögliches Verbindungsglied zwischen Säure-Basen-Haushalt und Blutdruckregulation	13
1.7	NaDC1	14
1.8	Basenstärke der gegebenen Anionen	15
1.9	Fragestellung	15
2	Methoden	17
2.1	Versuchstiere	17
2.2	Diätfutter	17
2.3	Blutdruckmessung mittels Sender	17
2.4	Training der Mäuse und Entnahme von Organen	18
2.5	Isolierung der RNA	18
2.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	19
2.7	Quantifizierung und Qualitätsbeurteilung der RNA durch den Agilent 2000 Bioanalysator	20
2.8	Reverse Transkription	20
2.9	Herstellung einer Standardreihe für die Real Time PCR	21
2.10	Real Time PCR / quantitative Echtzeit PCR	21
2.11	Primer für die Real Time PCR	22
2.12	Radioimmunoassay zur Renin- und Aldosteronquantifizierung	24
2.13	Bestimmung des pH-Wertes des Urins	24
2.14	Statistik	25
3	Material	26
3.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	26
3.2	Lösungen	26
3.3	Verbrauchsmaterialien	27
3.4	Geräte	28
3.5	Software	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Blutdruck	30
4.1.1	Mittel-arterieller Druck (MAP)	30
4.1.2	Herzfrequenz (HF)	32
4.2	Renin und Aldosteron	34

4.3	Urin pH	36
4.4	Expression auf mRNA-Ebene	37
4.4.1	NaDC1	37
4.4.2	NCC	38
4.4.3	α -ENaC	38
4.4.4	β -ENaC	39
4.4.5	ROMK	39
4.4.6	Sgk1	40
4.4.7	KS-WNK1	40
4.4.8	WNK4	41
4.4.9	Pendrin	42
4.4.10	NDCBE	43
4.4.11	AE-4	43
4.4.12	Verhältnis Pendrin zu NDCBE	44
4.4.13	Verhältnis Pendrin zu AE-4	45
4.4.14	Übersicht über die Veränderungen der Transporter und Kinasen	46
5	Diskussion	47
5.1	Blutdruck	47
5.2	Herzfrequenz.....	48
5.3	Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma	48
5.3.1	Aldosteronkonzentration	48
5.3.2	Reninaktivität	49
5.4	Urin pH	50
5.5	Expression auf mRNA-Ebene im proximalen Tubulus	50
5.5.1	NaDC1	50
5.6	Expression auf mRNA-Ebene im distalen Tubulus	51
5.6.1	Hauptzellen	51
5.6.2	β -Schaltzellen	52
6	Zusammenfassung und Ausblick	55
6.1	Zusammenfassung.....	55
6.2	Ausblick	56
7	Abkürzungsverzeichnis	57
8	Literaturverzeichnis	60
9	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse in deutscher und englischer Sprache	67
10	Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen...	68
11	Lebenslauf	69
12	Danksagung.....	70
13	Eidesstattliche Versicherung	71

1 Einleitung

1.1 Einführung

Bluthochdruck ist ein globales Problem und belastet das Gesundheitssystem enorm. Von den geschätzten 57 Millionen weltweiten Toten in 2008 werden von der World Health Organisation WHO 63% den „non-communicable diseases“ zugeschrieben. Diese sind Erkrankungen, die nicht infektiös und nicht von Mensch zu Mensch übertragbar sind. Da vor allem die Bevölkerung der einkommensstarken Länder immer seltener an infektiösen Krankheiten erkrankt, bzw. daran verstirbt und immer älter wird, steigt die Zahl der „non-communicable diseases“ und der chronischen Erkrankungen stetig an. Davon ist der größte Anteil mit 48% durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht. Unter anderem ungesunde Diät, Alkohol- sowie Nikotinkonsum und körperliche Inaktivität sollen ursächlich für 80% der koronaren Herzerkrankungen und cerebrovaskulären Erkrankungen sein. Ein hoher Blutdruck (Hypertonus bzw. Hypertension) ist dabei der wichtigste Risikofaktor. 51% der weltweiten Schlaganfälle und 45% der Toten durch ischämische Herzerkrankungen sind hohen systolischen Blutdrücken geschuldet (WHO, Global Health Risk 2009 und World Health Statistics 2012).

Von einer Hypertonie spricht man ab systolischen Werten von 140 mmHg und diastolischen Werten von 90 mmHg (Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie der Deutschen Hochdruckliga, 2013). Laut WHO litten im Jahre 2008 in Deutschland 31% der Männer und 27% der Frauen über 25 Jahren darunter (WHO, World Health Statistics 2013). Der Bluthochdruck kann anhand der Ätiologie in primären und sekundären Hypertonus eingeteilt werden. Primäre Hypertonie bzw. essentielle Hypertonie liegt vor, wenn keine zugrundeliegende Ursache, wie z.B. Medikamenteneinnahme, endokrine Funktionsstörungen oder Nierenerkrankungen, gefunden werden kann. Die primäre Hypertonie wird bei circa 80-90% der Bluthochdruckerkrankten als ursächlich angesehen. Die sekundäre Hypertonie tritt als Folge einer Grunderkrankung, wie z.B. einer Glomerulonephritis mit Nierenschädigung oder einer Nierenarterienstenose, auf. Kann der erhöhte Blutdruck durch die regelmäßige Einnahme von drei oder mehr unterschiedlichen antihypertensiven Medikamenten, von denen eines ein Diuretikum ist, nicht adäquat kontrolliert werden, liegt ein resistenter Hypertonus vor (Calhoun, et al. 2008). Dies ist bei ungefähr 10% der Hypertoniker der Fall (Bhatt, et al. 2014). Neben der Höhe des systolischen und diastolischen Druckes, sind auch zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren und mögliche Endorganschäden bei der Einschätzung des Schweregrades des Bluthochdruckes zu berücksichtigen. Schäden der Endorgane sind laut WHO die linksventrikuläre Hypertrophie, Retinopathien und Proteinurie, sowie zerebrale Komplikationen, Niereninsuffizienz und Plaque-Bildung in den Gefäßen (Whitworth 2003). Erhöhter Blutdruck kann die Struktur der Blutgefäße verändern,

wodurch unter anderem die Wahrscheinlichkeit für Herzerkrankungen, Schlaganfälle und Nierenversagen steigt. Patienten mit resistenter Hypertonie haben, für die zuvor genannten Erkrankungen, ein erhöhtes Risiko gegenüber behandelbaren Hypertonikern (de la Sierra, et al. 2011; Egan, et al. 2011).

Die Ursachen für die steigende Prävalenz von Hypertonus in unserer Gesellschaft sind vielfältig. So werden z.B. die Zunahme der Aktivität des sympathischen Nervensystems durch vermehrten Stress, sowie genetische und umweltbedingte Einflüsse, wie z.B. körperliche Inaktivität und Ernährung als mögliche Risikofaktoren diskutiert. Da die Ernährung beeinflussbar ist, stellt sie eine gute Möglichkeit für Prävention und Intervention dar (Appel, et al. 2006). Unsere Ernährungsweise hat sich in den letzten Jahrtausenden von einer gemüse- und obstreichen zu einer fleisch- und proteinreichen Diät verändert. Damit geht die vermehrte Aufnahme von Kochsalz (NaCl), vor allem durch Fertigprodukte und die verminderte Aufnahme von Kalium (K^+), welches in frischem Obst und Gemüse vorhanden ist, einher. Ein chronisch erhöhter Konsum von Kochsalz (NaCl) kann zu Bluthochdruck führen, da die Niere das zugeführte Salz möglicherweise nicht in ausreichendem Maße ausscheiden kann (Morris, et al. 1999; Pierre Meneton 2005). Dieser Zusammenhang erklärt sich folgendermaßen: Zum einen macht eine vermehrte NaCl-Aufnahme eine vermehrte Wasser-Aufnahme erforderlich, um die Konzentration an Natrium (Na^+) im Organismus bei oder um 140 mM zu halten (Lifton, et al. 2001). Zum anderen wird Natrium bei erhöhtem NaCl-Konsum vermehrt aus dem Tubuluslumen in das Interstitium der Niere transportiert. Aus osmotischen Gründen folgt dieser Verschiebung der Einstrom von Wasser, wobei weitere Elektrolyte wie z.B. Chlorid mitgezogen werden (solvent drag). In beiden Fällen wird das intravasale Volumen und somit der Blutdruck erhöht. Na^+ ist also ein wichtiger Regulator des intravasalen Volumens und entscheidend für die Blutdruckeinstellung, da durch eine erhöhte Rückresorption des Na^+ aus dem Lumen in das Interstitium Flüssigkeit gespart bzw. durch eine verminderte Na^+ -Rückresorption eine erhöhte Wasserausscheidung über den Urin erreicht werden kann. Dieser Zusammenhang wird seit Anfang des 20. Jahrhunderts untersucht und diskutiert und konnte in vielen Studien sowohl am Menschen als auch am Tier nachgewiesen werden (Bray, et al. 2004; Corbett, et al. 1979; Dahl 2005; Dahl and Tuthill 1974; Svetkey, et al. 2004). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nicht jedes Individuum im gleichen Maße auf eine erhöhte Kochsalzzufuhr reagiert, weshalb davon ausgegangen wird, dass einige Individuen salzsensitiver als andere sind (Luft, et al. 1991; Weinberger, et al. 1986). Resistente Hypertoniker und Afroamerikaner scheinen von einer Limitierung der NaCl-Zufuhr besonders zu profitieren (Calhoun 2013; Muxfeldt, et al. 2012). Generell kann eine NaCl-arme und K^+ -reiche Diät der Entstehung eines Hypertonus bei normotensiven Personen vorbeugen und eine medikamentöse Behandlung bei geringem Hypertonus (systolischer RR 140-159 mmHg; diastolischer RR 90-95 mmHg) möglicherweise ersetzen bzw. diese hinauszögern (Appel, et al. 2006). Daher empfehlen staatliche Einrichtungen und Ernährungsexperten sich an der sogenannten „DASH-Diet“ (Dietary Approaches to Stop Hypertension) zu orientieren. Diese Art der Ernährung beinhaltet einen hohen Gehalt an K^+ , Magnesium, Calcium und Ballaststoffen bei gleichzeitig geringem Anteil an Fett

und Cholesterin. Die tägliche NaCl-Zufuhr wird dabei auf 2300 mg begrenzt. Die Empfehlung ist daher, fettreduzierte Milchprodukte, mageres Fleisch/Fisch und vermehrt Gemüse und Obst zu konsumieren (Kwan, et al. 2013). Das durch Obst und Gemüse aufgenommene K^+ scheint eine protektive Wirkung auf den durch vermehrte NaCl-Aufnahme verursachten Blutdruckanstieg zu haben. So konnte ein Team um Morris bei Menschen zeigen, dass eine erhöhte K^+ -Zufuhr den blutdrucksteigernden Effekt einer hoch-Kochsalz-Diät minimieren kann (Morris, et al. 1999). Vitzthum et al. konnten bei Mäusen zeigen, dass eine hohe NaCl-Diät (3%) in Kombination mit einer geringen K^+ -Zufuhr (0.03%) zu einem Blutdruckanstieg führte, wohingegen die gleiche Diät in Kombination mit einer moderaten K^+ -Gabe (0.93%) keinen signifikanten Anstieg im Blutdruck verursachte. Jedoch konnten Vitzthum et al. auch zeigen, dass eine stark erhöhte K^+ -Zufuhr (5%) in Verbindung mit einer hoch-NaCl-Diät (3%) zu einem erneuten Anstieg des Blutdruckes bei Mäusen führte (Vitzthum, et al. 2014). Auch Manger et al. belegten, dass eine moderate K^+ -Zufuhr (2.6% KCl) bei 1%iger NaCl-Diät Bluthochdruck sowie hämodynamische Veränderungen am zerebralen und renalen Gefäßsystem bei Dahl Salz-sensitiven sowie Salz-resistenten Ratten unterbinden kann. Dieser protektive Effekt verschwindet sowohl bei niedriger (0.7% KCl) als auch bei hoher (4% und 8% KCl) K^+ -Zufuhr (Manger, et al. 2003). Möglicherweise gibt es also einen optimalen Bereich der diätischen K^+ -Aufnahme.

Ein Zusammenhang zwischen der Niere und Hypertension kann anhand von Mutationen einiger Transporter der Niere verdeutlicht werden. Es konnten mehrere mutierte Gene sowohl für die Entstehung von vererbbarer Hypertension als auch für die Entstehung von vererbbarer Hypotension gefunden werden. Diese genetischen Funktionsstörungen vermitteln ihre Effekte über eine Veränderung der Salz-Resorption in der Niere (Lifton, et al. 2001) und haben weitreichende Folgen auf die Elektrolyt- und Blutdruckregulation. Dies zeigt sich z.B. im Krankheitsbild des Liddle-Syndroms, bei dem die Mutation zu einer Funktionssteigerung des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) und so zu vermehrter Resorption von Kochsalz führt. Die Symptome sind im Kindesalter beginnende Hypertension, welche durch vermehrte NaCl-Zufuhr verstärkt wird, sowie Hypokaliämie und metabolische Alkalose (Abriel, et al. 1999; Pradervand, et al. 1999; Rossier and Schild 2008). Die Renin-Aktivität ist dabei supprimiert und die Aldosteron-Plasma-Spiegel sind erniedrigt (Lifton, et al. 2001). Eine weitere genetisch vererbte Erkrankung ist das Gittelman-Syndrom, bei dem eine Mutation des Natrium-Chlorid-Cotransporters NCC vorliegt und dessen Funktion unterbindet. Dies führt zu Verlust von K^+ , Magnesium, Calcium und zu metabolischer Alkalose. Der Blutdruck ist meistens erniedrigt (Knoers and Levtchenko 2008). Neben den genetischen Erkrankungen zeigen auch die folgenden Experimente die Bedeutung der Niere für die Blutdruckregulation. So konnten Curtis et al. zeigen, dass sechs Patienten mit „essentieller Hypertonie“ nach Transplantation einer Niere eines normotensiven Spenders keine erhöhten Blutdrücke mehr aufwiesen. Auch die körperlichen Reaktionen auf vermehrte oder verminderte Kochsalzzufuhr unterschieden sich nicht mehr von denen der Normalbevölkerung (Curtis, et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass bei einigen sogenannten essentiellen Hypertonikern doch möglicherweise eine organische Ursache gefunden

werden kann, da die Niere einen erheblichen Einfluss auf den Blutdruck der Patienten zu haben schien. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Niere ein wichtiges Element in der Entstehung von Hypertension und dessen Folgeerkrankungen ist.

1.2 Die Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, welches neben der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und der Hormonproduktion auch an der Regulation des Elektrolyt- und Basenhaushaltes beteiligt ist. Des Weiteren ist die Niere ein wichtiges Element der Bilanzierung des Flüssigkeitshaushalts des Organismus. Die Niere lässt sich in Mark und Rinde einteilen. Ihre Funktionseinheit ist das Nephron, bestehend aus dem Glomerulum und dem Tubulussystem. Das Tubulussystem kann weiter in 3 Abschnitte eingeteilt werden: den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus. Definitionsgemäß umfasst der distale Tubulus den Bereich hinter der Macula densa bis einschließlich des ersten Zusammenflusses eines weiteren Nephrons zum gemeinsamen corticalen Sammel tubulus. Er reabsorbiert 5-10% des filtrierten Natriums und Chlorids und ist besonders wichtig für die Kalium-Sekretion (Reilly and Ellison 2000). Das distale Nephron setzt sich aus 4 anatomischen Subsegmenten zusammen: einem kurzen Teil der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL), dem distalen konvoluten Tubulus (DCT) (weiter unterteilbar in den frühen (DCT1) sowie späten (DCT2) DCT), dem Verbindungstubulus (CNT) sowie dem Anfang des kortikalen Sammelrohrs (CCD). Jedes Segment exprimiert unterschiedliche Transporter, was die hohe Spezifität der einzelnen Segmente bedingt.

Der späte DCT, der CNT und das CCD werden unter dem Begriff des „Aldosteron sensitiven distalen Nephrons“ (ASDN) zusammengefasst, da das Hormon Aldosteron hier seine Wirkung entfaltet. Im ASDN finden sich hauptsächlich zwei Zelltypen: die Hauptzellen sowie die Schaltzellen (Chambrey and Trepiccione 2015). Hier erfolgt die Feineinstellung der Elektrolyte, des Säure-Basen-Haushalts, der Salze und des Wassers, weshalb das ASDN von besonderer Bedeutung für die Blutdruckeinstellung ist (Eladari and Hübner 2011).

1.3 Hormonelle Regulation der renalen Blutdruckeinstellung

Die Höhe des Druckes auf die Gefäßwand (Blutdruck) wird durch das intravasale Volumen (Volumen im Gefäßsystem), durch die Pumpleistung und somit dem Auswurf des Herzens sowie durch die Höhe des Gefäßtonus bedingt.

Die Niere reguliert die langfristige Einstellung des Blutdrucks, da sie den Flüssigkeitshaushalt und somit das intravasale Volumen moduliert. Dabei spielen insbesondere die Hormone Adiuretin (ADH) und Angiotensin II bzw. Aldosteron, welche vor allem im distalen Tubulus wirken, eine Rolle. Die Ausschüttung dieser Hormone wird maßgeblich

durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert, welches daher besonders wichtig für die Blutdruckregulation ist.

Sinkt der an den Barorezeptoren gemessene Druck in dem Vas afferens des Glomerulums, wird dort das proteolytisch wirkende Hormon Renin aus den Mediazellen freigesetzt. Auch ein Mangel an Kochsalz (NaCl) oder die Aktivierung sympathischer Nervenfasern kann eine Freisetzung bewirken (Kurtz 2012). Renin spaltet vom Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet wird, Angiotensin I ab. Dieses wird mit Hilfe des Angiotensin Converting Enzym's (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt, welches nun zu einer Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde sowie der Freisetzung von ADH aus der Neurohypophyse führt. ADH steigert die NaCl-Absorption und somit die Wasserresorption im TAL. Dies erfolgt möglicherweise über den Einbau des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter NKCC2 in die apikale Zellmembran der Tubuluszellen, sowie über die Steigerung der Menge des NCC (Gamba 2005; Pedersen, et al. 2010). Daher führt im Umkehrschluss eine Zunahme des intravasalen Volumens zu einer verminderten Ausschüttung des ADH's in der Neurohypophyse (Gauer-Henry-Reflex), was zu einer vermehrten Flüssigkeitsausscheidung durch die Niere führt und so der Erhöhung des Blutdruckes entgegen wirkt. Die besondere Bedeutung dieses Systems zeigt sich in dem Krankheitsbild des Diabetes insipidus renalis, bei dem ein gestörtes Ansprechen der ADH-Rezeptoren in der Niere zu einer massiven Diurese mit Flüssigkeitsverlusten von bis zu 25 Liter pro Tag führen kann (Moeller, et al. 2013). Hypotonie und Dehydratation bei gleichzeitig hohem Natrium-Gehalt im Blut können die Folge sein.

Angiotensin II kann direkt oder über Aldosteron den Einbau epithelialer Na^+ -Kanäle (ENaC) in den Nierentubuli erhöhen und somit die Resorption von Na^+ und sekundär die Wasserresorption fördern. Dadurch erhöht sich das intravasale Volumen und der Blutdruck steigt an (Zaika, et al. 2013). Anhand des Krankheitsbildes des Conn-Syndroms bzw. des primären Hyperaldosteronismus können die Effekte des Aldosterons aufgezeigt werden. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer vermehrten Produktion von Aldosteron durch die Nebennierenrinde und somit zu Hypertonie, zumeist Hypernatriämie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose (Conn 1955). Interessanterweise lassen sich bei resistenten Hypertonikern vermehrt erhöhte Aldosteron-Plasma-Spiegel nachweisen (Calhoun, et al. 2002; Gallay, et al. 2001).

So erhöht das durch Minderperfusion freigesetzte Renin, mittelfristig über Vasokonstriktion durch Angiotensin II und langfristig über NaCl- und Wasserretention durch Aldosteron und ADH, den Blutdruck. Es gibt jedoch auch einen physiologischen Zustand, der zu einer Freisetzung von Aldosteron ohne vorherige Aktivierung über Renin führt – die Hyperkaliämie.

1.4 Hyperkaliämie und Hypovolämie und das Aldosteron-Paradoxon

Wie unter 1.3 beschrieben, führt sowohl Hypovolämie als auch Hyperkaliämie zur Freisetzung von Aldosteron. Im Zustand der Hypovolämie soll die Na^+ -Retention ohne gleichzeitigen K^+ -Verlust gesteigert werden. Liegt hingegen eine Hyperkaliämie vor, soll K^+ vermehrt ausgeschieden, dabei jedoch Natrium nicht verstärkt renal resorbiert werden. Diese konträren Wirkungen des Aldosterons werden auch als Aldosteron-Paradoxon bezeichnet. Wie kann also das gleiche Hormon für diese beiden unterschiedlichen Wirkungen als Signal dienen?

Während Hypovolämie über die Aktivierung des RAAS zu einer Bildung von Angiotensin II führt, wird dies bei Hyperkaliämie nicht vermehrt gebildet. Aldosteron wird im Zustand der Hyperkaliämie also ohne vorherige Ausschüttung von Renin und Angiotensin II aus der Nebennierenrinde freigesetzt. Diese unterschiedliche Konstellation des Aldosterons, mit bzw. ohne gleichzeitige Anwesenheit von Angiotensin II, könnte somit die unterschiedliche Wirkung erklären (Arroyo, et al. 2011). Ein wichtiger Faktor scheint die unterschiedliche Aldosteron-Sensitivität der Abschnitte des Nephrons zu sein. Aldosteron wirkt nur im späten distalen convoluten Tubulus (DCT2), im Verbindungstubulus (CNT) und im Sammelrohr (CD), wohingegen der frühe distale convolute Tubulus (DCT1) nicht sensitiv für Aldosteron ist. Angiotensin II kann hingegen in allen Kompartimenten seine Wirkung entfalten (Arroyo, et al. 2011; Reilly and Ellison 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Vermittlung der unterschiedlichen Wirkungen scheinen die Kinasen Nedd4-2 und Sgk1 sowie WNK1, WNK4 und SPAK zu sein. Ihr unterschiedliches Zusammenspiel könnte z.B. den Einbau und die Aktivität von ENaC, ROMK (renal outer medullary channel) und NCC regulieren (Kahle, et al. 2003; Ring, et al. 2007). Die WNK4 (with-no-lysine kinase 4) scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen, da sie ihren Effekt auf einige Transporter unter Hypovolämie und Hyperkaliämie verändern kann. So wirkt sie bei Hypovolämie, also unter gleichzeitiger Anwesenheit von Ang II und Aldosteron, aktivierend auf NCC und ENaC und inhibierend auf ROMK, sodass vermehrt Na^+ resorbiert wird, ohne K^+ zu verlieren. Bei Hyperkaliämie, unter der nur Aldosteron vermehrt vorliegt, hemmt WNK4 den NCC im DCT1 in seiner Funktion und stimuliert ROMK und ENaC im DCT2. Die Hemmung des NCC führt dazu, dass mehr Na^+ im Lumen verbleibt und somit distal eine höhere Konzentration an Na^+ vorliegt, sodass Na^+ vermehrt über ENaC in die Zelle aufgenommen wird. Das durch die vermehrte Aktivität der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase erzeugte lumenegative Potential fördert zusätzlich die K^+ -Sekretion über den stimulierten ROMK, sodass die Hyperkaliämie vermindert werden kann.

Dieser unterschiedliche Zustand der WNK4 wird möglicherweise über Sgk1 (serum and glucocorticoid induced protein kinase) vermittelt, welche WNK4 unterschiedlich stark phosphorylieren kann. Sgk1 wiederum kann durch Aldosteron in ihrer Aktivität verändert werden (Arroyo, et al. 2011). Auch auf der Ebene der Transporter scheinen die unterschiedlichen Kinasen und Hormone verschieden zu wirken. So ist z.B. ENaC aus drei ähnlichen Untereinheiten α , β und γ aufgebaut, die wiederum unterschiedlich reguliert werden können (Canessa, et al. 1994; Lingueglia, et al. 1994). Vor allem die α -

Untereinheit wird durch Aldosteron und Sgk1 stimuliert (Quinn, et al. 2013; Soundararajan, et al. 2012).

Somit könnte das komplexe Zusammenspiel von Hormonen, Kinasen und Transportern das Aldosteron-Paradoxon erklären.

1.5 Die NaCl-Resorption und die Rolle der Schaltzellen

Um die benötigte Salzkonzentration des Organismus bei durchschnittlicher täglicher Na^+ -Aufnahme aufrecht zu erhalten, muss etwa 99,5% des vom Glomerulum filtrierten Na^+ wieder resorbiert werden. Na^+ wird hauptsächlich im proximalen Tubulus (PCT) (60%) über den Na^+/H^+ -Austauscher NHE3, im TAL (30%) über den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter NKCC2 und im DCT (7%) über den Na^+Cl^- -Co-Transporter NCC resorbiert (Eladari and Hübner 2011). Circa 2% des Na^+ wird im kortikalen Sammelrohr (CCD) über ENaC aufgenommen, welcher hier durch das RAAS reguliert wird. Obwohl dieser letzte Schritt nur einen kleinen Teil der Na^+ -Resorption ausmacht, findet hier die Netto-Salz-Balancierung statt (Lifton, et al. 2001). Neben der Resorption über ENaC in den Hauptzellen des CCD gibt es über die Schaltzellen (IC - Intercalated cells) einen weiteren Weg der Na^+ -Aufnahme.

Die Schaltzellen werden je nach Expression einiger Transporter in α -, β - und non- α -non- β -Schaltzellen eingeteilt (Kim, et al. 1999). Die genaue Funktion der non- α -non- β -Schaltzellen ist noch nicht abschließend geklärt. α - und β -IC finden sich im CNT und CCD (Kim, et al. 1999; Wall and Lazo-Fernandez 2015). Sie sind vor allem zuständig für die Feineinstellung des Säure-Basen-Haushalts. IC sind spezialisiert auf den Transport von Wasserstoff (H^+) und Bikarbonat (HCO_3^-), können jedoch auch Na^+ und Chlorid (Cl^-) transportieren. Das benötigte H^+ und HCO_3^- entsteht durch die Reaktion von Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) zu H^+ und HCO_3^- in den Zellen (Wall and Weinstein 2013). Chambrey et al. konnten zeigen, dass in den IC die Aufgabe der Na^+/K^+ -ATPase von einer vakuolären Wasserstoff-ATPase (H^+ V-ATPase) übernommen wird (Chambrey, et al. 2013). Während sich die H^+ V-ATPase bei den α -IC in der dem Lumen zugewandten Membran (apikal) befindet, liegt sie bei den β -IC in der dem Interstitium zugewandten Zellmembran (basolateral) (siehe Abb 1.1). Der basolaterale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter AE-1 ist in den α -IC vorhanden, der apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter Pendrin (Slc26a4) in den β -IC. Daher sezernieren die α -IC H^+ , wohingegen die β -IC HCO_3^- sezernieren, wodurch sich ihre Bedeutung für den Säure-Basen-Haushalt erklärt (Hennings, et al. 2012; Kim, et al. 1999; Royaux, et al. 2000; Tsuruoka and Schwartz 1999).

Neben der Funktion im Säure-Basen-Haushalt, scheinen die IC auch eine Bedeutung für den Na^+ -Haushalt zu haben. So scheint z.B. Pendrin, ein Na^+ -unabhängiger Anion-Austauscher, mit dem Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher NDCBE (Slc4a8) zusammen zu arbeiten, was bisher z.B. im Zustand der NaCl-Restriktion gezeigt werden

konnte (Leviel, et al. 2010). In einigen Modellen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das von Pendrin ins Lumen sezernierte HCO_3^- recycled werden kann, indem es zusammen mit Na^+ über den NDCBE wieder in die Zelle aufgenommen wird (Wall and Lazo-Fernandez 2015). Ein weiterer wichtiger Transporter in den β -IC scheint der basolateral gelegene AE-4 zu sein, welcher fast ausschließlich hier exprimiert wird (Hentschke, et al. 2009) (siehe Abb 1.1). AE-4 vermittelt die Abgabe des Na^+ , sowie des HCO_3^- aus der Zelle in das Interstitium (Chambrey, et al. 2013).

Bisher sind somit im CCD zwei wichtige Transportwege für die NaCl-Aufnahme bekannt: Der eine findet in den Hauptzellen statt, ist elektrogen und Amilorid-sensitiv, da Amilorid ENaC direkt inhibiert. Der zweite befindet sich in den β -IC, ist elektroneutral, Thiazid-sensitiv und läuft über Pendrin, NDCBE und AE-4. Daher scheint neben der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes auch die NaCl-Verarbeitung ein wichtiger Bestandteil der Funktion der IC zu sein. Da die IC sowohl Transporter für den Säure-Basen-Haushalt als auch für die NaCl-Aufnahme/Abgabe in *einer* Zelle exprimieren, wäre eine mögliche Verknüpfung des Säure-Basen-Haushaltes und der NaCl-Verarbeitung durch die IC vorstellbar. Vor allem das potenzielle Zusammenspiel von Pendrin, NDCBE und AE-4 in den β -IC ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung.

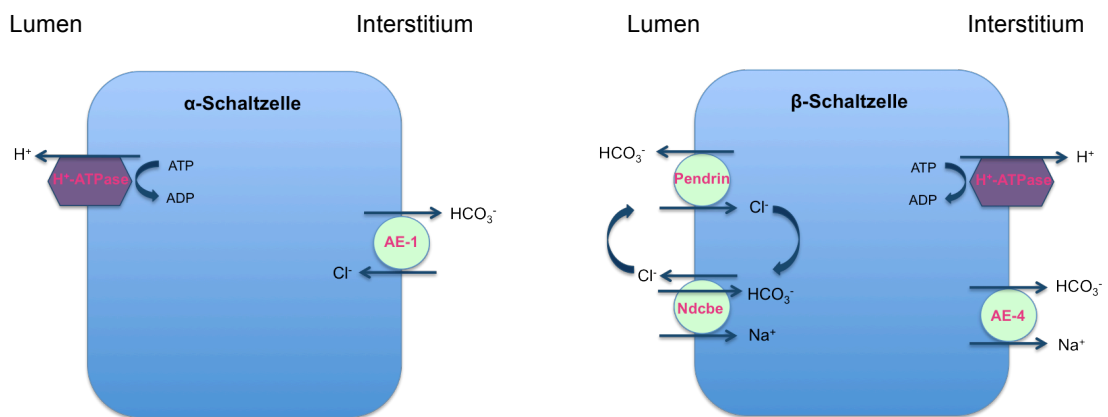


Abb 1.1: α - und β -Schaltzellen (IC) und ihre Transporter

In der α -IC transportiert die H^+ V-ATPase H^+ aktiv aus der Zelle ins Lumen. AE-1 gibt HCO_3^- ins Blut ab und nimmt Cl^- in die Zelle auf. In der β -IC gibt die H^+ V-ATPase das H^+ ins Interstitium ab. Hier wird HCO_3^- über Pendrin ins Lumen sezerniert und dabei Cl^- aufgenommen. Über den NDCBE wird sowohl HCO_3^- , als auch Na^+ resorbiert. AE-4 transportiert HCO_3^- und Na^+ aus der Zelle ins Interstitium.

1.6 Pendrin - ein mögliches Verbindungsglied zwischen Säure-Basen-Haushalt und Blutdruckregulation

Pendrin findet sich in der Niere fast ausschließlich in den β -IC sowie in den non- α -non- β -IC (Royaux, et al. 2000; Wall, et al. 2003). Pendrin scheint, neben der reinen Sekretion von HCO_3^- zur Reduktion der Basenlast, gleichzeitig das benötigte HCO_3^- zur Aufnahme von Na^+ über NDCBE bereitzustellen (Chambrey, et al. 2013). Die gemeinsame Wirkung von Pendrin und NDCBE lässt eine Akkumulation von Na^+ und HCO_3^- in der Zelle vermuten. AE-4 transportiert die beiden Anionen aus der Zelle ins Interstitium (Chambrey, et al. 2013). Die H^+ V-ATPase erzeugt dabei den nötigen auswärtsgerichteten HCO_3^- -Gradienten und treibt Pendrin so sekundär an. Eine mögliche gemeinsame Funktion dieser Transporter kann anhand einer Beobachtung von Gueutin deutlicher werden: Ein Ausfall der H^+ V-ATPase führte zu einem Verlust von NaCl , K^+ und Wasser (Gueutin, et al. 2013). Gleichzeitig mit der Sekretion von HCO_3^- resorbiert Pendrin Cl^- und scheint so den Hauptmechanismus der Cl^- -Resorption im CNT und CD darzustellen (Hadchouel, et al. 2011; Royaux, et al. 2000; Schuster 1993). Dafür spricht auch, dass Pendrin durch Veränderungen im Cl^- -Haushalt reguliert wird (Quentin, et al. 2004). Da Cl^- ein entscheidender Faktor in der Genese von Bluthochdruck zu sein scheint (Hadchouel, et al. 2011), könnte Pendrin über die Cl^- -Resorption für die Aufrechterhaltung des Blutdruckes von Bedeutung sein. Dafür spricht auch das Ergebnis, dass Pendrin-Null-Mäuse einen geringeren Blutdruck als Wildtyp-Mäuse aufweisen (Kim, et al. 2007). Eine mögliche Erklärung könnte die Stimulation durch Aldosteron und Angiotensin II sein. Diese scheinen die Aufnahme von Cl^- über Pendrin steigern zu können (Wall and Weinstein 2013). Auch Verlander et al. konnten zeigen, dass das Aldosteron-Analogon DOCP (deoxycorticosterone pivalate) die Menge an Pendrin in den β -IC um das 6fache gegenüber dem Normalzustand erhöht (Verlander, et al. 2003). Des Weiteren stieg der Blutdruck in Pendrin-Null-Mäusen, anders als bei den Wildtyp-Tieren, bei chronischer Gabe von Aldosteron nicht an. Aldosteron kann scheinbar ohne Pendrin keine NaCl -Resorption betreiben, weshalb der hypertensive Effekt in den Pendrin-Null-Mäusen ausbleibt (Hadchouel, et al. 2011; Verlander, et al. 2003). Ferner ist die Häufigkeit und Funktion von ENaC in Pendrin-Null-Mäusen eingeschränkt, was eine weitere Erklärung für den niedrigeren Blutdruck gegenüber den Wildtyp-Mäusen sein könnte (Kim, et al. 2007). Dieser Effekt könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in Pendrin-Null-Mäusen, durch den fehlenden Transporter Pendrin, eine geringere Sekretion von HCO_3^- in das Lumen stattfindet, wodurch der pH-Wert innerhalb der Zellen steigt. Die möglicherweise reduzierte Fähigkeit zur HCO_3^- -Sekretion der Pendrin-Null-Mäuse wurde in Versuchen von Wall und Weinstein näher beleuchtet: Die Gabe von NaHCO_3 oder Aldosteron führt in gesunden Mäusen zu einer Hochregulation von Pendrin. Pendrin-Null-Mäuse bekommen jedoch eine schwere metabolische Alkalose, wenn man ihnen vermehrt Aldosteron und NaHCO_3 zuführt, da sie vermutlich, durch den Verlust von Pendrin, eine geringere Kapazität für die Sekretion von HCO_3^- haben (Wall and Weinstein 2013). Da eine metabolische Alkalose die Expression der ENaC-Untereinheiten vermindert (Hadchouel, et al. 2011), könnte der

vermehrt alkalische pH-Wert der Zellen der Pendrin-Null-Mäuse die verminderte Expression von ENaC bei diesen Tieren erklären.

Da Pendrin sowohl in der Ausscheidung von Basen, als auch in der Regulation des Blutdruckes eine Rolle zu spielen scheint, könnte Pendrin als ein Verbindungsglied zwischen Säure-Basen-Haushalt und Blutdruckregulation angesehen werden. Daher stellt sich in dieser Arbeit die Frage, ob und wie eine mögliche Belastung des Säure-Basen-Haushaltes durch unterschiedliche Diäten möglicherweise den Blutdruck beeinflussen könnte. In diesem Zusammenhang könnte des Weiteren ein Transporter des proximalen Tubulus von Bedeutung sein – der NaDC1.

1.7 NaDC1

Der Natrium-Dicarboxylat-Co-Transporter NaDC1 gehört zu der Familie der Slc13-Transporter (Slc13a2) und findet sich in der Niere in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen (Pajor 2013). Er nimmt Na^+ und Zwischenprodukte des Citratzyklus, vor allem Citrat, parallel in die Zelle auf (Abb 1.2). Dieser Transport wird durch den in die Zelle gerichteten Na^+ -Gradienten angetrieben, welcher durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten wird (Pajor 2013; Unwin, et al. 2004). NaDC1 wird über eine vermehrte Aufnahme von Säuren mit der Diät und über sauren pH-Wert in den Zellen stimuliert (Pajor and Sun 1996). Durch seine vermehrte Expression wird das basische Citrat verstärkt resorbiert und neutralisiert den sauren Gehalt innerhalb der Zelle. Da Citrat frei filtriert wird, ist NaDC1 ein wichtiger Transporter um eine ausreichende Citrat-Rückresorption zu gewährleisten. Sinkt der pH-Wert durch vermehrten Anfall von Säuren, könnte dies über NaDC1 neutralisiert werden - jedoch würde dabei gleichzeitig vermehrt Na^+ resorbiert werden, was über die Expansion des intravasalen Volumens zu einem Blutdruckanstieg führen könnte. Somit könnte auch der NaDC1 eine mögliche Verbindung zwischen der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes und des Blutdruckes darstellen.

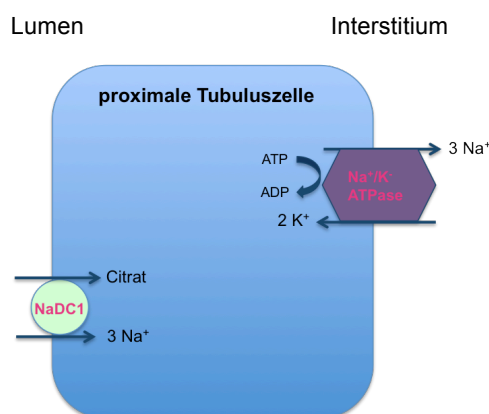


Abb 1.2: NaDC1 in der proximalen Tubuluszelle

In den Zellen des proximalen Tubulus transportiert der NaDC1 Citrat und Na^+ in die Zelle hinein. Dieser Transport wird von der niedrigen intrazellulären Na^+ -Konzentration angetrieben, welche durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten wird.

1.8 Basenstärke der gegebenen Anionen

Die drei Anionen, die in der folgenden Arbeit als Zusatz in der K^+ -Diät verwendet wurden, haben eine unterschiedliche Basenstärke. Diese wird mit dem pK_b -Wert angegeben. Je kleiner der pK_b -Wert, desto stärker ist das Bestreben der Base ein Proton (H^+) aufzunehmen und desto größer ist ihre Basenstärke. Genauso gibt es einen pK_s -Wert, der umso geringer ist, je größer die Acidität eines Stoffes ist. Je stärker die Säure, desto einfacher ist es für sie ein H^+ auf einen anderen Stoff zu übertragen. Jede Base hat eine korrespondierende Säure und andersherum. Das heißt, dass abhängig vom pK_b -Wert der pK_s -Wert berechnet werden kann, denn pK_b -Wert + pK_s -Wert = 14.

Die drei Anionen haben folgende pK_b -Werte:

$pK_b \text{ Cl}^- = 20$ sehr schwache Base

$pK_b \text{ Citrat} = 10,87$ schwache Base

$pK_b \text{ HCO}_3^- = 7,48$ mittelstarke Base

Daraus ergibt sich folgendes Schema: Basenstärke $\text{Cl}^- < \text{Citrat} < \text{HCO}_3^-$.

1.9 Fragestellung

Nach derzeitigem Forschungsstand scheint sowohl eine geringe als auch eine erhöhte Kalium-Zufuhr bei gleichzeitig hoher diätischer Kochsalzzufuhr eine Erhöhung des Blutdruckes nach sich zu ziehen. Vitzthum et al. untersuchten die genauen Vorgänge unter hoch-NaCl- und hoch- K^+ -Diät. Dabei fanden sie einen Anstieg des Blutdruckes und eine Na^+ -Retention sowie einen Anstieg von Aldosteron, Sgk1 und ENaC. Der Weg über Aldosteron und den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und damit einhergehender Stimulation des ENaC schien eine plausible Erklärung für die Na^+ -Retention und den Blutdruckanstieg darzustellen. Jedoch konnte weder eine Blockade des Mineralocorticoidrezeptors, noch eine direkte Blockade des ENaC den Blutdruck normalisieren, sodass dieser Weg nicht alleine ursächlich sein kann (Vitzthum, et al. 2014). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, andere mögliche Gründe für die Blutdrucksteigerung unter hoher diätischer K^+ - und NaCl-Zufuhr zu finden.

Da K^+ nicht alleine, sondern nur in Verbindung mit einem Anion gegeben werden kann, und in den vorherigen Versuchen KCitrat als Futter verwendet wurde, stellten sich folgende Fragen:

Ist der K^+ -Gehalt wirklich entscheidend für den Blutdruckanstieg bzw. welche Rolle spielt dabei das gleichzeitig gegebene Anion (Chlorid, Citrat, Bicarbonat)?

Wenn die gegebenen Anionen eine unterschiedliche Basenstärke aufweisen, beeinflusst dann die notwendige Balancierung des Säure-Basen-Haushaltes möglicherweise den Blutdruck?

und

Welche Bedeutung hat dabei das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in Bezug auf die Genexpression wichtiger renaler Na^+ -Transporter und deren regulierenden Kinasen?

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse der Linie C57bl6 von Charles River verwendet. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt circa 8 Wochen alt und wogen circa 20g. Die Mäuse waren einem Inzuchtstamm entsprungen und daher genetisch uniform. Die Genehmigungsnummern der Tierversuche waren G23/10 und G14/14.

2.2 Diätfutter

Die drei unterschiedlichen Diäten wurden von der Firma ssniff hergestellt. Sie enthielten jeweils 3% Natriumchlorid (NaCl) und zusätzlich 5% Kalium als Kaliumchlorid (KCl), Kaliumbicarbonat (KHCO_3) oder Kaliumcitrat und wurden als Pellet gereicht. Die Mäuse wurden den drei verschiedenen Diäten zufällig zugeteilt und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Tiere, die einen Blutdrucksender implantiert hatten, bekamen jede der drei Diäten für 10 Tage. Zwischen den Diäten pausierten sie mindestens drei Wochen unter Gabe ihres Standardfutters. Die Tiere, die zur Bestimmung der Renin- und Aldosteronkonzentration trainiert wurden, durchliefen nur eine Diätphase. Hier wurde zusätzlich eine vierte Gruppe mit einer 3%igen NaCl- und 0,93%igen Kaliumcitrat-Diät eingeführt. Diese Diät entspricht einer hohen Kochsalz- und normalen Kalium-Zufuhr und diente daher als Vergleichsgruppe.

2.3 Blutdruckmessung mittels Sender

Dr. Anika Seniuk operierte die Mäuse und legte ihnen eine Messsonde mit Sender der Firma DSI™ über die Arteria carotis in die Aorta. Der Sender wurde unter der Haut der Maus platziert. Dieser übertrug die aufgezeichneten Daten direkt von der Sonde auf eine Messplatte. Nach der Operation hatten die Mäuse mindestens 2 Wochen Zeit, um sich von der OP zu erholen, sowie sich an den Sender und ihre Umgebung zu gewöhnen. Erst nach dieser Zeit wurde mit der Messung der Blutdruckdaten begonnen.

Während einer Messung wurde darauf geachtet, die Bedingungen der Mäuse konstant zu halten um Störfaktoren durch äußere Einflüsse zu minimieren. Neben dem systolischen und dem diastolischen Blutdruck wurden die Herzfrequenz (HF), die Aktivität und der mittlere arterielle Druck (MAP) aufgezeichnet. Die mit DSI Dataquest A.R.T. Acquisition (V 4.0, Data Sciences) gesammelten Daten wurden mittels DSI Dataquest

A.R.T. Analysis (V 4.0, Data Sciences) analysiert. Sowohl der MAP der Nacht (MAP-Nacht) als auch die mittlere Herzfrequenz während der Nacht wurde aus den entsprechenden Werten zwischen 23 Uhr und 3 Uhr als Mittelwert errechnet.

2.4 Training der Mäuse und Entnahme von Organen

Um zu gewährleisten, dass die Mäuse am Tag der Blutentnahme keine vermehrten Stresshormone bildeten, wurden sie über 10 Tage an die Narkose-Einleitung gewöhnt. Dazu wurden sie jeden Tag, zur gleichen Uhrzeit, über einen speziellen Käfigaufsatz mit Druckluft (10-16 l/min) für 30 Sekunden begast. Am 11ten Tag wurde statt Druckluft Kohlenstoffdioxid eingeleitet und die Mäuse wurden innerhalb von 30 Sekunden bewusstlos. Die weitere Narkose wurde mit Isofluran aufrecht erhalten, wodurch ein erneutes Aufwachen, welches eine Stresshormonproduktion induzieren würde, verhindert werden konnte. Dann wurde den Tieren mittels einer mit 5 µl 0.3M Na⁺-EDTA präparierten Kapillare 60 µl Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Dieses wurde anschließend für 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abpipettiert und für die spätere Bestimmung der Renin-Konzentration bei -20 °C eingefroren. Für die Bestimmung des Aldosteron-Spiegels wurde das Blut in einem mit Heparin (35 I.E. Hep/ml Blut) versetzten Probengefäß (Micro Tube) gesammelt, welches für 10 Minuten bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und ebenfalls für die spätere Analyse bei -20°C eingefroren.

Nach zervikaler Dislokation wurden den Mäusen Nieren, Nebennieren und Herz entnommen. Die Nieren wurden in ihre 3 Zonen Cortex, innere Medulla (IM) und äußere Medulla (OM) zerlegt und bei -80 °C getrennt eingefroren.

Aus den gewonnenen Nierencortices wurde die RNA (Ribonukleinsäure) isoliert, um diese mittels Real Time PCR (quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion) weiter zu analysieren.

2.5 Isolierung der RNA

RNasen katalysieren die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente, d.h., dass sie RNA zerschneiden können. Um die zu isolierende RNA nicht durch die ubiquitär vorhandenen RNasen zu gefährden, war eine vorherige Aufbereitung der im folgenden Versuch genutzten Gefäße nötig. Dazu wurden diese über Nacht in destilliertem Wasser mit Diethylpyrocarbonate (DEPC) (1 µl Diethylpyrocarbonate pro 1 ml Wasser) unter dem Abzug inkubiert und anschließend bei 120 °C autoklaviert. Die Inkubation gewährleistete die Inaktivierung der Enzyme (RNasen) durch das DEPC. Durch das Autoklavieren zerfiel das DEPC und verlor seine Aktivität, sodass die benötigten Gefäße anschließend frei von RNasen und DEPC waren und zur Isolierung der RNA benutzt werden konnten.

Die bei -80 °C gelagerten Cortex-Proben wurden direkt in flüssigen Stickstoff gegeben, sodass sie nicht antauten. Jede Probe wurde mit 4 ml Lösung D (siehe 3.2 Lösung D) und Mercaptoethanol (360 µl Mercaptoethanol pro 50 ml Lösung D) mit dem Dispergierer in einem Zentrifugenröhrchen homogenisiert. Dann wurde nacheinander, mit zwischenzeitlichem Vortexen, 400 µl Natrium-Acetat, 4 ml saures Phenol und 800 µl Chloroform zugegeben. Bevor die Proben für 20 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert wurden, ruhten sie für 15 Minuten auf Eis. Durch die Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen, von denen die obere abpipettiert und mit 4 ml Isopropanol in einem neuen Zentrifugenröhrchen gemischt wurde. Nun wurden die Ansätze für mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert, wodurch die RNA gefällt wurde. Anschließend wurden die Proben erneut bei 12000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert, wodurch sich ein Pellet bildete. Die restliche Flüssigkeit wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde dann in 400 µl Lösung D und Mercaptoethanol resuspendiert und vollständig in RNase-freie 2 ml Cups umpipettiert. Dann wurden 40 µl Natrium-Acetat und 440 µl 100 %iger Ethanol dazugegeben und vermischt. Die Proben wurden für eine weitere Fällung für mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert. Durch anschließendes Zentrifugieren (20 Min.; 12000 g; 4 °C) bildete sich erneut ein Pellet, welches nun mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen wurde, um es von den Reaktionslösungen zu befreien. Nach weiterer Zentrifugation und Absaugung der restlichen Flüssigkeit wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 15 Minuten getrocknet. Danach wurde die RNA in 25 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Alle Arbeitsschritte, außer der Zentrifugation und der Fällung im Kühlschrank, fanden unter dem Abzug und auf Eis statt.

2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Um die Konzentration der isolierten RNA zu bestimmen und um die Reinheit der Proben abzuschätzen, wurde 4 µl RNA mit 96 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) (1:25) gemischt und in Küvetten pipettiert. Mittels eines UV-Spektrophotometers wurde die Konzentration der Proben bei 260 nm ermittelt. War die RNA zu hoch konzentriert, konnte das Photometer die Werte nicht exakt messen, weshalb dann weitere 300 µl RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser) zur Probe gegeben wurden, um diese ausreichend zu verdünnen (1:100). In eine Küvette wurde stets 100 µl RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser) gegeben, um diese als Leerwert für die Nullbestimmung zu nutzen.

Die Konzentration der RNA in den Proben kann anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Reinheit der Proben wird aus dem Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine und Phenol) errechnet. Ein Verhältnis von 2.0 spricht für eine reine RNA-Isolierung ohne Kontamination durch Proteine oder Phenol.

2.7 Quantifizierung und Qualitätsbeurteilung der RNA durch den Agilent 2000 Bioanalysator

Alle Proben wurden auf circa 0.08 µg/µl verdünnt, um sie mit dem Agilent 2000 Bioanalysator vermessen zu können. Die Vermessung wurde nach Anleitung des Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide durchgeführt. Da die Anzahl der Proben zu groß für eine Vermessungs-Platte war, mussten drei Platten vermessen werden. Um die Vergleichbarkeit der drei Platten zu überprüfen, wurden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben auf jede Platte immer drei identische Proben aufgetragen. Diese drei Proben mussten auf jeder Platte ähnlich vermessen werden, damit die Platten miteinander verglichen werden konnten. Der Bioanalysator errechnete die Konzentration der RNA in den einzelnen Proben und generierte eine RIN (RNA Integrity Number). Die RIN wurde zwischen 1 und 10 angegeben (1= niedrige Qualität; 10= hohe Qualität) und diente als Maß für die Intaktheit und somit für Qualität der RNA. Die RIN aller Proben lag im Bereich zwischen 6.4 und 9.6.

2.8 Reverse Transkription

Um die zuvor isolierte RNA in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben, wurde das Verfahren der reversen Transkription genutzt. Hierbei bedient man sich des Enzyms M-MLV reverse Transkriptase, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist und somit RNA zu DNA umschreiben kann.

Zu 3 µl jeder RNA-Probe wurde 1 µl Oligo(dT)₁₈ primer und 6 µl DEPC-Wasser gegeben und gut mit dem Vortexer durchmischt. Die Ansätze wurden dann 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, damit sich der Primer an den Poly-A-Schwanz der RNA anlegen konnte. Derweil wurde ein Reverse-Transkriptions-Mix (RT-Mix) wie folgt hergestellt:

RT Mix pro Probe

4 µl dNTP

4 µl Puffer

1 µl M-MLV Reverse Transkriptase

0.5 µl RNasin

2.5 µl DEPC-Wasser

12 µl Mix wurden zu jeder Probe gegeben und diese anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert (37°C entspricht dem Temperaturoptimum der M-MLV Reverse Tran-

skriptase). Um die Transkription zu beenden, wurden die Proben anschließend für zwei Minuten im Heizblock bei 94 °C erwärmt.

Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis oder auf dem Heizblock statt.

2.9 Herstellung einer Standardreihe für die Real Time PCR

Um die Qualität des in der Real Time PCR benutzten Primers zu kontrollieren und eine Mengenvergleichskurve zu erhalten, wurde eine doppelte Standardreihe pro Primerpaar mit auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Diese Reihe bestand aus sieben verschiedenen konzentrierten Proben, in denen eine RNA-Menge von 1 µg bis 0.01 µg vorlag (1 µg; 0.5 µg; 0.2 µg; 0.1 µg; 0.05 µg; 0.02 µg; 0.01 µg). Um diese Reihe zu erhalten, wurde immer dieselbe RNA-Probe mit einer verschiedenen großen Menge an DEPC-Wasser verdünnt.

2.10 Real Time PCR / quantitative Echtzeit PCR

Die Real Time PCR (qPCR) ermöglicht, neben der herkömmlichen Vervielfältigung der DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion, auch eine gleichzeitige Quantifizierung der gebildeten cDNA-Menge. Über die Menge der cDNA kann die vorher vorliegende RNA-Menge errechnet werden. Dazu wurde das Kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master der Firma Roche Diagnostics mit dem Farbstoff 1-SYBR® Green verwendet.

1-SYBR® Green bindet doppelsträngige DNA, was zur Entstehung einer Fluoreszenz führt. Die Stärke der Fluoreszenz hängt von der Menge der cDNA in der Probe ab, weshalb 1-SYBR® Green zur Quantifizierung der in der PCR gebildeten DNA-Produkte genutzt werden kann.

Dazu wurde zuerst ein Master Mix hergestellt:

Master Mix

500 µl Master

50 µl sens Primer 1:10 verdünnt

50 µl antisens Primer 1:10 verdünnt

350 µl Wasser

18 µl Mix und 2 µl cDNA der Proben wurden in jede Vertiefung der 96-Well-Platte gegeben.

Zuerst wurden die Proben für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt, anschließend durchliefen sie 45 PCR-Zyklen. Ein Zyklus bestand aus Erwärmung auf 95°C für 10 Sekunden, anschließende Abkühlung auf 60°C für 12 Sekunden und nochmals Erwärmung auf 72°C für 12 Sekunden. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Nach 45 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 97°C gesteigert wurde. Die PCR-Produkte eines bestimmten Primers sollten alle bei der gleichen Temperatur in zwei Einzelhelix zerfallen und somit den gleichen Schmelzpunkt aufweisen. Daher sollte sich nur ein gemeinsames Maximum in der Schmelzkurve zeigen. War dies der Fall, konnte eine Verunreinigung der Proben oder die Bildung von Nebenprodukten weitgehend ausgeschlossen werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Wasser- und eine -RT-Probe mitgemessen. Diese beiden sollten nicht amplifiziert werden oder wenn doch, dann ein anderes Maximum aufweisen. Die Ergebnisse der Real Time PCR wurden nur benutzt, wenn die Standardkurve eine Steigung von $> -3,1$ hatte und die Schmelzkurve nur ein Maximum aufwies. Die Daten wurden mittels der Software Light Cycler 3.5.3 analysiert. Alle Werte wurden auf die in der Probe enthaltene RNA-Menge normiert und es wurden arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) errechnet.

2.11 Primer für die Real Time PCR

a-ENaC

sens 5'-cgggatcccggcatgatgtactggcag-3'

antisens 5'-ggaattcgctggcgcgagtgttaggaag-3'

β-ENaC

sens 5'-cgggatccatgtggttctgcttacgctg-3'

antisens 5'-ggaattcgctctggtggtgttgctgtg-3'

AE-4

sens 5'-ccgcaattccagtggtcagt-3'

antisens 5'-gacctctgcagtttcgagg-3'

KS-WNK1

sens 5'-cgggatcccttccttatgctgtgggctag-3'

antisens 5'-ggaattcgtaaaaactggctggcttcac-3'

NaDC1

sens 5'-gtccccagaaggaggtgacc-3'

antisens 5'-ggcaatgccccgatgctggc-3'

NCC

sens 5'-cgggataatggcaaggcaagtcg-3'

antisens 5'-ggaattctgatgcggatgcattgatgg-3'

NDCBE

sens 5'-ctccgagacctgagcgacag-3'

antisens 5'-gcccatctctgtccatggagtg-3'

Pendrin

sens 5'-tctacgccaccaagcatgac-3'

antisens 5'-gacagccgttcgagacagag-3'

ROMK

sens 5'-cgggatccggcactgacagaaaggatg-3'

antisens 5'-ggaattccaggcaagtacagttgtcc-3'

WNK4

sens 5'-cgggatccgaggctgtggatgtgtacgc-3'

antisens 5'-ggaattcccgtgcggatgcagccttc-3'

SGK1

sens 5'-cgggatcccgaggctgctcgaagcac-3'

antisens 5'-ggaattcgaggacggacccaggttg-3'

2.12 Radioimmunoassay zur Renin- und Aldosteronquantifizierung

Mittels Radioimmunoassay wurde von Frau Telse Kock die Konzentration des Aldosterons und die Reninaktivität in den gewonnenen Proben untersucht. Bei diesem Verfahren kann mit Hilfe radioaktiv markierter Antigene auf die ursprüngliche Antigenkonzentration in den Proben geschlossen werden. Der RIA für die Konzentrationsbestimmung des Aldosterons wurde nach Anleitung des Herstellers (Immunotech Beckmann Coulter) durchgeführt. Abweichend zu dem ursprünglichen Protokoll wurden zusätzliche Standards im unteren Konzentrationsbereich hergestellt (Standard 1 mit Standard 0 1:2 und 1:4 verdünnt), um auch sehr niedrige Aldosteron-Konzentrationen in den Proben erfassen zu können. In den RIA wurden 50 µl Plasma der trainierten Tiere (2.4.) pro Bestimmung eingesetzt.

Zur Bestimmung der Reninaktivität wurde das RIA-Kit RENCTK von DiaSorin benutzt. Als Reninsubstrat diente Angiotensinogen-reiches Plasma, das aus nephrektomierten Ratten gewonnen wurde. Das Mausplasma der Proben wurde mit Maleat-Puffer 1:10 verdünnt. 50 µl verdünntes Mausplasma jeder Probe wurde dann mit 50 µl Mix aus Reninsubstrat (4 Teile) und RIA Generationspuffer (RIA-Kit; 5 Teile) und mit 2 ml PMSF (RIA-Kit) vermischt. Davon wurden 51 µl für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse ergaben den sogenannten „Warmwert“. Weitere 51 µl jeder Probe wurden für 90 Minuten bei 4°C inkubiert und die Ergebnisse ergaben den sogenannten „Kaltwert“. Nach Ende der Inkubationszeit wurde mittels RIA die in den Proben entstandene Angiotensin I-Menge nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Der Warmwert stellt die Angiotensin I-Menge da, die bei 37 °C durch die proteolytische Aktivität des Renins entstanden ist, während der Kaltwert die Angiotensin I-Menge erfasst, die unspezifisch gebildet wurde oder bereits vorab in der Probe vorhanden war. Durch die Subtraktion des Kaltwertes vom Warmwert konnte auf die Renin-Aktivität in den Proben rückgeschlossen werden.

2.13 Bestimmung des pH-Wertes des Urins

Nach 10-tägiger Diät wurde der Urin der Mäuse aufgefangen und mittels Combur³ pH-Teststreifen und Universalindikator pH-Papier der Urin-pH bestimmt.

2.14 Statistik

Die statistische Auswertung der aufgezeichneten Daten wurde mit Graph-Pad Prism 5.0 durchgeführt. Die drei bzw. vier Diät-Gruppen wurden mittels One-way ANOVA ausgewertet. Bonferroni's Post Test schloss sich an, um jede Gruppe mit den anderen gesondert zu vergleichen. Für die Analyse der Blutdruckdaten (Basis/Diät) wurde die Two-way ANOVA genutzt. Wurden zwei Zeitpunkte/Datensätze innerhalb einer Gruppe miteinander verglichen, wie zum Beispiel Tag und Nacht bei der Herzfrequenz, wurde der t-Test angewandt. Bei der Auswertung der Aldosteron-Daten kam der Kruskal-Wallis-Test, mit anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test zum Einsatz, da hier nicht von einer Normalverteilung/Gauß-Verteilung ausgegangen werden konnte. Ein p-Wert <0.05 wurde für alle Auswertungen als statistisch signifikant angesehen.

3 Material

3.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Agilent RNA 6000 Nano Reagents Part I und II von Agilent Technologies

Chloroform zur Analyse von Merck

Diethyl pyrocarbonate ca. 97 % von Sigma-Aldrich Life Science

100 % Ethanol absolute for analysis von Merck

Eisessig von Merck

Guanidine thiocyanate von Sigma-Aldrich

Isofluran/Forene von Abbott

Isopropanol / 2-Propanol for analysis von Merck

Light Cycler[®] 480 SYBR Green I Master von Roche Diagnostics

M-MLV Reverse Transkriptase von Promega

Natrium-Acetat von Merck

Natrium-Citrat von Merck

Oligo(dT)₁₈ primer von Thermo Scientific

RENTCK von DiaSorin

RIA Kit von Immunotech Beckman Coulter

Roti-Aqua-Phenol zur RNA-Extraktion von Carl Roth

Taq DNA Polymerase von invitrogen

3.2 Lösungen

70 % Ethanol

35 ml 100% Ethanol

15 ml DEPC-H₂O

mischen

DEPC-H₂O

1 µl Diethyl pyrocarbonate pro 1 ml H₂O

Lösung D

250 g Guanidine thiocyanate

293 ml DEPC-H₂O

17.6 ml Natrium-Citrat 0.75M ; pH 7

26.5 ml 10 % Sarcosyl

bei 64°C lösen

Natrium-Acetat 2M

32.81 g Na-Acetat

200 ml DEPC-H₂O

60 ml Eisessig zum Ansäuern des pH-Wertes auf 5.0 mischen

Natrium-Citrat 0.75M ; pH 7

22.10 g Na-Citrat

100 ml DEPC-H₂O

mischen

3.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Tubes 50 ml von Greiner Bio-One

Clot catcher von Radiometer Medical ApS

Küvetten UVette[®] 50 - 2000 µl von Eppendorf AG

Mikro-Hämatokrit-Kapillaren von Brand GMBH + CO KG

Micro Tubes 1.5 ml von Sarstedt

Micro Tubes 1.3 ml LH zur Plasmagewinnung (35 I.E. Heparin/ml Blut) von Sarstedt

pH-Teststreifen Combur³-Test[®] von Roche

Pipettenspitzen Premium Tips von Biozym (RNase frei)

Round Centrifuge Tube von Thermo Scientific
Safe CLINITUBES von Radiometer Medical ApS
Safe-lock Tubes 2 ml von Eppendorf AG
Serologische Pipette 10 ml in 1/10 ml von Falcon
Universalindikatorpapier pH-0-14 von Merck

3.4 Geräte

Agilent 2100 Bioanalytiker von Agilent Technologies
Analysenwaage von Sartorius
Blutgasanalysator ABL 90 Flex von Radiometer
Haematokrit Zentrifuge 20 von Hettich Zentrifugen
Isofluranabzug Fluovac/Veterinary Fluosorber von Harvard Apparatus
Kühlzentrifuge Biofuge stratos von Heraeus
Kühlzentrifuge 5417R von Eppendorf AG
Light Cycler® 480 von Roche
Narkosegerät Univentor 400 Anaesthesia Unit von TSE Systems
Pipette von pipetman 2 µl ; 10 µl ; 20 µl ; 1000 µl
Pipettierhilfe Pipetus® junior von Hirschmann Laborgeräte
Telemetriemesssonde Chronic Use TA11PA-C10 Implant von DSI™
Telemetrieempfängerplatten PhysioTel™ Receiver von DSI™
UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 3000 von Pharmacia Biotech
UV-Leuchttisch von Biometra TI 1
Vakuumbzentrifuge Speed Vac Concentrator 5301 von Eppendorf
Vortex MS2 Minishaker von IKA
Zentrifuge Biofuge pico von Heraeus

3.5 Software

DSI Dataquest A.R.T. Acquisition (V 4.0, Data Sciences)

DSI Dataquest A.R.T. Analysis (V 4.0, Data Sciences)

Graph Pad Prism (Version 5.0)

Light Cyclor software 3.5.3

4 Ergebnisse

4.1 Blutdruck

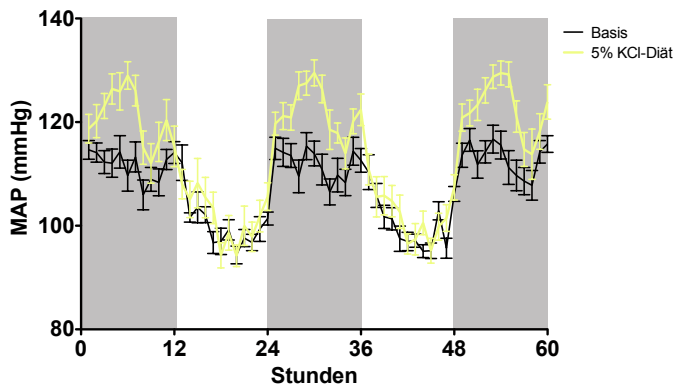
Um den Blutdruck unter Standard-Futter (Basisdiät 0.93% KCitrat / 0.24% NaCl) und hoch-Kalium-Diät (5% KCl, 5% KCitrat, 5% KHCO₃/ jeweils 3% NaCl) vergleichen zu können, wurden eine 60-stündige Basismessung und eine 60-stündige Diät-Messung durchgeführt (siehe Tab 1). Hierbei wurde alle 5 Minuten der Blutdruck der Mäuse für eine Minute gemessen und die gemessenen Werte einer Stunde gemittelt.

Tab 1: Blutdruck und HF: Übersicht über die Zusammensetzung des Futters der unterschiedlichen Diät-Gruppen

	Basisdiät	Diät-Gruppe		
		5% KCl	5% KCitrat	5% KHCO ₃
K ⁺	0.93% als KCitrat	5% als KChlorid	5% als KCitrat	5% als KHCO ₃
NaCl	0.24 %	3%	3%	3%

4.1.1 Mittel-arterieller Druck (MAP)

Der MAP war in allen drei Diät-Gruppen signifikant gegenüber dem MAP unter Basisdiät erhöht. Dabei zeigten alle Mäuse einen circadianen, aktivitätsabhängigen Blutdruckanstieg in der Nacht (Abb 2a, 3a, 4a). Auch der SAP (systolisch-arterieller Druck) und DAP (diastolisch-arterieller Druck) stieg in gleichem Maße wie der MAP gegenüber der Basisdiät an. Der mittlere Blutdruckanstieg in der Nacht (MAP_{Nacht}) gegenüber der Basisdiät betrug in der 5% KCl-Gruppe 13.8 mmHg ($p < 0.001$), in der 5% KCitrat-Gruppe 13.6 mmHg ($p < 0.001$) und in der 5% KHCO₃-Gruppe 11.9 mmHg ($p < 0.01$) (Abb 2b, 3b, 4b).

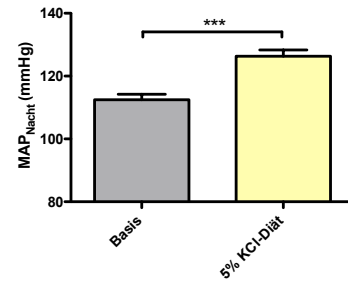


a

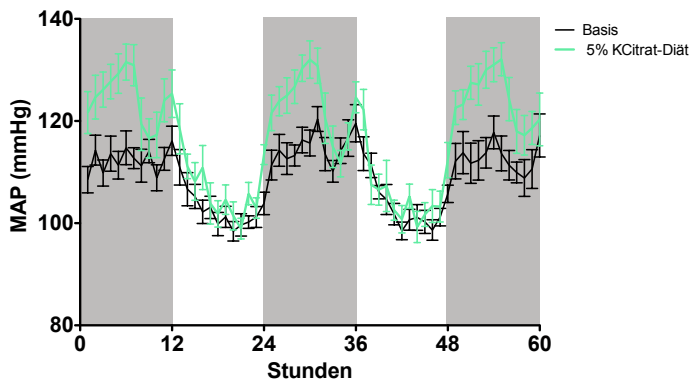
Abb 2: MAP in der 5% KCl-Gruppe

a: Verlauf des MAP Der MAP stieg unter der 5% KCl-Diät (gelbe Kurve) während der Aktivitätsphase signifikant an ($p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=9$.

b: Vergleich des mittleren MAP_{Nacht} Der mittlere MAP_{Nacht} stieg unter hoch-Kalium-Diät im Mittel um 13.8 mmHg an ($***p < 0.001$). Mittelwerte \pm SEM, t-Test, $n=9$.



b

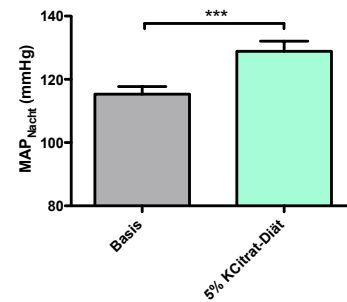


a

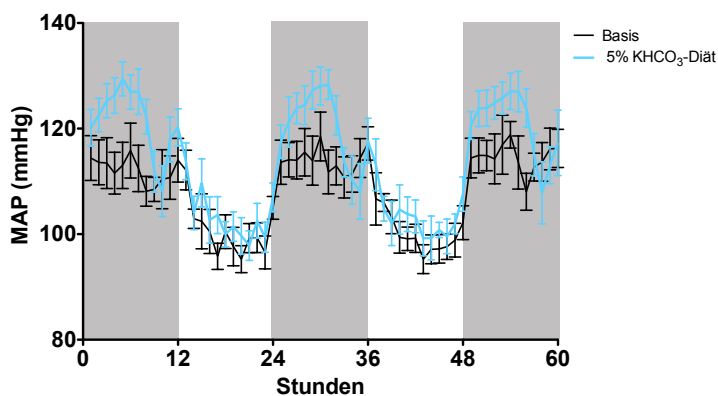
Abb 3: MAP in der 5% KCitrat-Gruppe

a: Verlauf des MAP Der MAP stieg unter der 5% KCitrat-Diät (grüne Kurve) während der Aktivitätsphase signifikant an ($p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=8$.

b: Vergleich des mittleren MAP_{Nacht} Der mittlere MAP_{Nacht} stieg unter hoch-Kalium-Diät im Mittel um 13.6 mmHg an ($***p < 0.001$). Mittelwerte \pm SEM, t-Test, $n=8$.



b

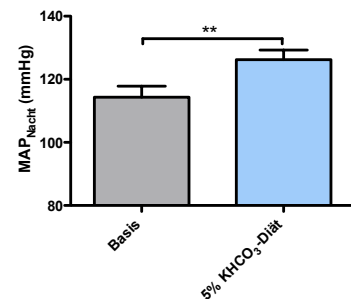


a

Abb 4: MAP in der 5% KHCO₃-Gruppe

a: Verlauf des MAP Der MAP stieg unter der 5% KHCO₃-Diät (blaue Kurve) während der Aktivitätsphase signifikant an ($p < 0.0001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=8$.

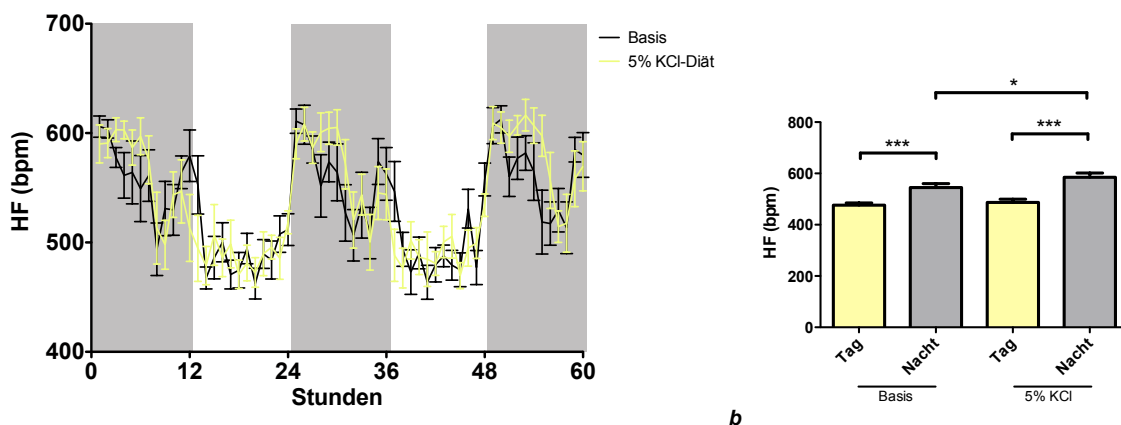
b: Vergleich des mittleren MAP_{Nacht} Der mittlere MAP_{Nacht} stieg unter hoch-Kalium-Diät im Mittel um 11.9 mmHg an ($**p < 0.01$). Mittelwerte \pm SEM, t-Test, $n=8$.



b

4.1.2 Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz, die parallel zum MAP aufgezeichnet wurde, zeigte einen deutlichen Anstieg (im Mittel 67.4 beats per minute (bpm)) gegenüber der Basismessung in der 5% KCl-Gruppe während der Nacht (Abb 6a, 6b). Dieser Anstieg war mit einem p-Wert < 0.001 signifikant. Die 5% KCl- und die 5% KHCO_3 -Gruppe zeigten eine geringe Erhöhung der Herzfrequenz in der Nachtphase bzw. in der Aktivitätsphase der Tiere von im Mittel 40.7 bpm ($p < 0.05$) und 27.2 bpm, welche in der 5% KHCO_3 -Gruppe keine Signifikanz erreichte (Abb 5a, 5b und 7a, 7b). In allen drei Gruppen stieg die HF von der Tag- zur Nachtphase signifikant an (Abb 5b, 6b, 7b).

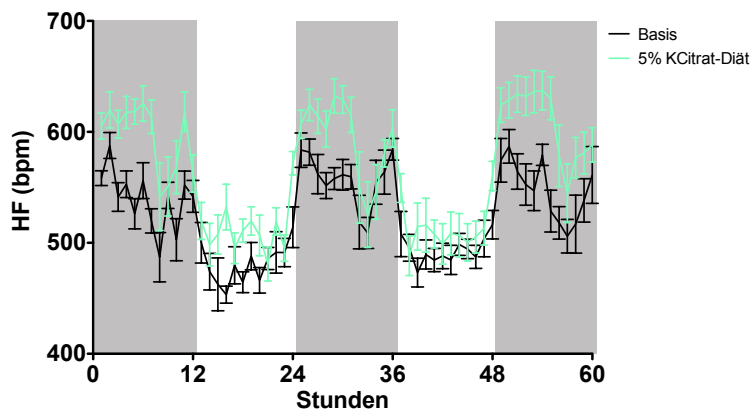


a

Abb 5: HF in der 5% KCl-Gruppe

a: Verlauf der HF Die HF zeigte unter der 5% KCl-Diät (gelbe Kurve) einen signifikanten Anstieg in der Nachtphase ($p < 0.05$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=9$.

b: Vergleich der mittleren HF In der 5% KCl-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der mittleren HF unter Diät gegenüber der Basismessung in der Nachtphase zu erkennen ($*p < 0.05$). Die mittlere HF stieg auch zwischen den jeweiligen Tag- und Nachtphasen der Basis- und Diät-Messungen signifikant an ($***p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=9$.



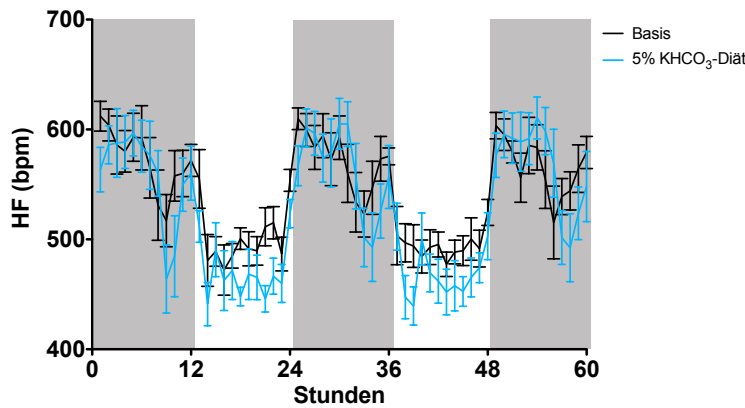
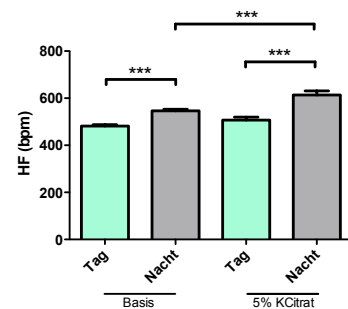
a

Abb 6: Verlauf der HF in der 5% KCitrat-Gruppe

a: Verlauf der HF Die HF zeigte unter der 5% KCitrat-Diät (grüne Kurve) einen signifikanten Anstieg gegenüber der Basismessung in der Nachtphase ($p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=8$.

b: Vergleich der mittleren HF In der 5% KCitrat-Gruppe war ein signifikanter Anstieg der mittleren HF gegenüber der Basismessung in der Nachtphase zu erkennen ($***p < 0.001$). Die mittlere HF stieg auch zwischen den jeweiligen Tag- und Nachtphasen der Basis- und Diät-Messungen signifikant an ($***p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=8$.

b



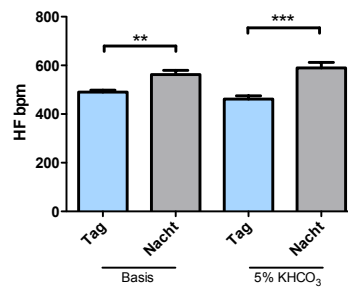
a

Abb 7: HF in der 5% KHCO₃-Gruppe

a: Verlauf der HF Die HF zeigte unter der 5% KHCO₃-Diät (blaue Kurve) keine signifikanten Veränderungen. Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 2way ANOVA, $n=8$.

b: Vergleich der mittleren HF In der 5% KHCO₃-Gruppe war kein signifikanter Anstieg der mittleren HF gegenüber der Basismessung in der Nachtphase zu erkennen. Die mittlere HF stieg zwischen den jeweiligen Tag- und Nachtphasen der Basis- und Diät-Messungen signifikant an ($**p < 0.01$ und $***p < 0.001$). Die Nachtphasen/Aktivitätsphasen sind grau hinterlegt. Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=8$.

b



4.2 Renin und Aldosteron

Zur Bestimmung der Renin- und Aldosteronwerte im Serum der Mäuse wurden diese in vier Gruppen eingeteilt, um die drei hoch-Kalium-Diät-Gruppen (5% KCl / 3% NaCl / n=11, 5% KCitrat / 3% NaCl / n= 12, 5% KHCO₃ / 3% NaCl / n=9) gegen die normal-Kalium-Diät-Gruppe (0,93% KCitrat / 3% NaCl, n=12; entspricht der Vergleichsdiät) vergleichen zu können (siehe Tab 2). Nach 10tägiger Diät wurde ihnen retrobulbär Blut entnommen.

Tab 2: Übersicht über die Zusammensetzung des Futters der unterschiedlichen Diät-Gruppen aller folgenden Versuche

		Diät-Gruppe		
		5% KCl	5% KCitrat	5% KHCO ₃
	Vergleichsdiät			
K⁺	0.93% KCitrat	5% als KChlorid	5% als KCitrat	5% als KHCO ₃
NaCl	3 %	3%	3%	3%

Nach Analyse via Radioimmunoassay zeigte sich, dass der Aldosteronspiegel im Blut der Mäuse aller drei hoch-K⁺-Diäten signifikant gegenüber dem der 0,93% KCitrat-Vergleichsgruppe ansteigt. So stieg der Aldosteron-Spiegel von 26.7 ± 6.354 pg/ml in der Vergleichsgruppe auf 263.4 ± 49.66 pg/ml in der 5% KCl-Gruppe (p<0.001) und auf 122.7 ± 19.61 pg/ml in der 5% KCitrat-Gruppe (p<0.05) an. Ein deutlicher Anstieg auf 181.6 ± 61.53 pg/ml (p<0.01) war auch in der 5% KHCO₃-Gruppe zu beobachten.

Die Reninaktivität war in allen drei Gruppen ähnlich stark erniedrigt, erreichte jedoch gegenüber der Vergleichsgruppe, welche aufgrund der Hochsalzdiät bereits eine geringere Reninaktivität aufwies, keine Signifikanz.

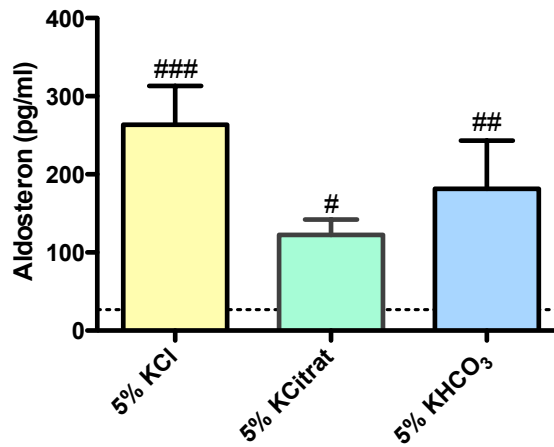


Abb 8: Aldosteron-Plasma-Spiegel unter 5%iger K⁺-Diät im Vergleich zur 0,93%igen K⁺-Diät

Der Aldosteron-Spiegel stieg in allen drei hoch-K⁺-Gruppen signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe an. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. #p<0.05 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, ##p<0.01 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, ###p<0.001 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, 1way ANOVA, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Multiple Comparison Test, n=9-12.

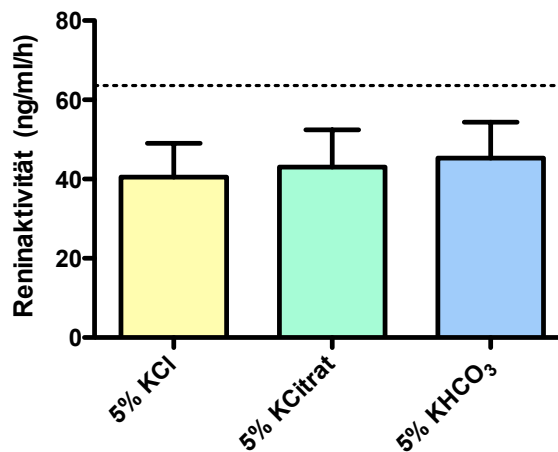


Abb 9: Reninaktivität im Serum unter 5%iger K⁺-Diät im Vergleich zur 0,93%igen K⁺-Diät

Die Reninaktivität zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=9-12.

4.3 Urin pH

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Anionen der drei Diäten den Säure-Basen-Haushalt verändern, bzw. ob die Niere die zugeführten Säuren und Basen ausscheidet, wurde der Urin nach 10tägiger Diät aufgefangen und der pH-Wert untersucht. Hier wurden die Mäuse nach Gabe von 0.93%iger KCitrat-Diät (0,93% KCitrat / 3% NaCl, n=5) als Vergleichsgruppe eingesetzt (siehe Tab 2). Es zeigte sich, dass der Urin-pH in der 5% KCitrat- (5% KCitrat / 3% NaCl / n=6) und in der 5% KHCO₃-Gruppe (5% KHCO₃ / 3% NaCl / n=6) signifikant gegenüber der 0.93% KCitrat-Gruppe erhöht war. Die Zunahme des pH-Wertes war bei den Mäusen der 5% KHCO₃-Gruppe am größten und somit auch signifikant gegenüber den anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen (p<0.05 gegenüber der 5% KCitrat-Gruppe, p<0.001 gegenüber der 5% KCl-Gruppe). Der pH-Wert stieg hier im Mittel von 6.1 ± 0.1 in der Vergleichsgruppe auf 8.3 ± 0.3 an. Auch die 5% KCitrat-Gruppe zeigte eine signifikante Erhöhung gegenüber der Vergleichsgruppe, wobei der pH-Wert von im Mittel 6.1 ± 0.1 auf 7.3 ± 0.3 anstieg. Auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe bestand eine signifikante Erhöhung (p<0.01). In der 5% KCl-Gruppe (5% KCl / 3% NaCl / n=7) zeigt sich ein minimaler, nicht signifikanter Abfall des Urin-pH gegenüber der Vergleichsgruppe auf einen pH-Wert von 5.9 ± 0.1.

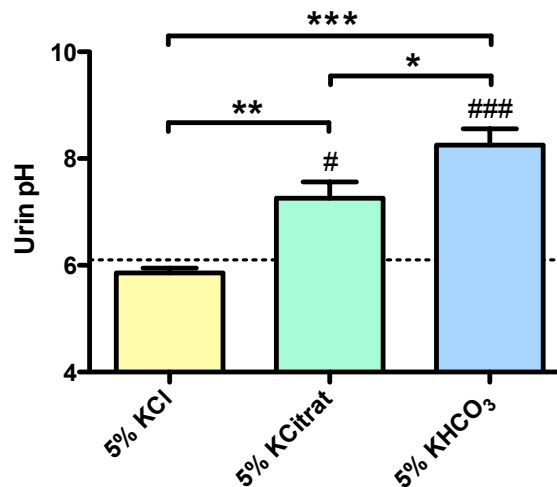


Abb 10: Urin pH unter 5%iger K⁺-Diät im Vergleich zur 0.93%igen K⁺-Diät

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Urin pH-Wertes in der 5% KCitrat- und auch in der 5% KHCO₃-Gruppe sowohl gegenüber der Vergleichsgruppe als auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. ***p<0.001 signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, **p<0.01 signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, *p<0.05 signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, #p<0.05 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, ###p<0.001 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=5-7.

4.4 Expression auf mRNA-Ebene

Um einen möglichen Grund für die Blutdruckerhöhung unter 5%iger K⁺-Diät zu finden, wurden einige ausgewählte Transporter der Niere nach 10tägiger Diät auf mRNA-Ebene untersucht. Auch hier wurden vier Gruppen gebildet: die 5% KCl-Gruppe (5% KCl / 3% NaCl / n=7-11), sowie die 5% KCitrat-Gruppe (5% KCitrat / 3% NaCl / n=8-11) und die 5% KHCO₃-Gruppe (5% KCHO₃ / 3% NaCl / n=7-11) wurden mit der Normal-/Vergleichsdiät (0.93% KCitrat / 3% NaCl, n=8-12) verglichen (siehe Tab 2).

4.4.1 NaDC1

Der Natrium-Dicarboxylat-Co-Transporter NaDC1 findet sich in der Niere in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen (Pajor 2013). Die Mäuse der 5% KCl-Gruppe zeigten einen signifikanten Anstieg ($p < 0.001$) der mRNA-Menge sowohl gegenüber der Vergleichsgruppe, als auch gegenüber den anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen. Die mRNA-Menge stieg dabei im Mittel um 110% von 6.82 ± 0.66 mRNA/ μ g RNA in der Vergleichsgruppe auf 14.33 ± 2.06 mRNA/ μ g RNA in der 5% KCl-Gruppe. Die mRNA-Menge blieb in der 5% KCitrat und in der 5% KHCO₃-Gruppe unterhalb der Vergleichsgruppe, war jedoch nicht signifikant reduziert.

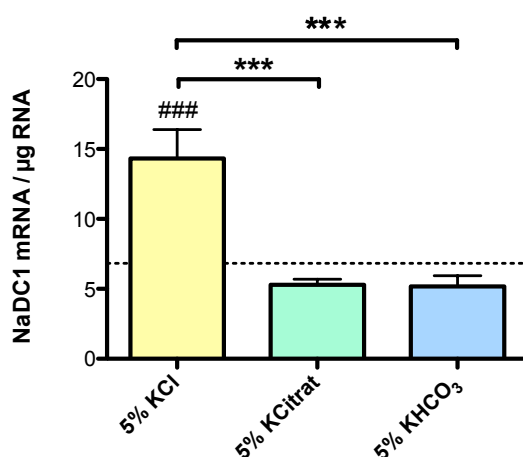


Abb 11: Expression von NaDC1 auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von NaDC1 erhöhte sich signifikant in der 5% KCl-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe und gegenüber den anderen beiden hoch-K⁺-Diäten. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. *** $p < 0.001$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, ### $p < 0.001$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test n=7-8.

4.4.2 NCC

Der Natrium-Chlorid-Cotransporter befindet sich im DCT des Nephrons, wo er Natrium und Chlorid resorbiert. NCC zeigte einen Anstieg der mRNA-Menge in allen drei hoch-K⁺-Gruppen, erreichte jedoch keine Signifikanz.

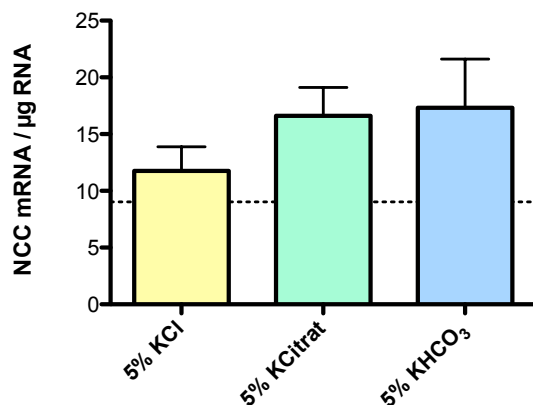


Abb 12: Expression von NCC auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von NCC erhöhte sich nicht signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=7-8.

4.4.3 α-ENaC

α-ENaC ist eine der drei Untereinheiten des epithelialen Natrium-Kanals, der sich sowohl im späten DCT als auch in den Hauptzellen des CD des distalen Tubulus findet. Die Menge der mRNA stieg in allen drei hoch-K⁺-Gruppen gegenüber der Vergleichsgruppe an. Signifikanz erreichte der Anstieg nur in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe mit einem p-Wert <0.05 und einem p-Wert <0.01. Die Zunahme der mRNA-Menge betrug im Mittel 92% von 6.65 ± 0.64 mRNA/µg RNA in der Vergleichsgruppe auf 12.72 ± 1.32 mRNA/µg RNA in der 5 %KCitrat-Gruppe und im Mittel 112% auf 14.07 ± 2.14 mRNA/µg RNA in der 5% KHCO₃-Gruppe.

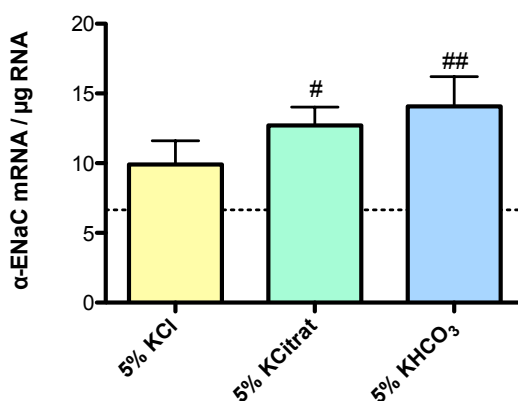


Abb 13: Expression von α-ENaC auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von α-ENaC erhöhte sich signifikant in der 5% KCitrat- als auch in der 5% KHCO₃-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. ##p<0.01 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, #p<0.05 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=7-8.

4.4.4 β -ENaC

β -ENaC ist eine weitere Untereinheit des epithelialen Natrium-Kanals. Alle drei hoch- K^+ -Gruppen zeigten eine Steigerung der mRNA-Menge, wobei nur die 5% KCitrat-Gruppe mit einem Anstieg von im Mittel 117% von 8.18 ± 0.77 mRNA/ μ g RNA in der Vergleichsgruppe auf 17.78 ± 2.07 mRNA/ μ g RNA unter Diät und die 5% $KHCO_3$ -Gruppe mit einem Anstieg um im Mittel 116% auf 17.07 ± 3.54 mRNA/ μ g RNA, Signifikanzniveau erreichten.

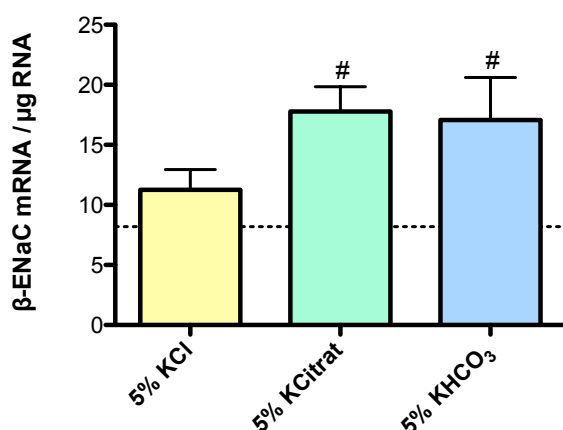


Abb 14: Expression von β -ENaC auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge des β -ENaC erhöhte sich in der 5% KCitrat- und in der 5% $KHCO_3$ -Gruppe signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. # $p < 0.05$ gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=7-8$.

4.4.5 ROMK

Der renal outer medullary channel ROMK wird zusammen mit ENaC in den Hauptzellen des CD, sowie im DCT und im TAL exprimiert. In der 5% $KHCO_3$ -Gruppe stieg der mRNA-Wert im Mittel um 121% über den Wert der Vergleichsgruppe. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant. In den anderen beiden hoch- K^+ -Gruppen ließ sich nur ein minimaler Anstieg der mRNA-Menge von ROMK zeigen.

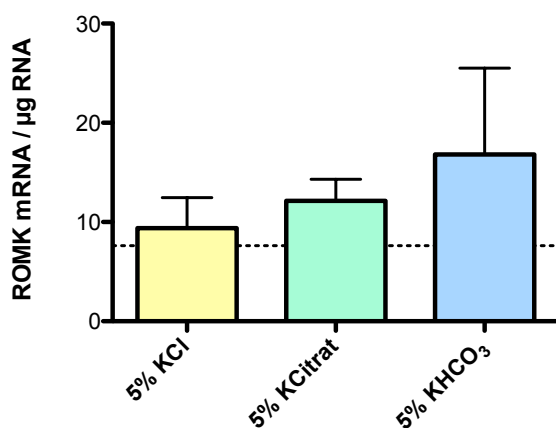


Abb 15: Expression von ROMK auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von ROMK zeigte nur in der 5% $KHCO_3$ -Gruppe einen deutlichen Anstieg gegenüber der Vergleichsgruppe, welcher jedoch nicht signifikant war. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=7-8$.

4.4.6 Sgk1

Die Kinase Sgk1 (serum and glucocorticoid induced protein kinase) vermittelt unter anderem die Wirkung von Aldosteron auf ENaC. In der 5% KHCO₃-Gruppe war ein deutlicher Anstieg der mRNA-Menge von im Mittel 160% gegenüber der Vergleichsgruppe zu sehen ($p < 0.001$). Der Mittelwert lag hier bei 12.63 ± 1.52 mRNA/ μ g RNA gegenüber 4.86 ± 0.44 mRNA/ μ g RNA in der Vergleichsgruppe. Auch gegenüber der anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen war der Anstieg signifikant ($p < 0.001$). Die mRNA-Menge war in der 5% KCl- als auch in der 5% KCitrat-Gruppe minimal gegenüber der Vergleichsgruppe erhöht.

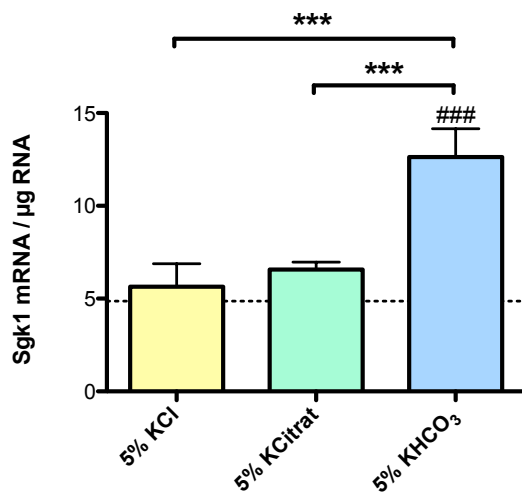


Abb 16: Expression von Sgk1 auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von Sgk1 war in der 5% KHCO₃-Gruppe signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe und gegenüber der anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen erhöht. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. *** $p < 0.001$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, ### $p < 0.001$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n = 7-8$.

4.4.7 KS-WNK1

Die KS-WNK1 ist eine Spleißvariante der WNK1 (with-no-lysin kinase 1) und kommt nur in der Niere vor. Sie scheint regulatorische Effekte auf ROMK auszuüben. Die mRNA-Menge der KS-WNK1 erhöhte sich signifikant sowohl in der 5% KCitrat ($p < 0.05$) als auch in der 5% KHCO₃-Gruppe ($p < 0.01$) gegenüber der Vergleichsgruppe und gegenüber der 5% KCl-Gruppe ($p < 0.05$ und $p < 0.001$). In der 5% KCitrat-Gruppe stieg die mRNA-Menge um im Mittel 52% von 13.97 ± 1.0 mRNA/ μ g RNA in der Vergleichsgruppe auf 21.23 ± 1.65 mRNA/ μ g RNA unter Diät an. In der 5% KHCO₃-Gruppe stieg sie im Mittel um 70% auf 23.72 ± 1.6 mRNA/ μ g RNA an. Die mRNA-Menge der 5% KCl-Gruppe blieb ungefähr auf dem Niveau der Vergleichsgruppe (13.42 ± 1.99 mRNA/ μ g RNA).

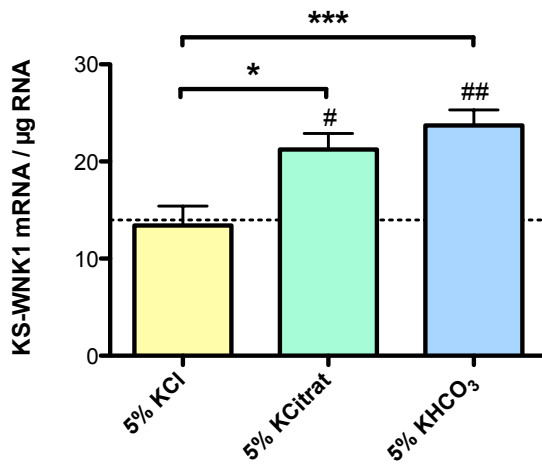


Abb 17: Expression von KS-WNK1 auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von KS-WNK1 war in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe und gegenüber der 5% KCl-Gruppe erhöht. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. ***p<0.001 signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, *p<0.05 signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, #p<0.05 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, ##p<0.01 signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=7-8.

4.4.8 WNK4

Die Kinase WNK4 (with-no-lysin kinase 4) scheint auch an der Vermittlung der Aldosteron-Wirkungen beteiligt zu sein. Die mRNA-Menge stieg in allen drei hoch-K⁺-Gruppen an, erreicht dabei jedoch kein Signifikanzniveau. Der Anstieg war in der 5% KHCO₃-Gruppe mit 54% am Größten.

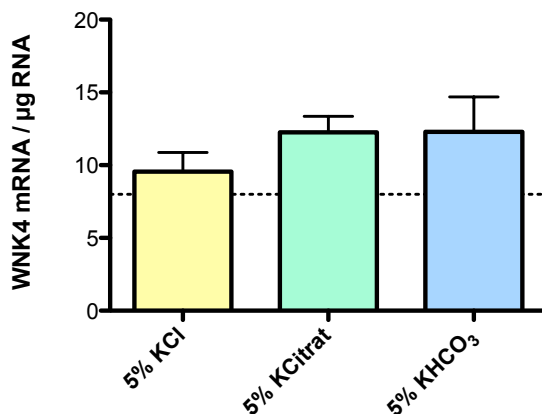


Abb 18: Expression von WNK4 auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von WNK4 stieg in keiner Gruppe signifikant an. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. Mittelwerte ± SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, n=7-8.

4.4.9 Pendrin

Der apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter Pendrin (Slc26a4), welcher sich in der Niere fast ausschließlich in den β -Schaltzellen, sowie in den non- α -non- β -Schaltzellen befindet (Royaux, et al. 2000; Wall, et al. 2003), zeigte eine signifikante Erhöhung seiner mRNA-Menge in der 5% KCitrat-Gruppe ($p < 0.01$), sowie in der 5% KHCO_3 -Gruppe ($p < 0.001$) gegenüber der Vergleichsgruppe (0.93% KCitrat). Diese beiden Gruppen wiesen auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe signifikant erhöhte mRNA-Werte auf, wobei die Tiere der 5% KHCO_3 -Gruppe im Verhältnis eine höhere Signifikanz mit einem p-Wert von < 0.001 , als die der 5% KCitrat-Gruppe mit einem p-Wert von < 0.01 zeigten. In der 5% KCitrat-Gruppe stieg die mRNA-Menge im Mittel um 153% von 2.79 ± 0.39 mRNA/ μg RNA in der Vergleichsgruppe auf 7.05 ± 1.08 mRNA/ μg RNA unter Diät an. Die mRNA-Menge stieg in der 5% KHCO_3 -Gruppe um im Mittel um 237% auf 9.39 ± 1.62 mRNA/ μg RNA an. Die Tiere der 5% KCl-Gruppe zeigten hingegen keinen Anstieg der mRNA-Menge von Pendrin (3.04 ± 0.44 mRNA/ μg RNA).

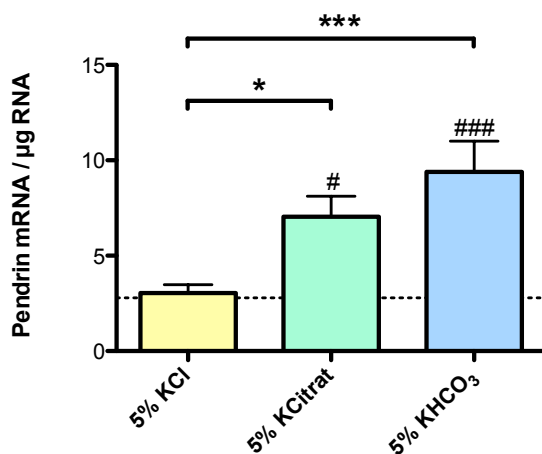


Abb 19: Expression von Pendrin auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von Pendrin erhöhte sich signifikant in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO_3 -Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe und gegenüber der 5% KCl-Gruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. *** $p < 0.001$ signifikant gegenüber den anderen hoch- K^+ -Gruppen, * $p < 0.05$ signifikant gegenüber den anderen hoch- K^+ -Gruppen, # $p < 0.05$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe (0.93% KCitrat-Gruppe), ### $p < 0.001$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n = 11-12$.

4.4.10 NDCBE

Der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher NDCBE (Slc4a8) findet sich in den β -Schaltzellen des distalen Nephrons. Er zeigte sowohl eine Erhöhung der mRNA-Menge in der 5% KCitrat- als auch in der 5% KHCO_3 -Gruppe. Die Signifikanz lag in beiden Gruppen bei einem p-Wert von <0.05 . In der 5% KCitrat-Gruppe stieg die mRNA-Menge um im Mittel 64% von 6.35 ± 0.59 mRNA/ μg RNA in der Vergleichsgruppe auf 10.38 ± 1.28 mRNA/ μg RNA unter Diät an. Der Anstieg in der 5% KHCO_3 -Gruppe fiel ähnlich aus, um im Mittel 60% auf 10.16 ± 0.93 mRNA/ μg RNA. Auch in der 5% KCl-Gruppe stieg die mRNA-Menge auf 8.12 ± 0.85 mRNA/ μg RNA an, erreichte hier jedoch kein Signifikanzniveau.

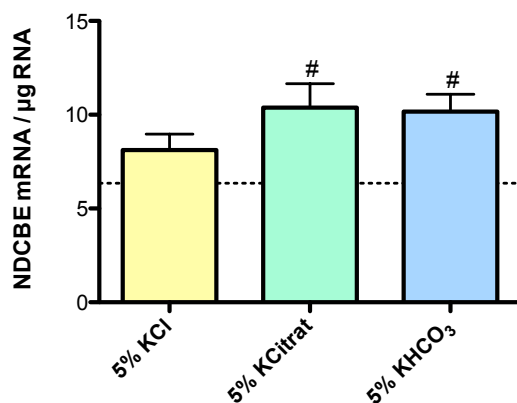


Abb 20: Expression von NDCBE auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von NDCBE erhöhte sich signifikant in der 5% KHCO_3 - und in der 5% KCitrat-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. # $p < 0.05$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test, $n=11-12$.

4.4.11 AE-4

Der Transporter AE-4 findet sich in den β -Schaltzellen des distalen Nephrons. In der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO_3 -Gruppe stieg die Expression des Transporters auf mRNA-Ebene gegenüber der Vergleichsgruppe im Mittel um 62% (5% KCitrat, 9.413 ± 1.026 mRNA/ μg RNA) und um 66% (5% KHCO_3 , 9.68 ± 1.02 mRNA/ μg RNA) signifikant an ($p < 0.05$). Gleichzeitig war sie auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$). Die Menge der mRNA von AE-4 blieb unter 5%iger KCl-Diät (6.06 ± 0.53 mRNA/ μg RNA) auf ähnlichem Niveau wie unter 0.93%iger KCitrat-Diät (5.82 ± 0.54 mRNA/ μg RNA).

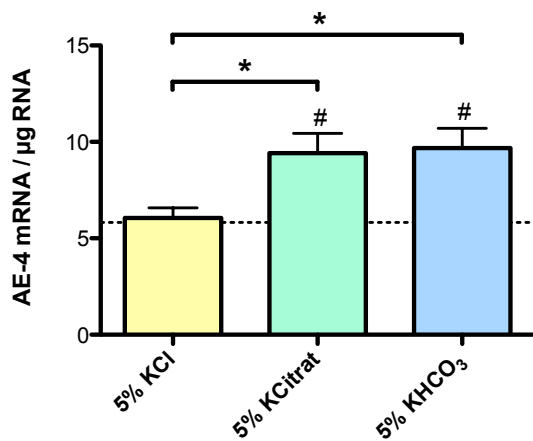


Abb 21: Expression von AE-4 auf mRNA Ebene

Die mRNA-Menge von AE-4 erhöhte sich signifikant in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. * $p < 0.05$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, # $p < 0.05$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test $n = 11-12$.

4.4.12 Verhältnis Pendrin zu NDCBE

Um Rückschlüsse über die unterschiedlich starke Regulation und somit Konstellation von Pendrin und seinem möglichen Gegenspieler NDCBE ziehen zu können, wurden diese zueinander ins Verhältnis gesetzt. Bei der Bildung des Verhältnisses von Pendrin zu NDCBE zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Menge der Pendrin-mRNA zur mRNA-Menge des NDCBE in der 5% KHCO₃-Gruppe. Dieser Anstieg war mit im Mittel 94% (von 0.46 ± 0.06 auf 0.89 ± 0.09) gegenüber der Vergleichsgruppe als auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe signifikant ($p < 0.001$). Die 5% KCitrat-Gruppe zeigte einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses gegenüber der 5% KCl-Gruppe ($p < 0.05$), jedoch nicht gegenüber der 0.93% KCitrat-Gruppe.

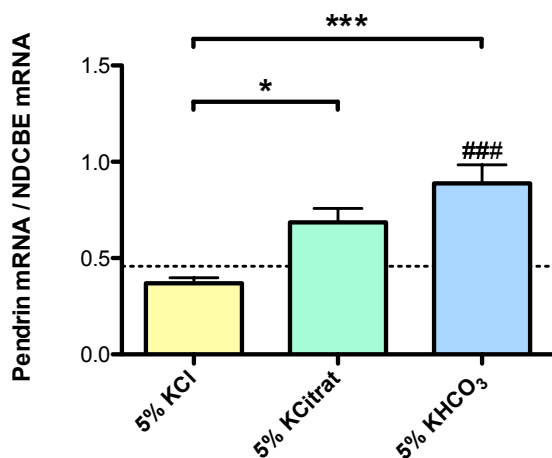


Abb 22: Verhältnis der Expression von Pendrin zu NDCBE auf mRNA-Ebene

In der 5% KHCO₃-Gruppe war ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses von Pendrin zu NDCBE sowohl gegenüber der Vergleichsgruppe als auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe zu erkennen. In der 5% KCitrat-Gruppe war ein Anstieg gegenüber der 5% KCl-Gruppe zu sehen. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. *** $p < 0.001$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, * $p < 0.05$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, ### $p < 0.001$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test $n = 11-12$.

4.4.13 Verhältnis Pendrin zu AE-4

Bei der Bildung des Verhältnisses von Pendrin zu AE-4 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Menge der Pendrin-mRNA zur mRNA-Menge des AE-4 in der 5% KCitrat-Gruppe (55% gegenüber der Vergleichsgruppe) und in der 5% KHCO₃-Gruppe (97% gegenüber der Vergleichsgruppe). Beide Anstiege waren auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe signifikant ($p < 0.05$ und $p < 0.001$).

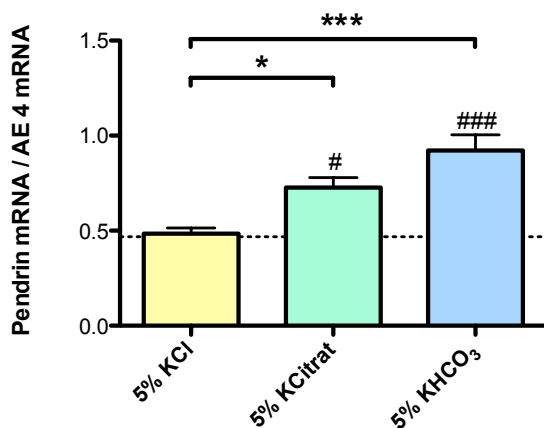


Abb 23: Verhältnis der Expression von Pendrin zu AE-4 auf mRNA-Ebene

In der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe war ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses von Pendrin zu AE-4 sowohl gegenüber der Vergleichsgruppe als auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe zu erkennen. Werte normiert auf in der Probe enthaltene RNA-Menge. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der Vergleichsgruppe dar. * $p < 0.05$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, *** $p < 0.001$ signifikant gegenüber den anderen hoch-K⁺-Gruppen, # $p < 0.05$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, ### $p < 0.001$ signifikant gegenüber Vergleichsgruppe, Mittelwerte \pm SEM, 1way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test $n = 11-12$.

4.4.14 Übersicht über die Veränderungen der Transporter und Kinasen

Die Veränderungen der mRNA-Menge der Transporter und Kinasen gegenüber der Vergleichsgruppe sind in Tab 3 als Übersicht dargestellt.

Tab 3: Veränderungen der mRNA-Menge der getesteten Transporter und Kinasen

Die Plus-Zeichen stehen für einen Anstieg der mRNA-Menge mit einer unterschiedlich hohen Signifikanz gegenüber der Vergleichsgruppe. +++p<0.001, ++ p<0.01, +p<0.05.

Transporter/Kinase	Diät-Gruppe		
	5% KCl	5% KCitrat	5% KHCO ₃
NaDC1	+++	-	-
NCC	-	-	-
α-ENaC	-	+	++
β-ENaC	-	+	+
Sgk1	-	-	+++
KS-WNK1	-	+	++
WNK4	-	-	-
ROMK	-	-	-
Pendrin	-	+	+++
NDCBE	-	+	+
AE-4	-	+	+

5 Diskussion

Die Hypertonie ist für die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen von großer Bedeutung. Das Zusammenspiel von Natrium (Na^+) und Kalium (K^+) und dessen Wirkung auf den Blutdruck ist schon lange Gegenstand der Forschung. Trotzdem sind noch einige Fragen ungeklärt; so z.B. warum eine erhöhte K^+ -Zufuhr nur in bestimmten Größenordnungen limitierend auf den Blutdruckanstieg unter gleichzeitig hoher Na^+ -Zufuhr wirkt. Daher war es Ziel der Arbeit, mögliche Ursachen für den erhöhten Blutdruck unter kombinierter hoch- K^+ - und hoch- Na^+ -Diät bei Mäusen zu finden. In der zugrundeliegenden Arbeit von Vitzthum et al. wurden die Versuche unter 3%iger NaCl-Diät in Kombination mit 5% KCitrat durchgeführt. Die Tiere zeigten einen erhöhten Blutdruck, erhöhte Aldosteron-Plasma-Spiegel sowie eine verminderte Na^+ -Ausscheidung über die Niere. Die β -Untereinheit des ENaC sowie die Kinase Sgk1 zeigten eine erhöhte Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene, was eine plausible Erklärung für den Blutdruckanstieg zu sein schien. Überraschenderweise konnte sowohl die Blockade des Mineralocorticoidrezeptors via Spironolacton als auch die direkte Blockade des ENaC via Amilorid den erhöhten Blutdruck nicht vollständig senken, was auf einen Aldosteron-Sgk1-ENaC-unabhängigen Mechanismus hindeutete (Vitzthum, et al. 2014).

Um die Wirkung des gleichzeitig mit dem K^+ gegebenen Anions zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche hoch- K^+ -Diäten gewählt: jeweils 3% NaCl in Kombination mit 5% K^+ als KCl, KCitrat oder KHCO_3 . Da diese drei Anionen eine unterschiedliche Basenstärke aufweisen, waren besonders die möglichen Effekte der verschiedenen Anionen auf den Säure-Basen-Haushalt und dessen mögliche Verbindung zum Blutdruck für die vorliegende Arbeit von Bedeutung.

5.1 Blutdruck

Wie in Abbildungen 2 bis 4 gezeigt, stieg der Blutdruck (MAP) bei allen drei hoch- K^+ -Gruppen unter Diät signifikant gegenüber der Basismessung an. Das würde dafür sprechen, dass das K^+ , eventuell über Aldosteron und nicht das Anion den Blutdruckanstieg bedingen würde. In der 5% KCl-Gruppe stieg der Blutdruck ($\text{MAP}_{\text{Nacht}}$) im Mittel um 13.8 mmHg und in der 5% KCitrat-Gruppe im Mittel um 13.6 mmHg an. Nur der Anstieg in der 5% KHCO_3 -Gruppe liegt, mit im Mittel 11.0 mmHg, nicht auf dem gleichen Niveau. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass das gegebene Anion möglicherweise eine zusätzliche Wirkung auf die renale Resorption der Elektrolyte hat und somit auch den Blutdruck mitbeeinflussen könnte.

5.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der Mäuse stieg in der Nacht- bzw. Aktivitätsphase gegenüber der Tagphase in allen drei Gruppen an, was den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere wieder spiegelt. Während der Nachtphase haben die Mäuse eine höhere HF als in ihrer Ruhephase, möglicherweise weil durch vermehrte körperliche Aktivität das Herz-Kreislauf-System stimuliert wird oder weil sie in dieser Zeit einen erhöhten Sympathikotonus aufweisen.

In der 5% KCitrat-Gruppe war ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Herzfrequenz unter Diät gegenüber der Basismessung während der Nacht zu erkennen (Abb 6a). In den beiden anderen hoch-K⁺-Gruppen war ein geringer Anstieg der HF unter Diät gegenüber der Basisdiät erkennbar (Abb 5a, 7a). Dies könnte darauf hinweisen, dass KCitrat eine andere Wirkung als KCl und KHCO₃ hat, z.B. dass die KCitrat-Diät zur Stimulation des Sympathikus und somit zur Steigerung der HF führt. Die Stimulation des Sympathikus könnte zum Anstieg des Blutdruckes beitragen. Neben der kardialen sympathischen Effekte konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der renalen sympathischen Fasern zu einer verminderten renalen Exkretion von NaCl und Wasser führt (Bello-Reuss, et al. 1975; Dumas, et al. 2010; Slick, et al. 1975). Dies geschieht zum einen über die Aktivierung der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse, als auch direkt über die Aktivierung von α_1 - und β_1 -Adrenorezeptoren im Tubulus durch sympathische Signale (Thukkani and Bhatt 2013). Des Weiteren konnten Krum et al. bei hypertensiven Patienten zeigen, dass eine Denervation der renalen sympathischen Nervenfasern den Blutdruck signifikant senken kann (Krum, et al. 2009). Henegar et al. bestätigten dies bei übergewichtigen Hunden (Henegar, et al. 2014). Eine andere aktuelle prospektive, einfach-blinde, randomisierte Studie konnte jedoch keinen signifikanten Effekt der Denervation nachweisen (Bhatt, et al. 2014). Trotz der momentanen Unsicherheit über die Effektivität der Denervation scheint besonders bei resistenten Hypertonikern die Überaktivität des sympathischen Nervensystems von Bedeutung zu sein (Bakris and Nathan 2014; Bhatt, et al. 2014; Reddi 2014; Ukena, et al. 2013). Die vermehrte Stimulation des Sympathikus könnte daher, über eine Na⁺- und Wasserretention, ein möglicher Grund für den Blutdruckanstieg insbesondere in der 5 % KCitrat-Gruppe sein.

5.3 Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma

5.3.1 Aldosteronkonzentration

Wie unter 1.4 beschrieben, kann eine erhöhte K⁺-Zufuhr über die Nahrung eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde bewirken. Aldosteron kann über ein Zusammenspiel von Sgk1, WNK4, ENaC und ROMK zu einer gesteigerten K⁺-Sekretion und Na⁺-Retention, sowie zu einem Blutdruckanstieg führen (Ring, et al. 2007; Soundararajan, et al. 2012). Deswegen war es von Interesse, ob der Plasma-Aldosteron-Spiegel in allen drei hoch-K⁺-Gruppen ähnlich ansteigen würde.

Wie in Abbildung 8 gezeigt, stieg der Aldosteronspiegel in allen drei hoch-K⁺-Gruppen signifikant an. Vor allem in der 5% KCl-Gruppe war ein deutlicher Anstieg zu erkennen. Überraschenderweise war die Expression der mRNA von Sgk1, α - und β -ENaC in der 5% KCl-Gruppe nicht signifikant erhöht. Die mRNA-Expression von Sgk1 und den beiden getesteten ENaC-Untereinheiten stieg vor allem in der 5% KHCO₃-Gruppe stark an, wohingegen der Aldosteronspiegel in dieser Gruppe nur moderat anstieg. Es wäre also denkbar, dass die Expression von Sgk1 und ENaC noch über einen anderen Mechanismus, neben dem über Aldosteron, reguliert werden könnte. So konnten Nielsen et al. zeigen, dass sowohl die Blockade des MR als auch die Blockade des Glukokortikoidrezeptors (GR), welcher auch die Wirkung von Aldosteron vermitteln könnte, den vermehrten Einbau von ENaC in die luminale Zellmembran in Aldosteron-infundierten Mäusen nicht verminderte (Nielsen, et al. 2007). Sgk1 kann möglicherweise auch unabhängig von Aldosteron vermehrt exprimiert werden. So fanden Perrotti et al. heraus, dass Sgk1 z.B. durch Insulin und cyclisches AMP stimuliert werden kann (Perrotti, et al. 2001). Folglich könnten Aldosteron-unabhängige Wege erklären, warum die Blockade des MR-ENaC-Weges unter der 5% KCitrat-Diät in vorherigen Versuchen von Vitzthum et al. nicht zu einer Blutdruckremission führte (Vitzthum, et al. 2014). Da jedoch auch die Blockade des ENaC durch Amilorid nicht den zu erwartenden blutdrucksenkenden Effekt zeigte, sollten des Weiteren auch ENaC-unabhängige Mechanismen in Betracht gezogen werden.

Da der Aldosteronspiegel in der 5% KCitrat-Gruppe am geringsten anstieg, müsste eine medikamentöse Blockade des Aldosteron-Weges noch in den anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen getestet werden, um hier die mögliche Wirkung auf den Blutdruck genauer zu untersuchen. Auch könnte eine mögliche Sonderstellung des Aldosterons in der 5% KCl-Gruppe dadurch verifiziert werden. Da die Expression der Transporter und Kinasen bisher nur auf mRNA-Niveau getestet wurde, müssten sich hier Analysen der Proteinexpression anschließen, um genauere Aussagen treffen zu können.

5.3.2 Reninaktivität

Renin wird unter Hypervolämie supprimiert. Wenn eine kombinierte hoch-NaCl-Diät / hoch-K⁺-Diät ein erhöhtes intravasales Volumen nach sich ziehen würde, sollten die Reninwerte absinken. Wie in Abbildung 9 deutlich wird, ist dies auch in allen drei Gruppen der Fall, wobei die Renin-Spiegel jedoch in keiner Gruppe signifikant erniedrigt waren. Hier wurde jedoch als Vergleichsgruppe nicht ein Standardfutter ohne NaCl-Belastung, sondern die kombinierte 3% NaCl und 0.93% KCitrat-Diät genutzt. Obgleich in dieser Gruppe (3% NaCl / 0.93% KCitrat) in vorherigen Experimenten keine Blutdruckerhöhung zu erkennen war, hat die NaCl-Gabe Auswirkungen auf den Renin-Haushalt. So zeigte die 3% NaCl- und 0.93% KCitrat-Diät-Gruppe eine Suppression des RAAS mit verminderter Reninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma (Vitzthum, et al. 2014). Dies könnte das Nichterreichen des Signifikanzniveaus gegenüber der Vergleichsgruppe erklären.

5.4 Urin pH

Der Urin pH zeigte einen deutlichen Anstieg in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe, wobei die höchsten Werte in der 5% KHCO₃-Gruppe erreicht wurden. Vermehrte oder verringerte HCO₃⁻-Rückresorption und H⁺-Abgabe über den Urin ist ein wichtiger Mechanismus der Niere, um den Säure-Basen-Haushalt des Organismus konstant zu halten. Da das HCO₃⁻ die größte Basenstärke der drei Anionen aufweist, könnte die 5% KHCO₃-Diät zu einer Alkalose führen, welche die Niere durch vermehrtes Ausscheiden von Basen in den Urin zu kompensieren versuchen würde. Es wäre also möglich, dass in der 5% KHCO₃-Gruppe vor allem Sekretion des HCO₃⁻ betrieben würde, während in der 5% KCl-Gruppe HCO₃⁻ resorbiert wird, um Basen zu sparen und den eher sauren Gehalt des Anions auszugleichen. Damit könnte der geringe Urin pH in der 5% KCl-Gruppe, sowie der hohe Urin pH in der 5% KHCO₃-Gruppe erklärt werden. Da das Anion Citrat eher basisch ist, dabei jedoch eine niedrigere Basenstärke als das HCO₃⁻ aufweist, zeigte sich zwar ein signifikanter, aber geringerer Anstieg des pH-Wertes des Urin in der 5% KCitrat- als in der 5% KHCO₃-Gruppe.

Die pH-Veränderungen des Urins zeigen, dass die zugeführten Anionen bzw. Basen renal ausgeschieden werden. So kommt neben der Belastung durch erhöhtes NaCl und K⁺ auch noch die Verarbeitung der anfallenden Säuren und Basen hinzu. Da die Schaltzellen (IC) die Regelung des Säure-Basen-Haushaltes stark beeinflussen und gleichzeitig einen möglichen Weg der Resorption von NaCl darstellen, könnten diese beiden Aufgabenfelder interferieren. Die Erhaltung eines konstanten Säure-Basen-Haushaltes durch die Niere ist enorm wichtig für den Organismus und könnte daher möglicherweise vorrangig vor der Blutdruckeinstellung bzw. der Einstellung des intravasalen Volumens sein.

5.5 Expression auf mRNA-Ebene im proximalen Tubulus

5.5.1 NaDC1

In der 5% KCl-Gruppe zeigte sich eine signifikante Veränderung der mRNA-Menge des Natrium-Dicarboxylat-Co-Transporters NaDC1. Die mRNA-Menge stieg deutlich gegenüber der Vergleichsgruppe, aber auch gegenüber den anderen beiden hoch-K⁺-Gruppen an. Jenkins et al. konnten schon 1985 zeigen, dass eine saure Diät mit NH₄Cl die Na⁺-abhängige Aufnahme von Citrat über die Bürstensaummembran des proximalen Tubulus deutlich erhöhte. Diese Erkenntnis wird ergänzt durch das Ergebnis von Pajor und Sun, die zeigen konnten, dass die Aktivität des NaDC1 durch metabolische Azidose gesteigert wird (Pajor and Sun 1996). Durch alkalische Diät verändert sich die Expression des NaDC1 hingegen nicht (Aruga, et al. 2000), was in Abbildung 11 auch deutlich wird, da die Expression der mRNA des NaDC1 sowohl in der 5% KHCO₃- als

auch in der 5% KCitrat-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe nicht verändert war. Da die Mäuse durch das zugeführte Cl^- weniger basische und mehr saure Nahrungsanteile zu sich nehmen, könnte es nötig sein, Basen renal zu resorbieren. Die Base Citrat wird frei filtriert und steht somit in ausreichender Menge zur Verfügung. Eine vermehrte Citrat-Aufnahme über NaDC1 aus dem Urin stellt somit einen Beitrag zur Säure-Basen-Regulation dar. Jedoch verbindet der Transporter die Aufnahme eines divalenten Anions (Citrat, Succinat, α -Ketoglutarat) mit der Aufnahme von 3 Na^+ -Ionen (Wright, et al. 1983), sodass eine gesteigerte Aktivität des NaDC1 mit einer vermehrten Resorption von Na^+ einhergeht. Die vermehrte Na^+ -Resorption kann osmotisch bedingt Wasser nach sich ziehen und so möglicherweise das intravasale Volumen vergrößern. Dieser Mechanismus könnte demzufolge für den Blutdruckanstieg in der 5% KCl-Gruppe ursächlich sein.

5.6 Expression auf mRNA-Ebene im distalen Tubulus

5.6.1 Hauptzellen

In den Hauptzellen des distalen Tubulus befinden sich apikal der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) sowie der renal outer medullary K^+ -channel (ROMK) und basolateral die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase). Diese drei Transporter dienen der Resorption von Na^+ und der Sekretion von K^+ und stellen einen Hauptmechanismus der renalen K^+ -Sekretion dar.

ROMK wird z.B. durch die L-WNK1 (long with-no-lysin kinase 1) und indirekt durch die KS-WNK1 (kidney-specific with-no-lysin kinase 1) reguliert. Die L-WNK1 hat einen hemmenden Effekt. Die KS-WNK1 hingegen hemmt die L-WNK1 und führt so zu einer Disinhibition des ROMK (Liu, et al. 2009). Wie wichtig die KS-WNK1 für den K^+ -Haushalt ist, konnten Liu et al. an transgenen Mäusen, welche eine höhere Anzahl an den Aminosäuren 1-253 der KS-WNK1 hatten, zeigen. Diese Tiere exprimierten vermehrt ROMK und betrieben somit verstärkt K^+ -Sekretion, was in verminderten K^+ -Serum-Spiegeln resultierte (Liu, et al. 2009). Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Menge der KS-WNK1 zeigte sich sowohl in der 5% KCitrat-, als auch in der 5% KHCO_3 -Gruppe. Die Expression des ROMK auf mRNA-Ebene zeigte jedoch keinen signifikanten Anstieg in den drei Gruppen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ROMK nicht zwingend auf mRNA-Ebene reguliert wird. So zeigten Fodstad et al., dass sich der K^+ -Transport der Zellen des CCD durch Modulation der basolateralen K^+ -Konzentration veränderte, dies jedoch zu keiner Änderung der mRNA-Level des ROMK führte (Fodstad, et al. 2009). Auch zeigten Frindt et al., dass die Dichte der K^+ -Transporter in der apikalen Membran der Zellen des CCT (kortikaler Sammeltubulus) unter einer hoch- K^+ -Diät anstieg, ohne dass eine Veränderung auf mRNA-Level stattfand (Frindt, et al. 1998).

Der Anstieg der mRNA-Menge von KS-WNK1 wurde umso größer, je basischer die Diät war. Genauso verhielt sich auch die mRNA-Menge der α - und β -Untereinheit des

ENaC, welche in der 5% KCitrat- und in der 5% KHCO₃-Gruppe einen signifikanten Anstieg zeigte. Es scheint so, als ob der Säure-Basen-Haushalt einen Einfluss auf KS-WNK1, ENaC und somit möglicherweise auch auf ROMK haben könnte. Diese Transporter werden zum einen durch Aldosteron reguliert, zum anderen können auch die β -Schaltzellen mit den Transportern der Hauptzellen interagieren und diese dadurch regulieren. So scheint eine Veränderung des pH-Wertes des Urins, z.B. die Alkalisierung durch HCO₃⁻ via Pendrin, einen Stimulus für ENaC darzustellen (Pech, et al. 2010).

5.6.2 β -Schaltzellen

Neben den Transportern der Hauptzellen sind die Transporter der β -Schaltzellen des distalen Tubulus von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit, da diese möglicherweise die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes und des Blutdrucks vereinen.

Die mRNA-Menge von Pendrin, NDCBE und AE-4 stieg in der 5% KHCO₃- und in der 5% KCitrat-Gruppe deutlich gegenüber der Vergleichsgruppe an. Diese Transporter befinden sich in den β -IC des CNT und des CCD (Kim, et al. 1999; Wall and Lazo-Fernandez 2015). Die Effekte auf die mRNA der Transporter der β -IC waren in der 5% KHCO₃-Gruppe stärker ausgeprägt als in der 5% KCitrat-Gruppe, was durch die höhere Basenstärke von KHCO₃ erklärt werden könnte. Den größten Anstieg, mit im Mittel 237%, zeigte Pendrin in der 5% KHCO₃-Gruppe und war damit auch gegenüber der 5% KCl-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0.001$).

Befinden sich, durch die erhöhte KHCO₃- bzw. KCitrat-Gabe, vermehrt Basen im Organismus, könnte der pH-Wert des Blutes ansteigen. Die Niere kann den Anstieg des pH-Werts durch vermehrte Ausscheidung von HCO₃⁻ mindern. Pendrin stellt für diese Situation einen Transportweg dar, da er mit HCO₃⁻ eine basische Substanz apikal aus der Zelle ins Lumen abgibt und gleichzeitig mit Cl⁻ eine eher saure Substanz aufnimmt, sodass die Basenlast insgesamt reduziert werden kann. Gleichzeitig scheint Pendrin die Aufgabe zu haben, das für die Na⁺-Rückresorption benötigte HCO₃⁻ und Cl⁻ für den Transporter NDCBE bereitzustellen (Chambrey, et al. 2013). Würden Pendrin und NDCBE gleich stark reguliert werden und die Stöchiometrie der transportierten Anionen gleich sein, würde netto kein HCO₃⁻ durch Pendrin aus der Zelle geschleust werden können. Da Pendrin in der 5% KHCO₃- und in der 5% KCitrat-Gruppe im Verhältnis zu NDCBE und AE-4 stärker hochreguliert wurde (siehe Abb. 22 und 23), wäre es dem Organismus möglich, Basen zu sezernieren und gleichzeitig den Na⁺-Transport über NDCBE aufrecht zu erhalten.

Durch die gesteigerte Aktivität des Pendrins könnte vermehrt HCO₃⁻ im Lumen anfallen. Da NDCBE möglicherweise Teile des durch Pendrin sezernierten HCO₃⁻ wieder in die Zelle aufnimmt (Wall and Lazo-Fernandez 2015), könnte das vermehrt im Lumen vorliegende HCO₃⁻ dazu führen, dass NDCBE stimuliert wird und so den Anstieg der mRNA-Menge des NDBCE in den vorliegenden Daten erklären (Abb 20). Auch ein verstärkter Transport des NDCBE und AE-4 durch das vermehrt anfallende Na⁺ wäre denkbar, jedoch sollte dieser Effekt durch den Vergleich mit der 3%igen NaCl und

0.93%igen KCitrat Diät (Vergleichsdiät) minimiert sein, da hier die gleiche Menge an NaCl wie in den hoch-K⁺-Gruppen gegeben wurde. Die Stimulation von NDCBE würde zu einer vermehrten Aufnahme von Na⁺ in die Zelle führen, welches wiederum über AE-4 aus der Zelle ins Blut transportieren werden würde. Sowohl in der 5% KHCO₃⁻, als auch in der 5% KCitrat-Gruppe war die mRNA-Menge von NDCBE und AE-4, mit im Mittel 60% bis 66%, ähnlich stark signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe erhöht (p<0.05). Der deutliche Unterschied im Anstieg der mRNA-Menge von Pendrin (237% und 153%) zu NDCBE und AE-4 (beide ca. 60%) impliziert, dass Pendrin hier zusätzlich die gesonderte Funktion der Basensekretion durch die β-Schaltzellen einnimmt.

Dass Pendrin nicht nur für die Verarbeitung der Basen zuständig ist, sondern auch erheblichen Einfluss auf den Blutdruck hat, konnten mehrere Arbeitsgruppen, wie unter 1.6 beschrieben, zeigen (Hadchouel, et al. 2011; Kim, et al. 2007; Verlander, et al. 2003). Dabei wurde z.B. deutlich, dass Aldosteron scheinbar ohne Pendrin keine NaCl-Resorption bewirken kann, da ein hypertensiver Effekt in Pendrin-Null-Mäusen bei chronischer Aldosteron-Gabe ausblieb (Hadchouel, et al. 2011; Verlander, et al. 2003). Vallet et al. demonstrierten 2006, dass Aldosteron jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation von Pendrin spielt und dass Cl⁻ einen weit stärkeren Einfluss auf Pendrin hat (Vallet, et al. 2006). Interessanterweise zeigten Mäuse, die Pendrin überexprimierten, einen Salz-sensitiven Hypertonus, bei dem der blutdrucksteigernde Effekt streng Cl⁻-abhängig war (Jacques, et al. 2013). Dies zeigt den engen Zusammenhang zwischen Pendrin und Cl⁻ und die Bedeutung des Cl⁻ für die Blutdruckregulation. Wie in Abbildung 1.1 deutlich wird, tauscht Pendrin HCO₃⁻ gegen Cl⁻ aus und stellt somit einen bedeutenden Resorptionsmechanismus für Cl⁻ dar (Hadchouel, et al. 2011; Royaux, et al. 2000; Schuster 1993; Wall and Lazo-Fernandez 2015). Wie die vorliegenden Daten zeigen, stieg die mRNA-Menge des Pendrins in der 5% KHCO₃⁻ und in der 5% KCitrat-Gruppe deutlich an. Durch die vermehrte Expression des Pendrins könnte möglicherweise, neben der vermehrten Ausscheidung von HCO₃⁻, verstärkt Cl⁻ resorbiert werden. Dieser Mechanismus könnte eine weitere mögliche Erklärung für den Blutdruckanstieg in diesen beiden Gruppen sein.

Wie in 5.6.1 erwähnt, könnte die Tatsache, dass ENaC durch eine erhöhte Pendrinaktivität stimuliert wird, für den Blutdruck von Bedeutung sein. So zeigten Pech et al. 2010, dass durch vermehrtes HCO₃ im Lumen die Menge der ENaC-Untereinheiten und die Aktivität von ENaC zunahm (Pech, et al. 2010). Dies könnte den signifikanten Anstieg der mRNA-Menge der α- und β-Untereinheiten des ENaC in den Hauptzellen in der 5% KHCO₃⁻ und 5% KCitrat-Gruppe erklären. Diese Stimulation könnte demzufolge einen weiteren Weg des Pendrins darstellen, die Na⁺-Resorption zu steigern und den Blutdruck zu beeinflussen.

Folglich könnte eine Belastung des Säure-Basen-Haushaltes durch Überangebot von Basen über Pendrin und seine unterschiedlichen Mitspieler (NDCBE, AE-4, ENaC) zu einer Veränderung des Blutdruckes führen und die Blutdruckerhöhung sowohl unter 5%iger KHCO₃⁻, als auch unter 5% KCitrat-Diät erklären. Pendrin könnte ENaC somit Aldosteron-unabhängig stimulieren. Außerdem kann Pendrin im Zusammenspiel mit

NDCBE, ohne ENaC, ursächlich für eine vermehrte Na^+ -Retention sein. Dies könnte erklären, warum sowohl die Blockade des Mineralocorticoidrezeptors, als auch die direkte Blockade des ENaC in vorherigen Experimenten nicht zu einer Remission der Blutdruckwerte unter 5%iger KCitrat-Diät führte. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass Aldosteron über einen anderen Mechanismus als den Mineralocorticoidrezeptor stimulierend auf Pendrin wirkt, weshalb die Blockade mit Spironolacton nicht wirksam sein könnte. Des Weiteren könnte, unabhängig von der Na^+ -Retention, das gleichzeitig möglicherweise vermehrt resorbierte Cl^- eine entscheidende blutdrucksteigernde Wirkung haben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Bluthochdruck stellt ein enormes Problem für die Gesundheit unserer Weltbevölkerung dar. Mehrerer Faktoren, unter anderem die sogenannte ‚western diet‘, mit ihrem hohen Gehalt an Kochsalz (NaCl) und ihrem geringen Gehalt an Kalium (K^+), tragen zur steigenden Inzidenz der Hypertension bei. Eine vermehrte Aufnahme von K^+ über Obst und Gemüse soll protektiv wirken und die durch NaCl verursachte Blutdruckerhöhung mindern. Dieser Effekt wird möglicherweise über die Niere vermittelt. Das Verständnis der renalen Mechanismen unter hoch-NaCl und hoch- K^+ -Diät ist somit von besonderer Bedeutung.

Der Effekt des K^+ scheint dabei dosisabhängig zu sein, da unter sehr hoher Gabe von K^+ der Blutdruck bei Mäusen erneut ansteigt und der protektive Effekt somit verschwindet. Mögliche Gründe für dieses Phänomen sollten in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Um einen Einblick in die renalen Mechanismen unter hoch- K^+ - und hoch-NaCl-Diät zu bekommen, wurden der Blutdruck, der Hormonstatus und der Urin-pH, sowie die Expression einiger renaler Transporter und deren regulierenden Kinasen bei Mäusen untersucht. Um eine mögliche Wirkung des gleichzeitig gegebenen Anions auf den Blutdruck zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche hoch- K^+ -Diäten miteinander verglichen: 3% NaCl wurde mit jeweils 5% K^+ als KCl, KCitrat oder $KHCO_3$ kombiniert und für 10 Tage den Mäusen über das Futter zugeführt.

Es zeigte sich ein sehr ähnlicher Blutdruckanstieg in allen drei Gruppen, was dafür spricht, dass der blutdrucksteigernde Effekt nicht oder nicht vorrangig durch das Anion verursacht wird. Jedoch zeigten sich in der mRNA-Expression der Transporter deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. So zeigte die KCl-Gruppe einen signifikanten Anstieg des im proximalen Tubulus gelegenen NaDC1, wohingegen die beiden Gruppen mit erhöhter Basenstärke (5% KCitrat und 5% $KHCO_3$) einen signifikanten Anstieg der Transporter des distalen Tubulus zeigten. Neben der Stimulation von α - und β -ENaC, sind hier vor allem die Transporter der β -Schaltzellen (Pendrin, NDCBE, AE-4) zu erwähnen. So könnte Pendrin im Zusammenspiel mit NDCBE und AE-4 einen Aldosteron- und ENaC-unabhängigen Weg der Na^+ -Retention in der 5% KCitrat als auch in der 5% $KHCO_3$ -Gruppe darstellen. Da Pendrin, NDCBE und AE-4 die HCO_3^- -Abgabe und die Na^+ -Aufnahme kombinieren, könnten sie eine Verbindung zwischen Säure-Basen-Haushalt und Blutdruckregulation schaffen. Der Transporter NaDC1 könnte in der 5% KCl-Gruppe eine wichtige Rolle für die Blutdruckerhöhung spielen.

In der 5% KCitrat-Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz gezeigt werden, was möglicherweise auf eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems hindeuten könnte. Die Aktivität des Sympathikus könnte daher in dieser Gruppe ebenso von Bedeutung für den gefundenen Blutdruckanstieg sein.

In dieser Arbeit konnten somit mögliche renale Transportwege, welche ursächlich für den Blutdruckanstieg unter kombinierter hoch-K⁺- und hoch-NaCl-Diät sein könnten, gefunden und ein eventueller Zusammenhang zwischen dem Säure-Basen-Haushalt und der Blutdruckregulation näher beleuchtet werden.

6.2 Ausblick

Um die Wirkung von Aldosteron in der 5% KCl-Gruppe beurteilen zu können, könnte eine Blockade des Mineralokortikoidrezeptors via Spironolacton mit anschließender Blutdruckmessung aufschlussreich sein. Dies könnte auch in der 5% KHCO₃-Gruppe durchgeführt werden, um eine mögliche Stimulation des Pendrins durch Aldosteron zu untersuchen, wobei jedoch nicht geklärt ist, ob Aldosteron auch hier über den Mineralocorticoidrezeptor wirken würde. Daher wäre eine Pendrin-Knock-Out-Maus besonders geeignet, um den in dieser Arbeit als ursächlich angesehen Effekt des Pendrins auf den Blutdruck zu untersuchen. Auch durch Wiederholen der Versuche mit einer NaDC1-Knock-Out-Maus würde sich der Effekt des NaDC1 auf den Blutdruck in der 5% KCl-Gruppe einschätzen lassen. Des Weiteren ist bisher nicht geklärt, ob eine Na⁺-Retention auch in der 5% KCl- und in der 5% KHCO₃-Gruppen vorlag. Auch die Untersuchung der hier vorausgesetzten Erhöhung des intravasalen Volumens, als Folge der Na⁺-Retention und als Ursache der Blutdruckerhöhung, könnte sich als sinnvoll erweisen. Des Weiteren wäre es wichtig, die Ergebnisse der mRNA-Daten auf Proteinniveau zu reproduzieren.

Würden sich die in der Arbeit als blutdrucksteigernd erachteten Transporter tatsächlich als ursächlich für die Blutdruckerhöhung erweisen, wäre ihre Blockade eventuell ein denkbarer neuer Ansatzpunkt in der Therapie der Hypertonie.

Die Aktivierung der sympathischen Fasern in der Niere und ihre Auswirkung auf den Blutdruck in der 5% KCitrat-Gruppe wäre möglicherweise ein weiterer Forschungsansatz.

7 Abkürzungsverzeichnis

Vorsätze für SI-Einheiten

k	kilo (10^3)
c	centi (10^{-2})
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca	circa
CCD	cortical collecting duct bzw. kortikales Sammelrohr
CD	collecting duct bzw. Sammelrohr
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNS
Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CT	connecting tubule bzw. Verbindungstubulus
DCT	distaler konvoluter Tubulus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid bzw. Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
K ⁺	Kalium
KS-WNL1	kidney-specific with-no-lysin Kinase1
L-WNK1	long with-no-lysin Kinase1
M	Molar
mM	Milimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	Murine Leukämie Virus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NCC	Natrium-Chlorid-Symporter
ng	Nanogramm
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-CoTransporter
Oligo(dT) ₁₈	Oligo18-Desoxythymidin
%	Prozent
p	Signifikanzniveau
PCR	polymerase chain reaction bzw. Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
RNA	ribonucleic acid bzw. Ribonukleinsäure (RNS)
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor

ROMK	renal outer medullary channel
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkription
SD	standard deviation bzw. Standardabweichung
sec	Sekunde
SEM	standard error of the mean bzw. Standardfehler des Mittelwerts
Sgk1	serum and glucocorticoid induced protein kinase
Tab	Tabelle
TAL	thick ascending limb of Henle bzw. dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife
Taq	Thermus aquaticus
WNK	with-no-lysin kinase

8 Literaturverzeichnis

Abriel, H., et al.

1999 Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *The Journal of clinical investigation* 103(5):667-73.

Appel, L. J., et al.

2006 Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 47(2):296-308.

Arroyo, J. P., et al.

2011 Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology* 26(2):115-23.

Bakris, G., and S Nathan.

2014 Renal denervation and left ventricular mass regression: a benefit beyond blood pressure reduction? *Journal of the American College of Cardiology* 63(18):1924-5.

Bello-Reuss, E., et al.

1975 Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. *The Journal of Clinical Investigation* 56(1):208-17.

Bhatt, D. L., et al.

2014 A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *The New England Journal of Medicine* 370(15):1393-401.

Bray, G. A., et al.

2004 A further subgroup analysis of the effects of the DASH diet and three dietary sodium levels on blood pressure: results of the DASH-Sodium Trial. *The American Journal of Cardiology* 94(2):222-227.

Calhoun, D. A.

2013 Hyperaldosteronism as a common cause of resistant hypertension. *Annual Review of Medicine* 64:233-47.

Calhoun, D. A., et al.

2008 Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 117(25):e510-26.

Calhoun, D. A., et al.

2002 Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension* 40(6):892-896.

Canessa, C. M., et al.

1994 Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367(6462):463-7.

Chambrey, R., et al.

2013 Renal intercalated cells are rather energized by a proton than a sodium pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(19):7928-33.

Chambrey, R., and F. Trepiccione

2015 Relative roles of principal and intercalated cells in the regulation of sodium balance and blood pressure. *Current Hypertension Reports* 17(4):538.

Conn, J. W.

1955 Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 45(1):3-17.

Corbett, W. T., et al.

1979 Utilization of swine to study the risk factor of an elevated salt diet on blood pressure. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32(10):2068-75.

Curtis, J. J., et al.

2000 Remission of essential hypertension after renal transplantation. 1983. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 11(12):2404-12.

Dahl, L.

2005 Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. *International Journal of Epidemiology* 34(5):967-972.

Dahl, L. K., and R. Tuthill

1974 Further evidence of the toxicity of NaCl. Increased blood pressure and mortality in the spontaneously hypertensive rat. *The Journal of Experimental Medicine* 139(3):617-28.

De la Sierra, A., et al.

2011 Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension* 57(5):898-902.

Doumas, M., et al.

2010 Renal sympathetic denervation and systemic hypertension. *The American Journal of Cardiology* 105(4):570-6.

Egan, B. M., et al.

2011 Uncontrolled and apparent treatment resistant hypertension in the United States, 1988 to 2008. *Circulation* 124(9):1046-58.

Eladari, D. and C. A. Hübner

2011 Novel mechanisms for NaCl reabsorption in the collecting duct. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 20(5):506-511.

Fodstad, H., et al.

2009 Effects of mineralocorticoid and K⁺ concentration on K⁺ secretion and ROMK channel expression in a mouse cortical collecting duct cell line. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 296(5):F966-75.

Frindt, G., et al.

1998 Dissociation of K channel density and ROMK mRNA in rat cortical collecting tubule during K adaptation. *The American Journal of Physiology* 274(3 Pt 2):F525-31.

Gallay, B. J., et al.

2001 Screening for primary aldosteronism without discontinuing hypertensive medications: plasma aldosterone-renin ratio. *American Journal of Kidney Diseases : the Official Journal of the National Kidney Foundation* 37(4):699-705.

Gamba, G.

2005 Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological Reviews* 85(2):423-93.

Gueutin, V., et al.

2013 Renal beta-intercalated cells maintain body fluid and electrolyte balance. *The Journal of Clinical Investigation* 123(10):4219-31.

Hadchouel, J., et al.

2011 Regulation of extracellular fluid volume and blood pressure by pendrin. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 28(3):505-12.

Henegar, J. R., et al.

2014 Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs. *American Journal of Hypertension* 27(10):1285-92.

Hennings, J. C., et al.

2012 A mouse model for distal renal tubular acidosis reveals a previously unrecognized role of the V-ATPase $\alpha 4$ subunit in the proximal tubule. *EMBO Molecular Medicine* 4(10):1057-1071.

Hentschke, M., et al.

2009 The murine AE4 promoter predominantly drives type B intercalated cell specific transcription. *Histochemistry and Cell Biology* 132(4):405-12.

Jacques, T., et al.

2013 Overexpression of pendrin in intercalated cells produces chloride-sensitive hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24(7):1104-13.

Kahle, K. T., et al.

2003 WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. *Nature Genetics* 35(4):372-6.

Kim, J., et al.

1999 Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10(1):1-12.

Kim, Y. H., et al.

2007 Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 293(4):F1314-24.

Knoers, N. V., and E. N. Levtchenko

2008 Gitelman syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* 3:22.

- Krum, H., et al.
2009 Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet* 373(9671):1275-81.
- Kurtz, A.
2012 Control of renin synthesis and secretion. *American Journal of Hypertension* 25(8):839-47.
- Kwan, M. W., et al.
2013 Compliance with the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet: a systematic review. *PloS one* 8(10):e78412.
- Leviel, F., et al.
2010 The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *Journal of Clinical Investigation* 120(5):1627-1635.
- Lifton, R. P., et al.
2001 Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104(4):545-56.
- Lingueglia, E., et al.
1994 Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel are differently regulated by aldosterone. *The Journal of Biological Chemistry* 269(19):13736-9.
- Liu, Z., et al.
2009 Regulation of ROMK channel and K⁺ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 284(18):12198-206.
- Luft, F. C., et al.
1991 Salt sensitivity and resistance of blood pressure. Age and race as factors in physiological responses. *Hypertension* 17(1 Suppl):1102-8.
- Manger, W. M., et al.
2003 Protective effects of dietary potassium chloride on hemodynamics of Dahl salt-sensitive rats in response to chronic administration of sodium chloride. *Journal of Hypertension* 21(12):2305-13.
- Meneton P., et al.
2005 Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases. *Physiol Rev* 85: 679–715.
- Moeller, H. B., et al.
2013 Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment. *Endocrine Reviews* 34(2):278-301.
- Morris, R. C., Jr., et al.
1999 Normotensive salt sensitivity: effects of race and dietary potassium. *Hypertension* 33(1):18-23.
- Muxfeldt, E. S., et al.
2012 Appropriate time interval to repeat ambulatory blood pressure monitoring in patients with white-coat resistant hypertension. *Hypertension* 59(2):384-9.

Nielsen, J., et al.

2007 Maintained ENaC trafficking in aldosterone-infused rats during mineralocorticoid and glucocorticoid receptor blockade. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292(1):F382-94.

Pajor, A. M.

2014 Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 466(1):119-30.

Pajor, A. M., and N. Sun

1996 Functional differences between rabbit and human Na(+)-dicarboxylate cotransporters, NaDC-1 and hNaDC-1. *The American Journal of Physiology* 271(5 Pt 2):F1093-9.

Pech, V., et al.

2010 Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO₃. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21(11):1928-41.

Pedersen, N. B., et al.

2010 Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule. *Kidney International* 78(2):160-9.

Perrotti, N., et al.

2001 Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 276(12):9406-12.

Pradervand, S., et al.

1999 A mouse model for Liddle's syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10(12):2527-33.

Quentin, F., et al.

2004 The Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 287(6):F1179-88.

Quinn, S., et al.

2014 Rapid aldosterone actions on epithelial sodium channel trafficking and cell proliferation. *Steroids* 81:43-8. Reddi, A. S.

Reilly, R. F., and D. H. Ellison

2000 Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiological Reviews* 80(1):277-313.

Ring, A. M., et al.

2007 An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(10):4025-9.

Rossier, B. C., and L. Schild

2008 Epithelial sodium channel: mendelian versus essential hypertension. *Hypertension* 52(4):595-600.

Royaux, I. E., et al.

2000 Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141(2):839-45.

Schuster, V. L.

1993 Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annual Review of Physiology* 55:267-88.

Slick, G. L., et al.

1975 Renal neuroadrenergic transmission. *The American Journal of Physiology* 229(1):60-5.

Soundararajan, R., et al.

2012 The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350(2):242-7.

Svetkey, L. P., et al.

2004 Effect of the dietary approaches to stop hypertension diet and reduced sodium intake on blood pressure control. *Journal of Clinical Hypertension* 6(7):373-81.

Thukkani, A. K., and D. L. Bhatt

2013 Renal denervation therapy for hypertension. *Circulation* 128(20):2251-4.

Tsuruoka, S., and G. J. Schwartz

1999 Mechanisms of HCO₃⁻ secretion in the rabbit connecting segment. *The American Journal of Physiology* 277(4 Pt 2):F567-74.

Ukena, C., et al.

2013 Renal denervation in the treatment of hypertension. *Current Hypertension Reports* 15(4):363-9.

Unwin, R. J., et al.

2004 An overview of divalent cation and citrate handling by the kidney. *Nephron. Physiology* 98(2):p15-20.

Vallet, M., et al.

2006 Pendrin regulation in mouse kidney primarily is chloride-dependent. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17(8):2153-63.

Verlander, J. W., et al.

2003 Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension* 42(3):356-62.

Vitzthum, H., et al.

2014 Functional coupling of renal K⁺ and Na⁺ handling causes high blood pressure in Na⁺ replete mice. *The Journal of Physiology* 592(Pt 5):1139-57.

Wall, S. M., et al.

2003 Localization of pendrin in mouse kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 284(1):F229-41.

Wall, S. M., and Y. Lazo-Fernandez

2015 The role of pendrin in renal physiology. *Annual Review of Physiology* 77:363-78.

Wall, S. M., and A. M. Weinstein

2013 Cortical distal nephron Cl(-) transport in volume homeostasis and blood pressure regulation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 305(4):F427-38.

Weinberger, M. H., et al.

1986 Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. *Hypertension* 8(6 Pt 2):1127-34.

Whitworth, J. A.

2003 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension* 21(11):1983-92.

Wright, S. H., et al.

1983 Kinetics of sodium succinate cotransport across renal brush-border membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 258(9):5456-62.

Zaika, O., et al.

2013 Direct activation of ENaC by angiotensin II: recent advances and new insights. *Current Hypertension Reports* 15(1):17-24.

9 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse in deutscher und englischer Sprache

Es zeigte sich ein sehr ähnlicher Blutdruckanstieg in allen drei Gruppen (5% KCitrat, 5% KHCO₃, 5%KCl) was dafür spricht, dass der blutdrucksteigernde Effekt nicht oder nicht vorrangig durch das Anion verursacht wird. Jedoch zeigten sich in der mRNA-Expression der Transporter deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. So zeigte die KCl-Gruppe einen signifikanten Anstieg des im proximalen Tubulus gelegenen NaDC1, wohingegen die beiden Gruppen mit erhöhter Basenstärke (5% KCitrat und 5% KHCO₃) einen signifikanten Anstieg der Transporter des distalen Tubulus zeigten. Neben der Stimulation von α - und β -ENaC, sind hier vor allem die Transporter der β -Schaltzellen (Pendrin, NDCBE, AE-4) zu erwähnen. So könnte Pendrin im Zusammenspiel mit NDCBE und AE-4 einen Aldosteron- und ENaC-unabhängigen Weg der Na⁺-Retention in der 5% KCitrat als auch in der 5% KHCO₃-Gruppe darstellen. Da Pendrin, NDCBE und AE-4 die HCO₃⁻-Abgabe und die Na⁺-Aufnahme kombinieren, könnten sie eine Verbindung zwischen Säure-Basen-Haushalt und Blutdruckregulation schaffen.

Summary of the results

The results showed a nearly identical increase of the blood pressure in all groups (5% KCitrat, 5% KHCO₃, 5%KCl), independent of the correspondent anion, even though the responses of renal gene expression differed between the three high K⁺ diet groups. While α - and β -ENaC mRNA was upregulated in the KCitrate and KHCO₃ group, it did not change in the KCl group. Furthermore, we found an upregulation of the mRNA of the Na⁺-citrate-cotransporter NaDC1 in the high KCl group, as well as an upregulation of the mRNA of pendrin, NDCBE and AE-4 in the high KHCO₃ and high KCitrate group. These findings indicate that in Na⁺ replete mice a high K⁺ diet induces blood pressure increase independent of both the co-administered anion and the aldosterone-Sgk1-ENaC-pathway. As pendrin combines the HCO₃⁻-delivery and the Na⁺-uptake, it could be possible that pendrin acts as a link between the acid-base-balance and the regulation of blood pressure.

10 Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen

Es sind keine Vorveröffentlichungen vorhanden.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Ehmke danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Zelluläre und integrative Physiologie diese Arbeit durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr.rer.nat. Helga Vitzthum für die Aufnahme in Ihren Arbeitsbereich, die Einarbeitung in die Methodik und die stets hilfreiche und umfassende Art der Betreuung.

Ich danke Ihr für die Hilfe bei der Planung und der kritischen Bewertung der Versuche, ebenso für die stets motivierenden und hilfreichen Gespräche, welche entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Vor allem möchte ich mich für Ihre Zeit und Muße bedanken - ich habe mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Ich danke Dr. Anika Seniuk für die Implantation der Telemetrie-Sender, die hilfreichen Antworten auf meine Fragen und die investierte Zeit in das Projekt.

Frau Telse Kock danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung und der Beantwortung etlicher das Labor-betreffenden Fragen.

Weiterhin möchte ich allen nichtgenannten Mitgliedern des Instituts für den freundlichen und hilfsbereiten Umgang danken.

Abschließend danke ich besonders meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: